

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ЧЕТЫРЕХДОМЕННЫХ ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫХ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

© И. А. Поздняков,¹ С. О. Скарлато

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ *электронный адрес: pozdnyakov@cytspb.rssi.ru*

Четырехдоменные (ЧД) потенциалуправляемые катионные каналы (ПКК) — это семейство ионных каналов, появление и эволюция которого были тесно связаны с формированием разнообразия возбудимых клеточных мембран эукариот, в том числе мембран нервных клеток животных. Понимание хода эволюции этих каналов в значительной степени затруднено практически полным отсутствием данных о ЧД-ПКК у большинства групп одноклеточных эукариот (протистов). К числу малоизученных в этом отношении таксонов протистов относятся динофлагелляты, имеющие большое экологическое значение и представляющие существенный интерес для токсикологии и фармакологии. В настоящей работе в транслированных транскриптах девяти видов динофлагеллят идентифицированы аминокислотные последовательности ЧД-ПКК, содержащие все четыре структурных домена. С целью выявления структурно-функционального разнообразия ЧД-ПКК динофлагеллят с помощью биоинформатических подходов были охарактеризованы важнейшие детерминанты этих каналов — селективный фильтр, сегменты S4 и участок, гомологичный области инактивационных ворот. На основании анализа первичной структуры этих функционально значимых детерминант сделан вывод о том, что среди ЧД-ПКК динофлагеллят обнаруживаются следующие каналы: 1) катионные с селективным фильтром, характерным для кальциевых каналов; 2) каналы с сегментами S4, характерными для потенциалуправляемых каналов; 3) каналы с сегментами S4, характерными для потенциалнеуправляемых каналов; 4) каналы, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, свидетельствует о возможности их быстрой инактивации; 5) каналы, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, нехарактерна для каналов с быстрой инактивацией. Полученные данные свидетельствуют о том, что структурно-функциональное разнообразие ЧД-ПКК динофлагеллят сопоставимо с таковым у многоклеточных животных.

Ключевые слова: динофлагелляты, ионные каналы, одноклеточные эукариоты, потенциалуправляемые ионные каналы.

Принятые сокращения: а. о. — аминокислотные остатки, ПКК — потенциалуправляемые катионные каналы, ЧД-ПКК — четырехдоменные ПКК, Na_v — потенциалуправляемые натриевые каналы, HVA Ca_v — потенциалуправляемые кальциевые каналы, активирующиеся при высоких потенциалах, LVA Ca_v — потенциалуправляемые кальциевые каналы, активирующиеся при низких потенциалах, NALCN — потенциал-нечувствительные каналы натриевой утечки, Csch — потенциал-нечувствительные кальциевые каналы грибов, S1—S6 — трансмембранные сегменты.

Четырехдоменные (ЧД) потенциалуправляемые катионные каналы (ПКК) представляют собой семейство ионных каналов, входящее в состав суперсемейства ПКК. В настоящее время к ЧД-ПКК относят 5 хорошо изученных подсемейств: потенциалуправляемые натриевые каналы (Na_v), потенциалуправляемые кальциевые каналы, активирующиеся при высоких потенциалах (HVA Ca_v), потенциалуправляемые кальциевые каналы, активирующиеся при низких потенциалах (LVA Ca_v), потенциал-нечувствительные каналы натриевой утечки (NALCN) и потенциал-нечувствительные кальциевые каналы грибов (Csch). Каналы подсемейств Na_v, HVA Ca_v, LVA Ca_v и NALCN описаны у многоклеточных животных, сестринских им одноклеточных жгутиконосцев хоанофлагеллят, а также у апусомонад (Liebeskind et al., 2011). В то же

время грибы, которые вместе с животными (Metazoa), хоанофлагеллятами (Choanoflagellata) и рядом других групп одноклеточных эукариот объединяются в супергруппу Opisthokonta, обладают лишь одним подсемейством ЧД-ПКК — Csch (Liebeskind et al., 2012). Кроме того, анализ геномных и транскриптомных баз данных других групп эукариот, включая динофлагеллят, выявил ЧД-ПКК, которые не могут быть отнесены ни к одному из известных подсемейств (Liebeskind et al., 2012; Поздняков, Скарлато, 2015).

Основным структурным модулем ЧД-ПКК, как и большинства представителей суперсемейства ПКК, являются 6 трансмембранных сегментов S1—S6 с поровой петлей между сегментами S5 и S6. Однако в отличие от других семейств ПКК единственная порообразующая

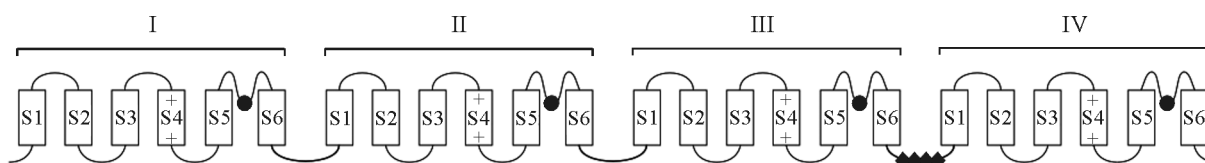


Рис. 1. Общая схема структурной организации четырехдоменных потенциалуправляемых катионных каналов (ЧД-ПКК).

Сегменты S4 могут быть богаты остатками положительно заряженных аминокислот (показаны знаками «плюс») и выполнять роль сенсоров напряжения. Петли между сегментами S5—S6 формируют пору канала и содержат по одному остатку аминокислоты (черные кружки) селективного фильтра. На линкерном участке между доменами III и IV может содержаться последовательность из четырех аминокислот (цепочка ромбов), играющая роль инактивационных ворот. S1—S6 — трансмембранные сегменты, I—IV — порядковые номера доменов.

субъединица ЧД-ПКК состоит из 4 модулей (S1—S6), которые представляют собой домены I—IV (рис. 1). Именно в составе поровых петель каждого из доменов находятся аминокислотные остатки, которые определяют селективность канала к определенным ионам, формируя так называемый селективный фильтр (Hille, 2001).

В свою очередь трансмембранные сегменты S4 принимают непосредственное участие в потенциалуправляемой активации большинства четырехдоменных каналов (Na_v , HVA Ca_v и LVA Ca_v), выполняя роль сенсора напряжения. Эта функция сегментов S4 обусловлена наличием в их составе большого числа положительно заряженных аминокислотных остатков лизина и аргинина (Hille, 2001). Полагают, что каналы подсемейств NALCN и Cch способны активироваться при изменениях мембранного потенциала вследствие обедненности их сегментов S4 остатками лизина и аргинина, в особенности сегмента S4 домена IV (Liu et al., 2006; Lu et al., 2007; Liebeskind et al., 2012).

Еще одним функционально важным участком канала из семейства ЧД-ПКК является линкерная последовательность, соединяющая домены III и IV (рис. 1). У каналов подсемейства Na_v этот участок содержит так называемые инактивационные ворота, благодаря которым каналы подсемейства Na_v способны переходить в неактивное состояние уже через несколько миллисекунд после их активации (Hille, 2001). Такие ворота образованы 4 аминокислотными остатками, первые 3 из которых — остатки неполярных гидрофобных аминокислот (IFM, у каналов Na_v1), а четвертый — остаток полярной незаряженной аминокислоты треонина (T). Показано, что триплет гидрофобных аминокислот («инактивационная чистаца») играет существенную роль в докинге инактивационных ворот в области поры канала (Goldin, 2003).

Появление и дальнейшая эволюция семейства ЧД-ПКК тесно связаны с возникновением большого разнообразия возбудимых мембран у эукариот и формированием нервной системы у многоклеточных животных (Hille, 2001; Liebeskind et al., 2012). В ходе эволюции описанных выше подсемейств ЧД-ПКК появились каналы с различными функциональными характеристиками — кальций- и натрий-селективные каналы, потенциал-чувствительные и потенциал-нечувствительные каналы, каналы с особым механизмом быстрой инактивации. В настоящее время понимание эволюции этих каналов, а вместе с тем и эволюции электровозбудимых тканей в значительной степени затруднено вследствие практически полного отсутствия данных о ЧД-ПКК различных таксонов одноклеточных эукариот. Одним из малоизученных в этом отношении таксонов является филогенетически удаленная от многоклеточных животных группа протистов — динофлагелляты (Pozdnyakov et al., 2014; Поздняков, Скарлато, 2015). Помимо фундаментального значения изучение ионных каналов и физиологии диноф-

лагеллят имеет важное практическое значение с точки зрения охраны окружающей среды и здоровья человека, поскольку эти организмы играют ключевую роль в функционировании водных экосистем — вызывают «цветение воды» и синтезируют множество вторичных метаболитов и токсинов (Wang 2008; Околотков, 2011).

В настоящей работе проведен биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей трех детерминант ЧД-ПКК динофлагеллят (селективного фильтра, сегментов S4 и последовательности, гомологичной области инактивационных ворот) с целью охарактеризовать их структурно-функциональное разнообразие.

Материал и методика

Транскриптомные базы данных. В работе использовали транслированные транскриптомы из базы данных проекта Marine microbial eukaryotic transcriptome sequencing project (MMETSP; <http://data.imicrobe.us/project/view/104>, Combined Assemblies; Keeling et al., 2014): *Alexandrium-tamarense*-CCMP1771, *Amphidinium-carterae*-CCMP1314, *Cryptocodinium-cohnii*-Seligo, *Karenia-brevis*-CCMP2229, *Kryptoperidinium-foleaceum*-CCMP1326, *Lingulodinium-polyedra*-CCMP1738, *Oxyrrhis-marina*-LB1974, *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329, *Prorocentrum-minimum*-CCMP2233, *Scrippsiella-trochoidea*-CCMP3099 и *Symbiodinium-sp*-Mp.

Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей производили в программе BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) с помощью алгоритма Local-BLASTP (матрица весов аминокислотных замен BLOSUM62). В качестве последовательностей запроса использовали идентифицированные нами ранее аминокислотные последовательности ЧД-ПКК *Prorocentrum minimum* (Поздняков, Скарлато, 2015). В 11 проанализированных транскриптомах 10 видов динофлагеллят выявили 42 последовательности ЧД-ПКК (параметр E-value для всех результатов запроса $\leq 10^{-30}$). Для дальнейшего анализа отобрали 24 аминокислотные последовательности, содержащие все 4 консервативных домена, индексируемых в базе данных консервативных белковых доменов Pfam (Finn et al., 2016; <http://pfam.xfam.org/>) как домены pfam00520, каждый из которых представляет собой типичный для суперсемейства ПКК домен с 6 трансмембранными сегментами S1—S6. В ряде случаев первый из доменов pfam00520 был представлен лишь частично, участком S5—S6. В транскриптомах *Cryptocodinium-cohnii*-Seligo и *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329 не было обнаружено последовательностей ЧД-ПКК, содержащих все 4 домена, поэтому последовательности ЧД-ПКК из этих транскриптомов не были включены в анализ.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MAFFT 7 (Katoh, Standley, 2013). Дальнейший анализ полученного выравнивания проводили с помощью программ BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) и Uniprot UGENE (Okonechnikov et al., 2012).

Результаты

Во всех 11 проанализированных транскриптомах 10 видов динофлагеллят были идентифицированы аминокислотные последовательности каналов семейства ЧД-ПКК. Однако последовательности, содержащие все 4 домена, были обнаружены только в 9 транскриптомах 9 видов динофлагеллят. Именно эти 24 последовательности были использованы для биоинформатического анали-

за с целью выявления их структурно-функциональных детерминант — селективного фильтра, сегментов S4 и последовательностей, гомологичных области инактивируемых воротов.

Селективный фильтр. С помощью множественных выравниваний 24 идентифицированных аминокислотных последовательностей ЧД-ПКК 9 видов динофлагеллят с аминокислотными последовательностями уже охарактеризованных четырехдоменных каналов животных в каждом из 4 доменов динофлагеллят были выявлены аминокислотные остатки, входящие в состав селективного фильтра (рис. 2, а; см. таблицу).

Селективные фильтры 23 рассмотренных в работе последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят имеют вид E/E/E/E (по одному остатку глутамата из каждого домена), что может свидетельствовать о селективности всех этих каналов в отношении одних и тех же ионов. Лишь

Последовательность	а			
	I	II	III	IV
HomoCavL	F Q C I T M E G W T D V L	F Q I L T G E D W N S V M	F T V S T F E G W P E L L	F R C A T G E A W Q D I M
HomoCavT	F Q V I T L E G W V D I M	F Q I L T Q E D W N V V L	F V L S S K D G W V N I M	F R V S T G D N W N G I M
HomoNav1	F R L M T Q D F W E N L Y	F R V L C G E - W I E T M	L Q V A T F K G W M D I M	F Q I T T S A G W D G L L
HomNALCN	Y E A A S Q E G W V F L M	F Q I L T Q E G W V D V M	F E V L S L K G W V E V R	F R I V T G E D W N K I M
SaccCch	F V I M S A N T F T D L M	F I I G S T E N W T D I L	Y Q I I S L E G W V D L L	F R C S F G E G W N Y I M
Ac29873	F Q C V T L E G W V D I M	F Q I L T G E N W N E V M	F E I A T T E G W V D V M	I R S M T G E A W N E I M
Ac156993	F Q S M T L E G W T D I M	F Q V M S G E N W N T I M	F E I L T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N N I M
At406971	F Q M I T M E G W T D V M	F Q I L T G E N W N V V M	F E L S T T E G W V D V M	M R A C T G E A W N Y I M
Kb20887	F Q S M T M E G W V D I M	F Q I M S G E N W N V V M	V E I S T T E M W L D V M	F R S M T G E V W N E I M
Kb269344	F Q S M T M E G W V D I M	F Q V M S G E N W N T V M	F E L T T T E G W V D V M	F R S M T G E A W N E I M
Kb53452	F Q C M T L E G W V D L M	F Q I L T G E N W N A I M	V E I S T T E G W I D V L	I R S V T G E G W N E M M
Kb269973	L Q I I T L E G W T E I M	F V L L T G E N W N E I M	F E V S T L E M W P D V M	F R M T T G E S W N G I M
Kb20579	F R V A T M E G W A M I L	F Q L L C G E R W H E T M	L H V G T G E G W V E V M	L R V S T G E N W Q N I M
Kf407651	F Q C M T M E G W T D I M	F Q I M T G E N W N V V M	I E I S T T E G W V D A M	F R A S T G E A W N E V M
Kf405392	F Q C M T M E G W T D L M	F Q V M T G E N W N T I M	T E I S T T E G W V D V M	F R A A T G E A W N E I M
Kf416989	F Q C M T M E G W T D I M	F Q I M T G E N W N T I M	L E I S T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E I M
Lp90575	F Q V M T L E G W T D L M	F Q V M T G E N W N T I M	F E I S T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E V M
Om66755	F Q T I T L E G W V D V M	F Q I L T G E N W N T V M	F E I S T T E G W I D V M	I R C L T G E A W N D I M
Pm2595	F Q S M T V E G W T V I M	F Q V M T G E N W N W I M	F E I S T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E I M
Pm20998	F Q S M T V E G W T V I M	F Q V M T G E N W N W I M	F E I S T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E I M
Pm47759	F Q S M T L E G W I D L T	F Q V M S G E N W N T I M	F E I A T T E G W V D V M	L R A S T G E A W N E I M
Pm40145	F Q S M T L E G W T E F M	F Q L M T G E N W N T V M	F E I S T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E L M
Ssp188361	F Q C M T L E G W T D V M	F Q I M T G E N W N T I M	F E I S T T E G W A D V M	F R G S T G E A W N E I M
Ssp190870	F Q C M T M E G W T D I M	F Q I M T G E N W N T V M	F E I S T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E I M
St388392	F Q C M T M E G W T D I M	F Q V M T G E N W N T I M	F E I M S T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E I M
St9808	F Q S M T M E G W T D L M	F Q I M T G E N W N A I M	I E I S T T E G W V D A M	F R A S T G E A W N E I M
St26908	F Q C M T M E G W T D L M	F Q V M T G E N W N T I M	T E I S T T E G W V D V M	F R A S T G E A W N E I M
St391309	F Q S I T L E G W T D V M	F Q I L S G E N W N T V M	F E I C T T E G W V D L M	I R A M T G E G W N E L M
St17126	F Q V S T Q E G W T S M L	F A L L V G Q D W H S M M	F H I S T G E G W L D T L	L R A A T G E K W N H E M M

Рис. 2. Результат множественного выравнивания аминокислотных последовательностей поровых петель (а) и сегментов S4 (б) ЧД-ПКК динофлагеллят и опистхонкт.

Прямоугольниками выделены аминокислотные остатки, входящие в состав селективных фильтров соответствующих каналов (а), и остатки положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина (б), кружками (б) — остатки положительно заряженной аминокислоты гистидина. I—IV — порядковые номера доменов. HomoCavL — Ca_v1.2 *Homo sapiens* (NCBI: Q13936.4); HomoCavT — Ca_v3.2 *H. sapiens* (NCBI: NP_066921.2); HomoNav1 — Na_v1.1 *H. sapiens* (NCBI: NP_001159435.1); HomNALCN — NALCN *H. sapiens* (NCBI: NP_443099.1); SaccCch — Cch1p *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI: NP_011733.3); Ac29873 — ЧД-ПКК 29873_1 *Amphidinium carterae* (MMETSP: Amphidinium-carterae-CCMP1314); Ac29873 — ЧД-ПКК 156993_1 *A. carterae* (MMETSP: Amphidinium-carterae-CCMP1314); Kb20887 — ЧД-ПКК 20887_1 *Karenia brevis* (MMETSP: Karenia-brevis-CCMP2229); Kb269344 — ЧД-ПКК 269344_1 *K. brevis* (MMETSP: Karenia-brevis-CCMP2229); Kb53452 — ЧД-ПКК 53452_1 *K. brevis* (MMETSP: Karenia-brevis-CCMP2229); Kb269973 — ЧД-ПКК 269973_1 *K. brevis* (MMETSP: Karenia-brevis-CCMP2229); Kb20579 — ЧД-ПКК 20579_1 *K. brevis* (MMETSP: Karenia-brevis-CCMP2229); Kf407651 — ЧД-ПКК 407651_1 *Kryptoperidinium foliaceum* (MMETSP: Kryptoperidinium-foliaceum-CCMP1326); Kf405392 — ЧД-ПКК 405392_1 *K. foliaceum* (MMETSP: Kryptoperidinium-foliaceum-CCMP1326); Kf416989 — ЧД-ПКК 416989_1 *K. foliaceum* (MMETSP: Kryptoperidinium-foliaceum-CCMP1326); Lp90575 — ЧД-ПКК 90575_1 *Lingulodinium polyedrum* (MMETSP: Lingulodinium-polyedra-CCMP1738); Om66755 — ЧД-ПКК 66755_1 *Oxyrrhis marina* (MMETSP: Oxyrrhis-marina-LB1974); Pm2595 — ЧД-ПКК 2595_1 *Prorocentrum minimum* (MMETSP: Prorocentrum-minimum-CCMP2233); Pm20998 — ЧД-ПКК 20998_1 *P. minimum* (MMETSP: Prorocentrum-minimum-CCMP2233); Pm47759 — ЧД-ПКК 47759_1 *P. minimum* (MMETSP: Prorocentrum-minimum-CCMP2233); Pm40145 — ЧД-ПКК 40145_1 *P. minimum* (MMETSP: Prorocentrum-minimum-CCMP2233); Ssp188361 — ЧД-ПКК 188361_1 *Symbiodinium* sp. (MMETSP: Symbiodinium-sp-Mp); Ssp190870 — ЧД-ПКК 190870_1 *Symbiodinium* sp. (MMETSP: Symbiodinium-sp-Mp); St388392 — ЧД-ПКК 388392_1 *Scrippsiella trochoidea* (MMETSP: Scrippsiella-trochoidea-CCMP3099); St9808 — ЧД-ПКК 9808_1 *S. trochoidea* (MMETSP: Scrippsiella-trochoidea-CCMP3099); St26908 — ЧД-ПКК 26908_1 *S. trochoidea* (MMETSP: Scrippsiella-trochoidea-CCMP3099); St391309 — ЧД-ПКК 391309_1 *S. trochoidea* (MMETSP: Scrippsiella-trochoidea-CCMP3099); St17126 — ЧД-ПКК 17126_1 *S. trochoidea* (MMETSP: Scrippsiella-trochoidea-CCMP3099).

6

Последовательность	I	II	III	IV
HomoCavL	R A - F R V L R P L - - - R L V S	R C V R L L R I F - K I T R	K I L R V L R V L R P L R	R L F R V M R L V K L L S
HomoCavT	R T - V R V L R P L - - - R A I N	R T F R L L R V L - K L V R	R V L R L L R T L R P L R	R V L R I A R V L K L L K
HomoNav1	R T - F R V L R A L - - - K T I S	R S F R L L R V F - K L A K	K S L R T L R A L R P L R	R L A R I G R I L R L I K
HomNALCN	G M - L R I P R P L I M I R A F R	T Y F Q V L R V V - R L I K	Q L L M V L R C L R P L R	R F F S I C G - - - - -
SaccCch	K P - L A I L R I L - - - R L V N	Ⓜ I S R F Y R V I - - - I	R I F K G L T A L R A L R	W F Ⓜ N I K G F F L L V I
Ac29873	L A - S Q V L G Q M G L G A T E K	R A F R L L R I F - K L A K	Q I F R L A R V L R P L R	R I F R I A R L F R L L R
Ac156993	R M - F R M L R P L - - - R S L N	R V A R L M R I L N K I A S	K T L R I L R A L R P L R	R V L R I F R L F R L L R
At406971	- - - - - - - - - - - - - - - -	R T F R L M R V F - K L A R	R S L R T L R A L R P L R	R T F R I G R I F R L V K
Kb20887	R V - F R V L R P L - - - R S I N	R G F R L V R V V F K I A R	K N L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L I R
Kb269344	R I - F R A L R P L - - - R S M T	R I F R L A R V V V K I S N	K T L R I L R A F R P L R	R I F R V A R L F R L L R
Kb53452	L V - F K V L R P L - - - R S L T	R G L R L L R I F - K L A K	K T L R I I R A L R P L R	R A F R A R L F R L V R
Kb269973	R T - V R I L R P L - - - R T I N	R T F R L M R V F - K L A R	K A L R A I R A L R P L R	R I L R A A R M F R L V K
Kb20579	R S - V R I L R P L - - - R T I N	R V S R L L R I F - K I F G	R A M R L L R V M R P L R	Ⓜ A F R V M R V I R L V R
Kf407651	R L - F R V L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K F A S	K T L R L L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L R
Kf405392	R L - F R V L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K F A S	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L K
Kf416989	R L - F R V L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K L A T	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L K
Lp90575	R L - F R L L R P L - - - R S L N	R T F R L F R V M N K L A N	R V L R I L R T F R P L R	R I L R I A R L F R L L R
Om66755	R S - F R V L R P L - - - R S L T	R G L R L L R V F - K L A K	K T I R I L R A L R P L R	G V L R T L R L F R L V R
Pm2595	R V - F K V L R P L - - - R S L N	R V L R L F R V L N K L A Y	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L R
Pm20998	- - - - - - - - - - - - - - - -	R V L R L F R V L N K L A Y	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L R
Pm47759	E V - I Q V V A P T - - - P I A E	R T F R L F R V M N K L A Ⓜ	K T L R I L R T F R P L R	R - - - - E A I P P A Q
Pm40145	R T C H R A A R P R P Q E R Q R D	R T L R L F R V L N K L A S	K T L R I L R A L R P L R	R I F R I A R L F R L L R
Ssp188361	R M - F R I L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K L A S	K T V R M L R A L R P L R	S L F R V A R L F R L L Ⓜ
Ssp190870	R V - F R A L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K L A N	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L R
St388392	R L - F R I L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K L A N	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I G R L F - - - R
St9808	R L - F R V L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K F A S	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L K
St26908	R L - F R V L R P L - - - R S L N	R T L R L F R V L N K F A S	K T L R I L R A F R P L R	R I F R I A R L F R L L K
St391309	R T - I R V L R P L - - - R T L S	R A F R L L R I F - K L A K	K I F R I A R M L R P L R	R I F R V A R L F R L V R
St17126	R A - L R V L R P L - - - R T I N	R I A R L L R V F - K I I G	R A L R V V R V L R P L K	R G F R V L R V L R M A R

Рис. 2 (продолжение).

**Обобщенные данные о структуре функционально значимых участков
четырёхдоменных потенциалуправляемых катионных каналов динофлагеллят**

Транскриптом	Номер последовательности	Селективный фильтр	Сегменты S4	Мотив ИВ
Alexandrium-tamarensе-CCMP1771	406917_1	E/E/E/E	-/v/v/v	VLLT
Amphidinium-carterae-CCMP1314	156993_1	E/E/E/E	v/v/v/v	TCLT
	29873_1	E/E/E/E	x/v/v/v	YLMT
Karenia-brevis-CCMP2229	20887_1	E/E/E/E	v/v/v/v	VMLT
	269344_1	E/E/E/E	v/v/v/v	FLLT
	53452_1	E/E/E/E	v/v/v/v	SLLT
	269973_1	E/E/E/E	v/v/v/v	LVLT
	20579_1	E/E/E/E	v/v/v/v	EMSS
Kryptoperidinium-foleaceum-CCMP1326	405392_1	E/E/E/E	v/v/v/v	YLLT
	407651_1	E/E/E/E	v/v/v/v	DIIS
	416989_1	E/E/E/E	v/v/v/x	FMLT
Lingulodinium-polyedra-CCMP1738	90575_1	E/E/E/E	v/v/v/v	QTVS
Oxyrrhis-marina-LB1974	66755_1	E/E/E/E	v/v/v/v	IWAT
Prorocentrum-minimum-CCMP2233	40145_1	E/E/E/E	v/v/v/v	LKLT
	47759_1	E/E/E/E	x/v/v/v	GMLT
	20998_1	E/E/E/E	-/v/v/v	IMST
	2595_1	E/E/E/E	v/v/v/v	IMST
Scrippsiella-trochoidea-CCMP3099	9808_1	E/E/E/E	v/v/v/v	DIIS
	26908_1	E/E/E/E	v/v/v/v	VLLS
	388392_1	E/E/E/E	v/v/v/v	LMLT
	391309_1	E/E/E/E	v/v/v/v	LMIT
	17126_1	E/Q/E/E	v/v/v/v	DLLD
Symbiodinium-sp-Mp	188361_1	E/E/E/E	v/v/v/v	VLLT
	190870_1	E/E/E/E	v/v/v/v	VMLT

Примечание. Представлены данные базы MMETSP (<http://data.imicrobe.us/project/view/104>, Combined Assemblies). В колонке «Сегменты S4»: v — сегмент, богатый лизином и аргинином, x — сегмент, обедненный лизином и аргинином, положение x и v отражает номер домена, в котором находится данный сегмент. В колонке «Мотив ИВ» полужирным шрифтом выделены последовательности с каноническим мотивом инактивационных ворот (ИВ).

одна из проанализированных последовательностей — 17126_1 из транскриптома *Scrippsiella trochoidea* — имеет селективный фильтр с заменой заряженного глутамата на незаряженный глутамин в домене II: E/Q/E/E (рис. 2, а; см. таблицу).

Структура сегментов S4. Анализ первичной структуры 24 аминокислотных последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят показал, что некоторые последовательности сегментов S4 ЧД-ПКК этих организмов имеют структуру, обедненную лизином и аргинином. К ним относятся последовательность 47759_1 из транскриптома *Prorocentrum minimum* и последовательность 29873_1 из транскриптома *Amphidinium carterae*. Последовательность *P. minimum* в доменах I и IV имеет сегменты S4, обедненные положительными зарядами. Последовательность *A. carterae* содержит аналогичный сегмент S4 только в домене I (рис. 2, б; см. таблицу).

Информации о первичной структуре сегмента S4 домена I последовательностей 20998_1 *P. minimum* и 406971_1 *Alexandrium tamarense* получено не было, так как домены I этих последовательностей представлены в транскриптомах лишь частично, начиная с внеклеточных петель между сегментами S4—S5.

Остальные 20 последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят имеют сегменты S4, богатые лизином и аргинином во всех четырех доменах (рис. 2, б; см. таблицу). В ряде последовательностей отмечено присутствие остатков гистидина, которые также несут положительные заряды.

Первичная структура области инактивационных ворот. Для того чтобы определить вероятную способность ЧД-ПКК динофлагеллят к быстрой инактивации по типу каналов Na_v, был предпринят анализ первичной структуры их последовательностей в области, гомологичной области инактивационных ворот каналов Na_v. На основании проведенного анализа все последовательности были разбиты на 6 групп в соответствии с первичной структурой данного участка (см. таблицу).

1. Установлено, что половина (12 из 24) проанализированных аминокислотных последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят имеет мотив, близкий по строению к инактивационным воротам натриевых каналов в гомологичном участке. У 11 из них «инактивационная частица» представлена триплетом гидрофобных аминокислотных остатков, подобно каналам подсемейства Na_v. Еще одна последовательность 47759_1 из транскриптома *P. minimum* в первом положении триплета имеет не гидрофобный, но при этом неполярный остаток глицина. Четвертое положение в составе инактивационных ворот всех этих последовательностей занимает остаток «канонического» треонина (в 11 из 12 случаев) или серина (в 1 из 12 случаев), который, так же как и треонин, является полярной незаряженной аминокислотой. Таким образом, последовательность инактивационных ворот этой группы каналов имеет вид XXXT/S, где X — остаток незаряженной аминокислоты, обычно гидрофобной, что соответствует данным о структуре инактивационных ворот каналов Na_v (см. таблицу).

2. 5 из 24 аминокислотных последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят несут в составе триплета «инактивационной частицы» только 2 гидрофобных аминокислотных остатка, тогда как одна из трех позиций представлена остатком полярной незаряженной аминокислоты (серином или тирозином). Четвертое положение в составе инактивационных ворот занимает остаток треонина или серина (см. таблицу).

3. 2 последовательности имеют в составе триплета «инактивационной частицы» только один остаток гидрофобной аминокислоты. При этом две другие позиции занимают остатки полярных незаряженных аминокислот (треонина, цистеина и глутамина). Четвертое положение в составе инактивационных ворот занимает остаток треонина или серина (см. таблицу).

4. 3 из 24 аминокислотных последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят несут в составе триплета 2 остатка гидрофобных аминокислот, тогда как оставшаяся позиция занята остатком полярной заряженной аминокислоты (аспартата или лизина). В четвертом положении в составе инактивационных ворот находится остаток треонина или серина (см. таблицу).

5. 1 из 24 последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят имеет в составе триплета один остаток полярного заряженного глутамата, один остаток гидрофобного метионина и один остаток полярного незаряженного серина. В четвертом положении последовательности инактивационных ворот — серин (см. таблицу).

6. Самая дивергентная последовательность инактивационных ворот имеет вид DLLD, т. е. несет один заряженный аминокислотный остаток в составе «инактивационной частицы», а один остаток заряженной аминокислоты замещает консервативный для инактивационных ворот тирозин/серин в четвертом положении (см. таблицу).

Обсуждение

Селективный фильтр. Анализ первичной структуры 24 аминокислотных последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят выявил, что 23 из них имеют селективный фильтр вида E/E/E/E и 1 — селективный фильтр вида E/Q/E/E (рис. 2, а; см. таблицу). Селективный фильтр вида E/E/E/E характерен для многих кальциевых каналов, в том числе HVA Ca_v и NALCN животных, а также некоторых каналов Chlorophyta, Haptophyta, Phaeophyta, Oomycota, Bacillariophyta и Ciliata (Liebeskind et al., 2012). Известно, что ЧД-ПКК с таким фильтром обладают различной степенью селективности в отношении ионов кальция (Verret et al., 2010). Так, каналы из подсемейства HVA Ca_v характеризуются строгой селективностью в отношении Ca²⁺ (Hille, 2001), а каналы подсемейства NALCN с фильтром E/E/E/E демонстрируют небольшое предпочтение к этим ионам и в физиологических условиях функционируют как кальциевые каналы (Senatore et al., 2013). Кроме того, показано, что каналы Na_v2, для которых характерен селективный фильтр вида D/E/E/A, также являются кальциевыми каналами, хотя и не имеют строгой селективности к этим ионам (Barzilai et al., 2012).

Каналы подсемейства Cch, которые функционируют в клетках грибов как депоуправляемые кальциевые каналы, имеют селективные фильтры Q/E/E/E, N/E/E/E или E/D/E/D (Hong et al., 2010; Liebeskind et al., 2012). По-видимому, наличие отрицательно заряженного остатка глутамата (E) в положениях II и III является необходимым условием кальциевой селективности ЧД-ПКК. Так, на примере Na_v2 квидарии *Nematostella vectensis* было показано, что замена одного из глутаматов (E) в доменах II или III на остаток положительно заряженного лизина (K) приводила к появлению селективности в отношении ионов натрия (Barzilai et al., 2012). Кроме того, известно, что каналы Na_v1, имеющие селективный фильтр D/E/K/A,

являются каналами со строгой избирательностью к ионам натрия, а каналы подсемейства NALCN с селективным фильтром E/K/E/E или E/E/K/E функционируют в нервной системе животных как преимущественно натриевые каналы (Liebeskind et al., 2013; Senatore et al., 2013). Таким образом, преобладание остатков глутамата в селективном фильтре ведет к возникновению кальциевой селективности, а появление остатка лизина во II или III положении — к возникновению натриевой селективности у каналов семейства ЧД-ПКК.

Примечательно, что однодоменные потенциалуправляемые натриевые каналы бактерий NaChBac имеют пору с селективным фильтром E/E/E/E, характерным для ЧД-ПКК с кальциевой селективностью, и при этом являются натрий-селективными каналами (Martinac et al., 2008). Однако в отличие от селективных фильтров ЧД-ПКК селективный фильтр NaChBac сформирован остатками глутамата от каждой из четырех однодоменных субъединиц. В настоящее время известно, что, хотя и NaChBac, и Na_v являются потенциал-управляемыми натриевыми каналами, они представляют собой весьма отдаленные линии эволюции каналов суперсемейства ПКК, а их селективность, вероятно, имеет различную природу (Liebeskind et al., 2013).

Данные о взаимосвязи структуры селективного фильтра и специфической избирательности ионных каналов у различных организмов позволяют сделать вывод о том, что 24 последовательности ЧД-ПКК динофлагеллят, исследованные в настоящей работе, вероятнее всего, формируют кальциевые каналы. По аналогии с четырехдоменными каналами многоклеточных животных и грибов, большинство из которых являются кальциевыми каналами, они могут обладать как строгой селективностью к ионам кальция, подобно каналам HVA Ca_v , так и очень слабой селективностью, подобно каналам NALCN.

Структура сегментов S4. Сегмент S4, или сенсор напряжения, — это один из шести трансмембранных сегментов каждого из четырех доменов ЧД-ПКК. Часто этот сегмент богат остатками положительно заряженных аминокислот аргинина и лизина. Изменения в электрическом поле, которые происходят при деполаризации мембраны, приводят в движение эти положительные заряды, а вместе с ними и весь сегмент. Изменения в положении сегмента S4 посредством конформационного сопряжения влекут за собой открытие поры канала. В настоящее время считается, что отсутствие чувствительности к изменениям мембранного потенциала у каналов подсемейств NALCN и Sсh связано с обедненностью их сегментов S4, в первую очередь сегмента S4 домена IV, остатками аргинина и лизина (Liu et al., 2006; Lu et al., 2007; Liebeskind et al., 2012).

Среди 24 аминокислотных последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят, проанализированных в настоящей работе, присутствуют последовательности как с лизин/аргинин-богатыми, так и с лизин/аргинин-обедненными сегментами S4 в одном или двух доменах (рис. 2, а; см. таблицу). Это свидетельствует о том, что каналы семейства ЧД-ПКК динофлагеллят могут быть как потенциалуправляемыми, подобно каналам подсемейств HVA Ca_v , LVA Ca_v и Na_v , так и потенциалнеуправляемыми, подобно каналам подсемейств NALCN и Sсh. На примере видов *P. minimum* и *A. carterae* показано, что в клетке этих жгутиконосцев могут функционировать оба типа каналов, что также характерно для клеток электровозбудимых тканей многоклеточных животных.

Первичная структура области инактивационных ворот. Долгое время считалось, что наличие инактивационных ворот, отвечающих за быструю инактивацию, характерно исключительно для каналов Na_v , где их первичная структура имеет вид IFMT. Однако последние исследования показали, что для ряда представителей отдаленных линий ЧД-ПКК, также обладающих быстрой инактивацией, характерны инактивационные ворота с иной структурой: LFVT, VFVT, TIMS (Chlorophyta), VLVT (Phaeophyta) и AAMT (Haptophyta) (Liebeskind et al., 2012). Таким образом, консенсусный мотив инактивационных ворот может быть описан как XXXT/S, где X — незаряженная гидрофобная аминокислота. Полагают, что именно гидрофобные взаимодействия, в которых участвует триплет XXX, играют важную роль в докинге инактивационных ворот при инактивации канала (Goldin, 2003).

Анализ участка, гомологичного инактивационным воротам ЧД-ПКК, показал значительное разнообразие структуры данной области канала у динофлагеллят (см. таблицу). Многие последовательности ЧД-ПКК динофлагеллят имеют канонический мотив инактивационных ворот вида XXXT/S. Среди последовательностей четырехдоменных каналов *P. minimum* к ним также может быть отнесена последовательность 47759_1 с мотивом GMLT, где в первом положении находится остаток глицина, который не является гидрофобной аминокислотой. Глицин — это неполярная аминокислота, не имеющая бокового радикала, поэтому, вероятнее всего, она не оказывает значительного влияния на гидрофобные взаимодействия при докинге инактивационных ворот.

Важно отметить, что часть последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят имеет неканонический мотив в области, гомологичной инактивационным воротам. Наличие полярных и в особенности заряженных аминокислотных остатков в исследуемых мотивах ставит под сомнение их участие в процессе быстрой инактивации, а следовательно, и саму способность соответствующих ЧД-ПКК динофлагеллят к быстрой инактивации по типу каналов Na_v . Так, структура гомологичного участка последовательности 17126_1 *S. trochoidea* имеет вид DLLD и несет заряженные аминокислотные остатки в первом и четвертом положениях. Это сближает данную последовательность с каналами подсемейства HVA Ca_v , для которых характерно отсутствие механизма быстрой инактивации (Liebeskind et al., 2012). Таким образом, анализ первичной структуры мотивов, гомологичных участкам инактивационных ворот каналов Na_v , выявил существенное разнообразие в их структуре среди последовательностей ЧД-ПКК динофлагеллят.

Заключение. Кальциевые и натриевые каналы семейства ЧД-ПКК хорошо известны как каналы, ответственные за инициацию потенциала действия у клеток многоклеточных животных и ряда одноклеточных эукариот (Hille, 2001; Martinac et al., 2008). У Metazoa ЧД-ПКК, выполняющие эту функцию, относятся к подсемействам Na_v и HVA Ca_v . Каналы подсемейств LVA Ca_v и NALCN участвуют в пейсмекерной и ритмической активности нейронов, а каналы LVA Ca_v , кроме того, опосредуют вход Ca^{2+} при негативных значениях мембранного потенциала (Jegla et al., 2009). Представители еще одного подсемейства ЧД-ПКК опистхонты — каналы Sсh — являются депоуправляемыми кальциевыми каналами грибов, опосредующими вход Ca^{2+} в ответ на опустошение его внутриклеточных депо (Hong et al., 2010). Таким образом, разные

подсемейства ЧД-ПКК опистоконт выполняют различный набор функций. Тогда как грибы обладают только одним подсемейством ЧД-ПКК — Cch, большинство групп животных имеют четыре функционально различных подсемейства (Na_v, HVA Ca_v, LVA Ca_v и NALCN) (Jegla et al., 2009; Liebeskind et al., 2012).

В настоящей работе с помощью биоинформатического анализа первичной структуры функционально значимых участков ЧД-ПКК было показано, что идентифицированные аминокислотные последовательности ЧД-ПКК динофлагеллят формируют: 1) катионные каналы с селективным фильтром, характерным для кальциевых каналов; 2) каналы с сегментами S4, характерными для потенциалуправляемых каналов; 3) каналы с сегментами S4, характерными для потенциалнеуправляемых каналов; 4) каналы, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, свидетельствует о возможности быстрой инактивации; 5) каналы, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, нехарактерна для каналов с быстрой инактивацией. Таким образом, разнообразие структурно-функциональных подтипов ЧД-ПКК динофлагеллят оказывается сопоставимым с разнообразием этих каналов у многоклеточных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10116).

Список литературы

- Околюдов Ю. Б. 2011. Dinoflagellata. В кн.: Протисты: Руководство по зоологии. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК. 3 : 7—94. (Okolodkov Yu. B. 2011. Dinoflagellata. In: Protists: Guide book in zoology. St. Petersburg; Moscow: KMK. 3 : 7—94.)
- Поздняков И. А., Скарлато С. О. 2015. Анализ транскриптома динофлагеллят *Prorocentrum minimum*: идентификация представителей суперсемейства потенциалуправляемых катионных каналов. Цитология. 57 (7) : 533—543. (Pozdnyakov I. A., Skarlato S. O. 2015. Analysis of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* transcriptome: Identifying the members of the voltage-gated cation channels superfamily. Cell Tissue Biol. 9 (6) : 483—492.)
- Barzilai M. G., Reitzel A. M., Kraus J. E., Gordon D., Technau U., Gurevitz M., Moran Y. 2012. Convergent evolution of sodium ion selectivity in metazoan neuronal signaling. Cell Reports. 2 : 242—248.
- Finn R. D., Coggill P., Eberhardt R. Y., Eddy S. R. et al. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucl. Acids Res. 44 : 279—285.
- Goldin A. L. 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. Curr. Opin. Neurobiol. 13 : 284—290.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41 : 95—98.
- Hille B. 2001. Ion channels of excitable membranes. 3rd ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc. 814 p.
- Hong M. P., Vu K., Bautos J., Gelli A. 2010. Cch1 restores intracellular Ca²⁺ in fungal cells during endoplasmic reticulum stress. J. Biol. Chem. 285 : 10 951—10 958.
- Jegla T. J., Zmasek C. M., Batalov S., Nayak S. K. 2009. Evolution of the human ion channel set. Combinat. Chem. High Throughput Screening. 12 : 2—23.
- Katoh K., Standley D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30 : 772—780.
- Keeling P. J. et al. 2014. The marine microbial eukaryote transcriptome sequencing project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. PLoS Biol. 12 : e1001889.
- Liebeskind B. J., Hillis D. M., Zakon H. H. 2011. Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 108 : 9154—9159.
- Liebeskind B. J., Hillis D. M., Zakon H. H. 2012. Phylogeny unites animal sodium leak channels with fungal calcium channels in an ancient, voltage-insensitive clade. Mol. Biol. Evol. 29 : 3613—3616.
- Liebeskind B. J., Hillis D. M., Zakon H. H. 2013. Independent acquisition of sodium selectivity in bacterial and animal sodium channels. Curr. Biol. 23 : 948—949.
- Liu M., Du P., Heinrich G., Cox G. M., Gelli A. 2006. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. Eukaryot. Cell. 5 : 1788—1796.
- Lu B., Su Y., Das S., Liu J., Xia J., Ren D. 2007. The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. Cell. 129 : 371—383.
- Martinac B., Saimi Y., Kung C. 2008. Ion channels in microbes. Physiol. Rev. 88 : 1449—1490.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics. 28 : 1166—1167.
- Pozdnyakov I., Matantseva O., Negulyaev Y., Skarlato S. 2014. Obtaining spheroplasts of armored dinoflagellates and first single-channel recordings of their ion channels using patch-clamping. Mar. Drugs. 12 : 4743—4755.
- Senatore A., Monteil A., van Minnen J., Smit A. B., Spafford J. D. 2013. NALCN ion channels have alternative selectivity filters resembling calcium channels or sodium channels. PLoS ONE. 8 : e55088.
- Verret F., Wheeler G., Taylor A. R., Farnham G., Brownlee C. 2010. Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium-based signaling. New Phytol. 187 : 23—43.
- Wang D. Z. 2008. Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. Mar. Drugs. 6 : 349—371.

Поступила 20 VI 2016

FUNCTIONAL DETERMINANTS OF FOUR-DOMAIN VOLTAGE-GATED CATION CHANNELS IN DINOFLAGELLATES. BIOINFORMATIC ANALYSIS

I. A. Pozdnyakov,¹ S. O. Skarlato

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;
* e-mail: pozdnyakov@cytspb.rssi.ru

The emergence and evolution of the four-domain (FD) voltage-gated cation channel (VGCC) family is tightly related to the diversity of eukaryotic excitable membranes, including the neuron membranes of metazoans. Currently, understanding of the FD-VGCC evolution is substantially complicated by the extremely limited data

on FD-VGCC of unicellular eukaryotes (protists). Among the groups understudied in this respect are dinoflagellates — protists that play an important ecological, toxicological and pharmacological role. In the present work, we have identified the amino acid sequences of FD-VGCC comprising all four structural domains in the translated transcriptomes of nine dinoflagellate species. In order to reveal the functional diversity of dinoflagellate FD-VGCC, we applied bioinformatic tools and investigated the primary structure of the functional determinants characteristic to these channels: selectivity filter, segments S4, and the region homologous to the inactivation gates. Based on this analysis we conclude that FD-VGCC of dinoflagellates contain: 1) cation channels with a selectivity filter typical to calcium channels; 2) cation channels with a segment S4 typical to voltage-gated channels; 3) cation channels with a segment S4 typical to voltage-insensitive channels; 4) cation channels with the inactivation gates region typical to the channels with fast inactivation; 5) cation channels with the inactivation gates region not typical to the channels with fast inactivation. Our data show that the structural diversity of functionally relevant regions of FD-VGCC in dinoflagellates is similar to that in metazoans.

Key words: dinoflagellates, ion channels, unicellular eukaryotes, voltage-gated ion channels.
