

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ *PROROCENTRUM MINIMUM*: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫХ КАТИОННЫХ КАНАЛОВ

© И. А. Поздняков,¹ С. О. Скарлато

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ электронный адрес: pozdneyakov@cytspb.rssi.ru

Динофлагелляты представляют собой важную в экологическом отношении группу водных эукариотных микроорганизмов. Однако многие функциональные особенности этих протистов, определяющие их роль в природе, в настоящее время остаются малоизученными. Практически полное отсутствие данных о разнообразии и структурно-функциональных характеристиках ионных каналов динофлагеллят во многом затрудняет интерпретацию физиологических реакций и адаптаций этих микроорганизмов. В настоящей работе выполнен анализ транслированных транскриптомных баз данных двух штаммов динофлагеллят *Prorocentrum minimum* с целью идентифицировать представителей суперсемейства потенциалуправляемых катионных каналов. В результате у этих потенциально токсичных для человека и животных микроорганизмов были выявлены следующие гомологи: 1) калиевых каналов входящего выпрямления (K_{ir}); 2) потенциалуправляемых калиевых каналов (K_v); 3) кальцийактивируемых калиевых каналов (K_{Ca}); 4) каналов, управляемых циклическими нуклеотидами (EAG и HCN/CNG); 5) каналов TRPV и TRPP; 6) двухпоровых кальциевых каналов TPC; 7) потенциалуправляемых натриевых (Na_v) и кальциевых (Ca_v) каналов; 8) потенциалуправляемых протонных каналов (H_v).

Ключевые слова: одноклеточные эукариоты, протисты, динофлагелляты, ионные каналы, транскриптом.

Принятые сокращения: а.о. — аминокислотные остатки, Ank — анкириновый домен, BK — калиевые каналы большой проводимости, Ca_v — потенциалуправляемые кальциевые каналы, CNBD — домен, связывающий циклические нуклеотиды, CNG — каналы, управляемые циклическими нуклеотидами, EAG — каналы семейства ether-a-go-go, K_{2P} — калиевые каналы утечки, HCN — каналы, управляемые циклическими нуклеотидами, активирующиеся при гиперполяризации, K_{Ca} — кальцийзависимые калиевые каналы, K_{ir} — калиевые каналы входящего выпрямления, K_v — потенциалуправляемые калиевые каналы, NALCN — натриевые каналы утечки, Na_v — потенциалуправляемые натриевые каналы, P-loop — поровая петля, VSD — потенциал-чувствительный домен.

Динофлагелляты — группа одноклеточных эукариотных микроорганизмов, играющая важную роль в функционировании водных экосистем. Эти протисты известны своей способностью к синтезу большого числа вторичных метаболитов различной химической природы, большинство из которых токсично для позвоночных животных, включая человека. Многие виды динофлагеллят способны к вспышкам размножения, приводящим к так называемому цветению воды («красные приливы»). Цветение токсичных видов приводит к накоплению токсичных веществ в моллюсках, рыбе и других водных животных, что наносит значительный вред промысловому хозяйству, здоровью человека и, следовательно, экономике прибрежных регионов в целом (Cembella, 2003; Околовцов, 2011). Таким образом, динофлагелляты играют важную экологическую роль.

Динофлагелляты обладают рядом уникальных цитологических и биохимических особенностей, таких как: 1) постоянно конденсированные хромосомы в клеточном цикле; 2) особый тип закрытого митоза (диномитоз), при котором микротрубочки веретена располагаются

в каналах, пронизывающих делящееся ядро; 3) наличие одних из самых больших геномов среди эукариот (до 250 пг); 4) синтез особых стеролов (диностеролы); 5) способность к биолюминесценции; 6) способность сочетать авто- и гетеротрофию (миксотрофия); 7) наличие сложно устроенных хлоропластов, являющихся результатом третиного эндосимбиоза и др. (Raikov, 1995; Soyer-Gobillard et al., 1999; Околовцов, 2011; Figueroa et al., 2014). Вместе с тем многие аспекты физиологии этих микроорганизмов до сих пор остаются малоизученными, что во многом затрудняет понимание экологического и токсикологического влияния динофлагеллят на окружающую среду, а также интерпретацию накопленных данных по биологии этой во многом уникальной группы протистов.

Роль ионных каналов в широком спектре физиологических процессов животных и растительных клеток хорошо описана в литературе (Hille, 2001; Крутецкая и др., 2003; Зефирова, Ситдикова, 2010). Являясь участниками первых этапов восприятия клеткой различных по природе сигналов, эти трансмембранные белковые комплексы вовлечены в процессы адаптации, пролиферации, диффе-

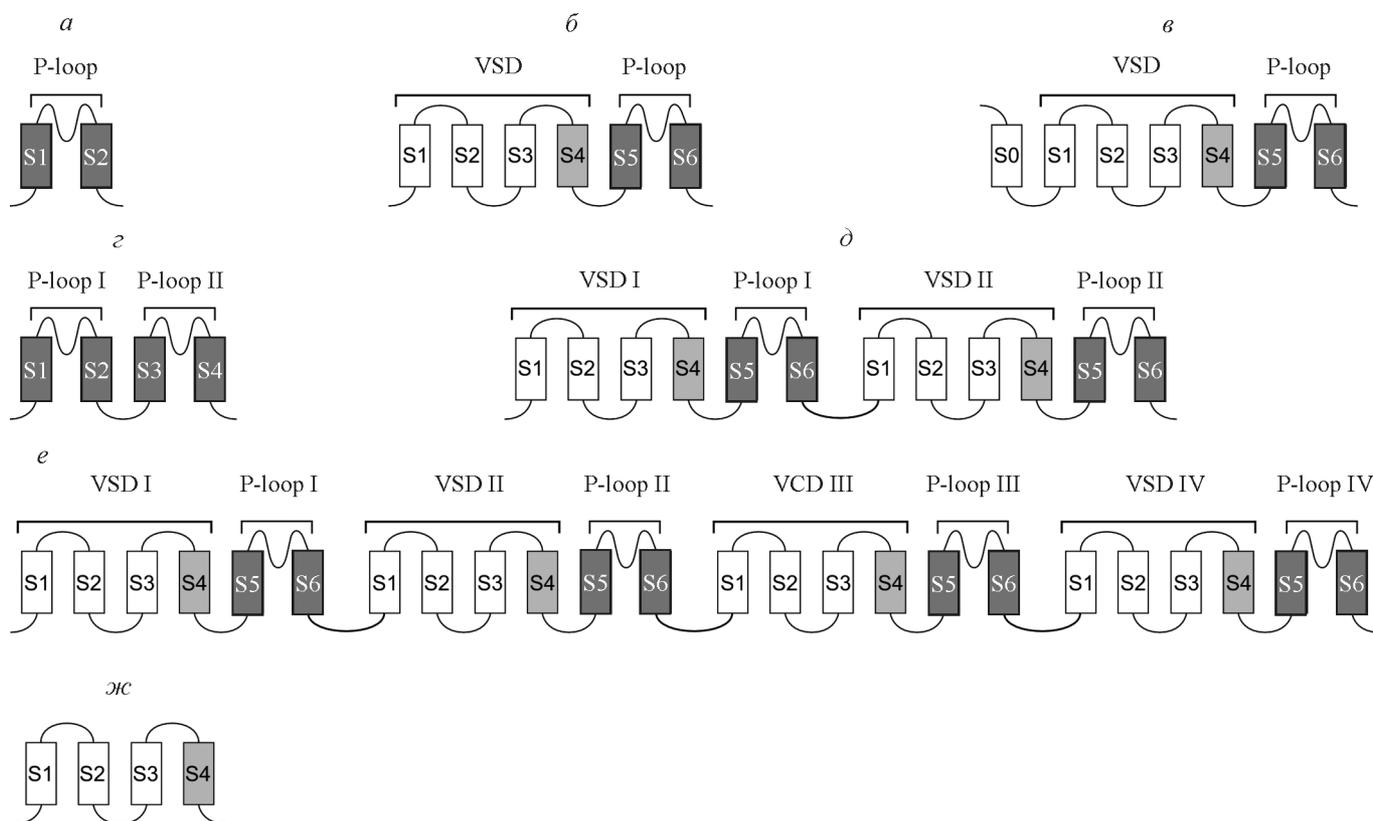


Рис. 1. Общая схема структурной организации ионных каналов суперсемейства потенциалуправляемых катионных каналов: калиевого канала входящего выпрямления K_{ir} (а), потенциалактивируемого калиевого канала K_v , каналов EAG, HCN/CNG и TRP (б), кальцийзависимого калиевого канала K_{Ca} (в), калиевых каналов утечки K_{2p} (г), потенциалактивируемых кальциевых Ca_v , натриевых Na_v и NALCN-каналов (е) потенциалактивируемого протонного канала H_v (ж).

P-loop — поровая петля, VSD — потенциал-чувствительный домен, S0—S6 — трансмембранные сегменты, I—IV — порядковые номера доменов.

ренцировки и подвижности клеток, экзо- и эндоцитоз и др. Несмотря на то что ионные каналы динофлагеллят изучены недостаточно полно, можно предположить их важную физиологическую роль и для этой группы эукариот. В частности, у динофлагеллят *Noctiluca miliaris* описаны потенциалуправляемые токи натрия, протонов и хлора, обеспечивающие развитие потенциала действия (Eckert, Sibaoka, 1968; Oami et al., 1990).

По нашему мнению, крайне ограниченное количество данных в литературе об ионных каналах динофлагеллят связано с трудностями применения метода локальной фиксации потенциала на мембране (patch clamp) при работе с ними. Этот метод в настоящее время является одним из наиболее мощных инструментов для изучения функционирования ионных каналов (Sakmann, Neher, 2009). Метод предполагает образование плотного контакта между регистрирующей стеклянной микропеткой и мембраной клетки (Molleman, 2003), что оказывается невозможным в случае интактных клеток динофлагеллят, многие из которых обладают сложными армированными покровами (Morrill, Loeblich, 1983; Pozdnyakov, Skarlato, 2012). Ранее нами был разработан метод получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят *Prorocentrum minimum*, который впервые позволил регистрировать одиночные ионные каналы в мембране этих микроорганизмов (Pozdnyakov et al., 2014). Для дальнейшей идентификации молекулярной природы зарегистрированных на электрофизиологическом уровне

ионных каналов необходим анализ транскриптома динофлагеллят *P. minimum*.

Большинство известных семейств ионных каналов прокариот и эукариот объединено в так называемое суперсемейство потенциалуправляемых катионных каналов. Поскольку основаниями для выделения данного суперсемейства являются гомология аминокислотных последовательностей каналов и их доменная организация, важно отметить, что не все его представители в действительности активируются при изменении мембранного потенциала. Само же название «потенциалуправляемые катионные каналы» указывает лишь на то, что исторически первыми описанными ионными каналами из этой группы стали каналы, действительно активирующиеся при сдвигах мембранного потенциала (Hille, 2001; Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009).

На рис. 1 представлены варианты структурной организации, характерные для представителей различных семейств ионных каналов, относящихся к суперсемейству потенциалуправляемых катионных каналов. Общая структурная единица для большинства представителей данного суперсемейства — два трансмембранных сегмента с поровой петлей (P-loop) между ними (рис. 1, а—е). У многоклеточных животных (Metazoa) к каналам с такой организацией относятся калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}) (рис. 1, а) (Jegla et al., 2009).

Большая группа ионных каналов, включающая в себя несколько семейств, имеет дополнительный потенциал-чувствительный домен (voltage-sensitive domain, VSD),

состоящий из четырех трансмембранных сегментов S1—S4. Сегмент S4, богатый остатками аргинина и лизина, выполняет функцию сенсора напряжения у каналов, активирующихся при изменении мембранного потенциала (рис. 1, б). К каналам с такой доменной организацией относятся потенциалуправляемые калиевые каналы (K_v), два семейства каналов, управляемых циклическими нуклеотидами (ether-a-go-go-like channels — EAG и hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated/cyclic nucleotide-gated channels — HCN/CNG), крупное семейство катионных каналов TRP (transient receptor potential channels) и кальцийзависимые калиевые каналы (K_{Ca}), имеющие в N-концевой области дополнительный трансмембранный сегмент S0 (рис. 1, в). Домен с сегментами S1—S6 образует одну субъединицу ионного канала, функционирующего в клеточной мембране как тетрамер. С-концевой участок всех этих каналов несет ряд дополнительных доменов, выполняющих функции гомо- и гетеротетрамеризации канальных субъединиц, а также функцию связывания различных вторичных посредников (Hille, 2001; Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009). Кроме того, для клеток животных характерно наличие двухпоровых калиевых каналов (K_{2P}), представляющих собой удвоенную структуру S1—P-loop—S2, каждая из которых гомологична каналам K_{ir} (рис. 1, з) (Jegla et al., 2009).

Многочелюстные животные обладают так называемыми двухпоровыми кальциевыми каналами (two-pore calcium channels, TPC), субъединицы которых образованы двумя доменами [S1—S6] (рис. 1, д), каждый из которых гомологичен каналам K_v (Jegla et al., 2009). В то же время существует группа четырехдоменных ионных каналов, субъединица которых образована четырьмя гомологичными доменами [S1—S6] (рис. 1, е). К таким каналам относятся потенциалуправляемые кальциевые (Ca_v) и потенциалуправляемые натриевые (Na_v) каналы (Hille, 2001), а также натриевые каналы утечки (Na^+ -leak channels, NALCN) (Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009). Особую группу каналов представляют собой потенциалуправляемые протонные каналы (H_v). Субъединицы этих каналов образованы лишь одним доменом [S1—S4], гомологичным VSD (рис. 1, ж) (DeCoursey, 2008; Jegla et al., 2009).

В настоящей работе проанализированы транскрипированные транскриптоммы *P. minimum* (штаммы CCMP1329 и CCMP2233), доступные в базе данных Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project (MMETSP; <http://data.imicrobe.us/project/view/104>), с целью идентификации у этого вида динофлагеллят представителей различных семейств ионных каналов, объединяемых в суперсемейство потенциалуправляемых катионных каналов.

Материал и методика

Транскриптомные базы данных. В работе использовали транскрипированные транскриптомные базы данных для штаммов *P. minimum* CCMP1239 (транскриптом *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329) и CCMP2233 (транскриптом *Prorocentrum-minimum*-CCMP2233), доступные на сайте проекта Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project (MMETSP; <http://data.imicrobe.us/project/view/104>, Combined Assemblies; Keeling et al., 2014).

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 аминокислотные последовательности человека из базы данных белковых последовательностей National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Параметр E-value для всех выбранных результатов запроса составлял $<10^{-10}$.

Выравнивание аминокислотных последовательностей. 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 Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). В настоящее время в базе NCBI представлено около 10 000 аминокислотных последовательностей, принадлежащих суперсемейству потенциалуправляемых катионных каналов. Для множественного выравнивания были взяты аминокислотные последовательности ионных каналов Metazoa (*Anopheles darlingi*, *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster* и *Homo sapiens*). Кроме того, в качестве иллюстрации широкого распространения конкретного семейства гомологов среди различных организмов были выбраны последовательности растений (*Arabidopsis thaliana*), зеленых водорослей (*Chlamydomonas reinhardtii*), инфузорий (*Tetrahymena thermophila*), динофлагеллят (*Karlodinium veneficum*) и бактерий (*Burkholderia cenocepacia* и *Escherichia coli*).

Идентичность участков двух гомологичных последовательностей оценивали с помощью программы SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) как процентное отношение числа идентичных аминокислотных остатков к длине наиболее короткой из выровненных последовательностей.

Результаты

Анализ транскрипированных транскриптомов динофлагеллят *P. minimum* выявил аминокислотные последовательности, гомологичные большинству известных к настоящему времени типов ионных каналов, относящихся к суперсемейству потенциалуправляемых катионных каналов (см. таблицу).

Найденные у *P. minimum* гомологи каналов с двумя трансмембранными сегментами K_{ir} в области поровой петли содержат сигнатуру GYG, характерную для большинства калиевых каналов других живых организмов (рис. 2, а). При этом идентичность аминокислотных последовательностей K_{ir} -каналов *H. sapiens* (445 а. о.) и *P. minimum* (690 а. о.) составляет 27 % (445 а. о. — размер сравниваемого фрагмента выравнивания здесь и далее).

Однодоменные каналы. Гомологи каналов K_v (рис. 2, б), также имеющие характерную сигнатуру GYG, в обоих транскриптомах представлены последовательностями двух типов — длиной 400—600 а. о. и длиной порядка 1000 а. о. Если в последовательностях первой группы выявляется типичная для каналов K_v структурная организация (рис. 1, б), то доменная организация последовательностей второй группы представляет собой K_v с двумя гомологичными доменами [S1—S6] (100%-ная идентичность, 570 а. о.) (рис. 1, д). Идентичность с каналом K_v человека как последовательностей первой группы, так и каждого из доменов последовательностей второй группы составляет 24—25 %.

Транслированные последовательности генов ионных каналов различных семейств, выявленные в транскриптомах *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329 и *Prorocentrum-minimum*-CCMP2233

Семейство ионных каналов	Prorocentrum-minimum-CCMP1329		Prorocentrum-minimum-CCMP2233	
	номер последовательности	длина, а.о.	номер последовательности	длина, а.о.
K _{ir}	Не выявлено	—	35921_1	690
K _v (1)	51627_1	433	124306_1	365
K _v (2)	906_1	973	20439_1	985
K _{Ca}	52318_1	1118	2963_1	1204
EAG	263403_1	820	11858_1	814
HCN/CNG (1)	33715_1	744	35067_1	551
HCN/CNG (2)	258896_1	1163	14899_1	1363
K _{2P}	Не выявлено	—	Не выявлено	—
TRPV	42031_1	875	15802_1	904
TRPP	262008_1	1141	17215_1	1175
TPC	39996_1	827	16420_1	773
Ca ²⁺ /Na ⁺	259712_1	1533	40145_1	2087
NALCN	Не выявлено	—	Не выявлено	—
H _v	146776_1	288	128_1	291

Примечание. Представлены данные базы MMETSP (<http://data.imicrobe.us/project/view/104>, Combined Assemblies).

Важно отметить, что выявленные в транскриптом *P. minimum* последовательности канала K_v, содержащие два структурных домена [S1—S6], могут являться как результатом ошибки сборки транскриптомов, так и отражением реально произошедшей дупликации исходного гена у исследуемой группы эукариот. На данном этапе работы

достоверно (E-value порядка 10⁻³⁵) можно констатировать лишь наличие последовательностей каналов K_v в транскриптом *P. minimum*.

Сигнатуру GYG несут и последовательности (1100—1200 а. о.) каналов K_{Ca}, гомологичные кальцийактивируемым калиевым каналам большой проводимости (BK) Ме-

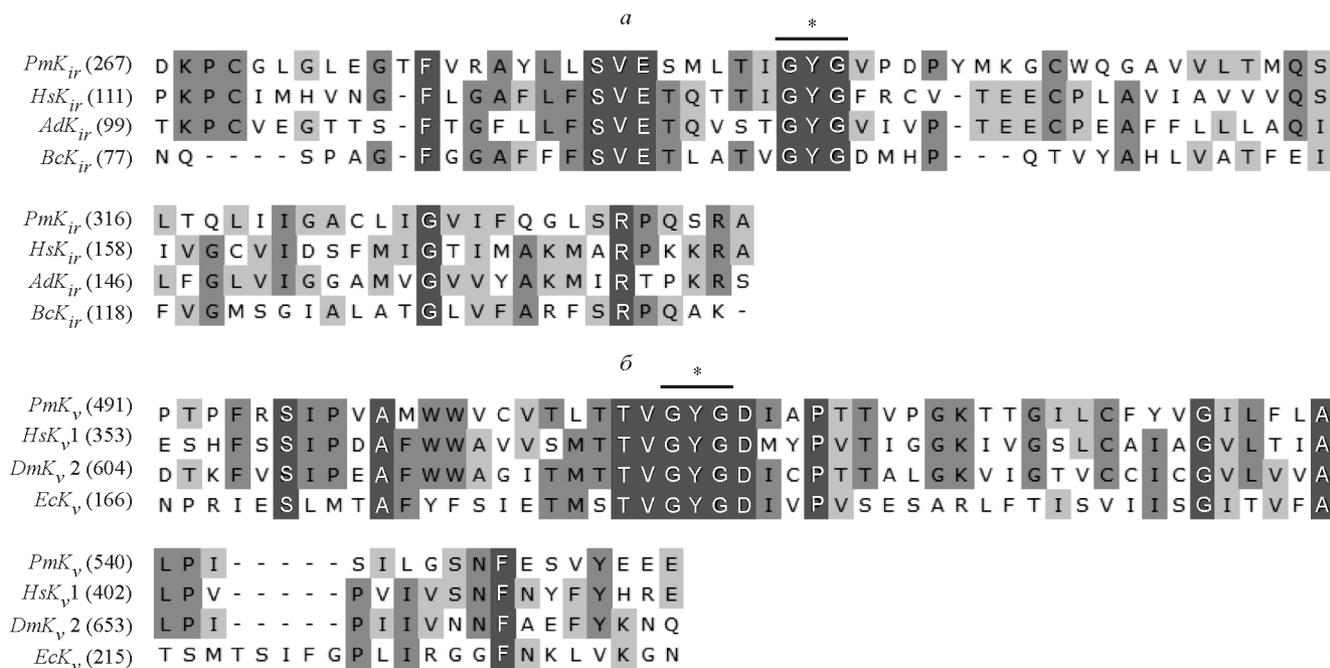


Рис. 2. Результаты множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей калиевых каналов входящего выпрямления K_{ir} (а) и потенциалактивируемых калиевых каналов K_v (б) разных видов организмов.

AdK_{ir} — *Anopheles darling* (NCBI: ETN66688.1), BcK_{ir} — *Burkholderia cenocepacia* (NCBI: EPZ91042.1), DmK_v — *Drosophila melanogaster* (NCBI: AAC33365.1), EcK_v — *Escherichia coli* (NCBI: CAR12756.1), HsK_{ir} — *Homo sapiens* (NCBI: AAA19962.1), HsK_v — *H. sapiens* (NCBI: NP_000208.2), PmK_{ir} — *Prorocentrum minimum* (Prorocentrum-minimum-CCMP2233, MMETSP: 35921_1), PmK_v — *P. minimum* (Prorocentrum-minimum-CCMP1329, MMETSP: 906_1). Звездочкой показана сигнатура GYG (здесь и на рис. 3, 4), в скобках — порядковый номер первого в ряду аминокислотного остатка (рис. 2—8). Интенсивность цвета отражает степень идентичности (рис. 2—8).

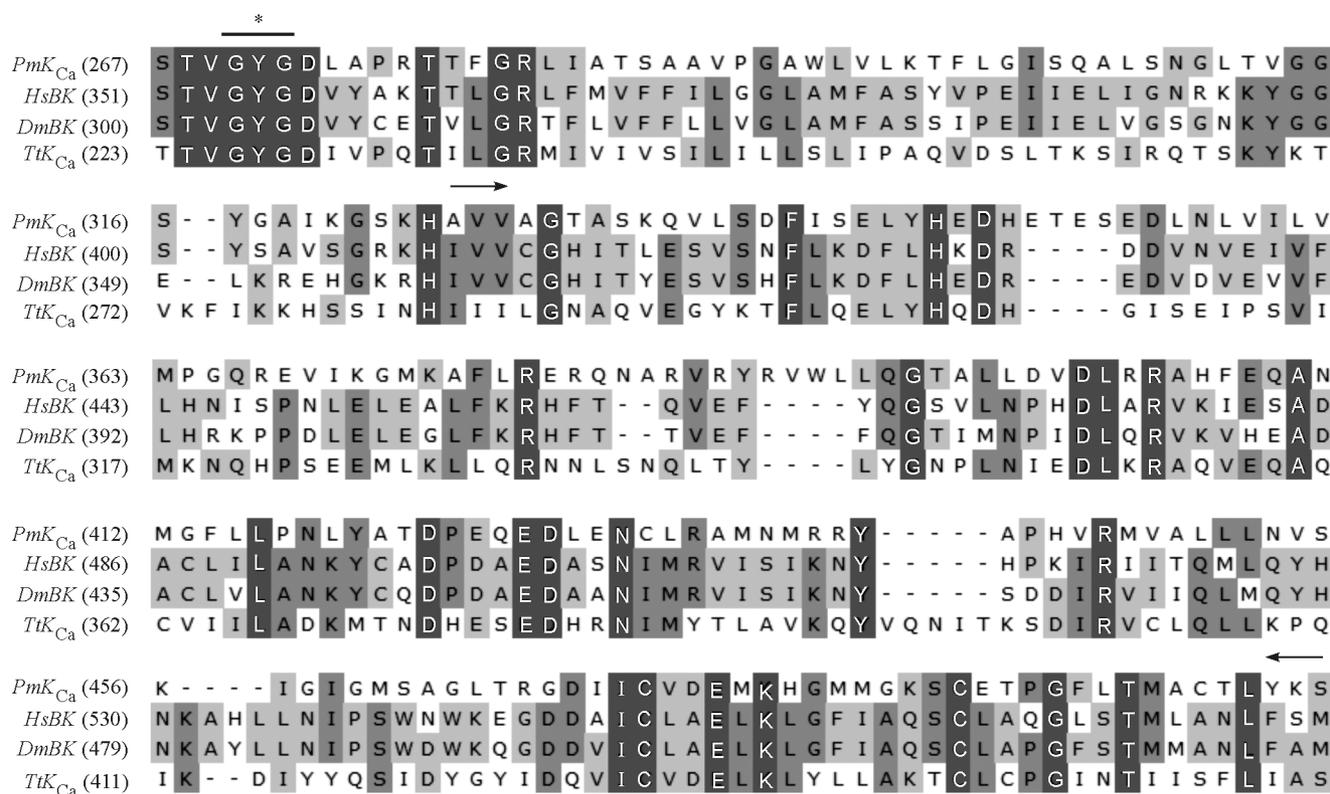


Рис. 3. Результат множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей кальцийзависимых калиевых каналов K_{Ca} разных видов организмов.

DmBK — *Drosophila melanogaster* (NCBI: Q03720.3), *HsBK* — *Homo sapiens* (NCBI: Q12791.2), *PmK_{Ca}* — *Prorocentrum minimum* (Prorocentrum-mini-mum-CCMP2233, MMETSP: 2963_1, *TiK_{Ca}* — *Tetrahymena thermophila* (NCBI: EAR88631.2). Стрелками обозначены границы RCK-домена.

tazoa (рис. 3). Так же как и каналы BK многоклеточных животных, канал K_{Ca} *P. minimum* в С-концевой области содержит домен RCK, участвующий во взаимодействии с ионами кальция. K_{Ca}-канал *P. minimum* идентичен BK-каналу человека (1236 а. о.) на 22 % (1204 а. о.) и имеет домен RCK длиной 180 а. о.

В транскриптом *P. minimum* были также обнаружены гомологи катионных каналов, управляемых циклическими нуклеотидами: EAG и HCN/CNG. Все эти каналы имеют в С-терминальном участке домен, связывающий циклические нуклеотиды (cyclic nucleotide binding domain, CNBD) (Craven, Zagotta, 2006; Vandenberg et al., 2012). В то время как калиевые каналы EAG многоклеточных животных несут сигнатуру GFG, последовательность *P. minimum* в гомологичном участке имеет характерный для большинства калиевых каналов вариант GYG (рис. 4). В последовательностях EAG *P. minimum* присутствует и домен CNBD длиной 180 а. о. При этом EAG *P. minimum* (около 800 а. о.) идентичен данному каналу *H. sapiens* (1159 а. о.) на 23 % (820 а. о.).

Семейство HCN/CNG у многоклеточных животных и сестринских им хоанофлагеллят состоит из двух очень близких подсемейств HCN и CNG, включающих в себя катионные неселективные каналы. При этом каналы HCN имеют сигнатуру GYG, что, по-видимому, обуславливает несколько большую их селективность в отношении ионов калия в сравнении с каналами CNG, которые этой последовательности не имеют (Craven, Zagotta, 2006). Найденные у *P. minimum* гомологи катионных каналов семейства HCN/CNG обладают той же сигнатурой GYG (рис. 4), что, вероятно, указывает на некоторую селективность об-

наруженных каналов к ионам калия. Домен CNBD занимает locus длиной 130 а. о. При этом, как и гомологи каналов K_v, последовательности, гомологичные каналам HCN и CNG, разделяются на две группы: последовательности, содержащие один структурный домен [S1—S6] (500—700 а. о.) (рис. 1, б), и последовательности, содержащие два домена [S1—S6] (1100—1300 а. о.) (рис. 1, д). Такое разделение также может быть следствием ошибки сборки обоих транскриптомов или же результатом дубликации исходного гена. Эти последовательности идентичны каналам HCN и CNG человека (600—900 а. о.) на 18—23 % (551—744 а. о.).

TRP-каналы — крупное семейство неселективных катионных каналов, отличающихся разнообразием механизмов активации. В настоящее время известно 8 подсемейств TRP-каналов животных — TRPA, TRPC, TRPP, TRPV, TRPN, TRPM, TRPML и TRPVL (Jegla et al., 2009). Доменная организация этих каналов схожа с организацией потенциалуправляемых калиевых каналов (рис. 1, б), однако домен, гомологичный VSD у K_v, не выполняет функцию сенсора напряжения. Кроме того, представители нескольких подсемейств (TRPA, TRPC, TRPV и TRPN) имеют от 2 до 20 анкириновых повторов (Ank) на N-терминальном участке (Li et al., 2011). В настоящей работе у *P. minimum* были выявлены последовательности (870—900 а. о.), гомологичные TRPV-каналам Metazoa, которые имеют Ank-домен длиной около 150 а. о. (рис. 5). Найденные последовательности идентичны TRPV5-каналу человека (729 а. о.) на 23 % (729 а. о.). В транскриптом *P. minimum* были также идентифицированы гомологи TRPP-каналов (1100 а. о.), не имеющие Ank-повторов.



Рис. 4. Результаты множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей каналов семейств EAG и HCN/CNG динофлагеллят *Prorocentrum minimum* и человека.

HsCNG — *Homo sapiens* (NCBI: AAA65619.1), *NsEAG* — *H. sapiens* (NCBI: Q12809.1), *HsHCN* — *H. sapiens* (NCBI: NP_066550.2), *PmEAG* — *Prorocentrum minimum* (MMETSP, *Prorocentrum minimum*-CCMP1329: 263403_1), *PmHCN/CNG* — *P. minimum* (MMETSP, *Prorocentrum minimum*-CCMP1329: 258896_1). Стрелками обозначены границы CNBD-домена.

Двух- и четырехдоменные каналы. В результате анализа транскриптома *P. minimum* были обнаружены гомологи TRP-каналов (770—830 а. о.), идентичные TRP-каналу человека (888 а. о.) на 22 % (827 а. о.) (рис. 6).

Кроме того, были найдены последовательности длиной 1500—2000 а. о., гомологичные каналам Ca_v и Na_v многоклеточных животных. Эти последовательности, принадлежащие семейству Ca_v/Na_v потенциалуправляемых каналов, имеют характерную четырехдоменную организацию. Идентичность каналов Ca_v/Na_v *P. minimum* и канала $Na_v1.1$ человека (2009 а. о.) составляет 22 % (2009 а. о.). При этом предполагаемый селективный фильтр, в образовании которого участвует по одному аминокислотному остатку из поровой петли каждого из четырех доменов, имеет вид E/E/E/E, характерный не для Na_v , а для каналов Ca_v L-типа млекопитающих. Сравнение тех же последовательностей *P. minimum* с каналами Ca_v L-типа человека (1977 а. о.) выявило идентичность, равную 21 % (1977 а. о.) (рис. 7, а—з). Следует отметить,

что выравнивание BLASTP последовательности NALCN человека против транслированных транскриптомов *P. minimum* дает те же гомологичные последовательности, что и для каналов Na_v и Ca_v L-типа. Однако первичная структура трансмембранного сегмента S4 каждого из четырех доменов, которые были найдены у *P. minimum*, оказалась близкой именно к структуре сегментов S4, характерной для семейства каналов Ca_v/Na_v (рис. 7, д).

Потенциалуправляемые протонные каналы (H_v) являются особой группой катионных каналов, поскольку каждая из четырех субъединиц канала H_v представляет собой домен с сегментами S1—S4, гомологичный VSD-домену канала K_v (Smith et al., 2011) (рис. 1, ж). Найденные последовательности (280—290 а. о.) на 20 % (273 а. о.) идентичны аминокислотной последовательности H_v -канала *H. sapiens* (273 а. о.) и на 26 % (248 а. о.) — последовательности канала H_v динофлагелляты *Karlodinium veneficum*, опубликованной в работе Смит и соавторов (248 а. о.) (Smith et al., 2011) (рис. 8).

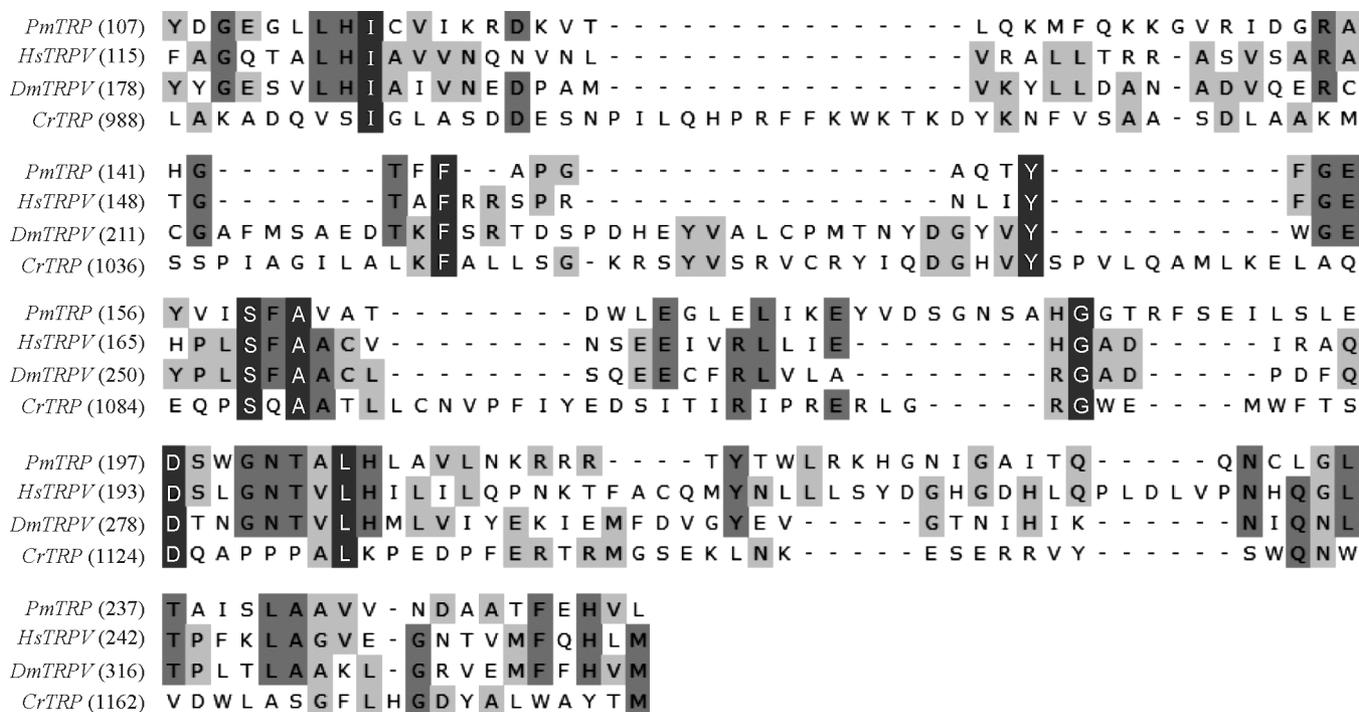


Рис. 5. Результаты множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей анкириновых доменов каналов семейства TRP разных видов организмов.

CrTRP — *Chlamydomonas reinhardtii* (NCBI: XP_001694631), *DmTRPV* — *Drosophila melanogaster* (NCBI: AAP57097.1), *HsTRPV* — *Homo sapiens* (NCBI: Q9NQA5.2), *PmTRP* — *Prorocentrum minimum* (MMETSP, Prorocentrum minimum-CCMP2233: 15802_1).

Обсуждение

Наиболее полная информация о наличии генов тех или иных типов ионных каналов у конкретного вида, а также об эволюции этих каналов может быть получена при анализе полностью секвенированных геномов соответствующих организмов. Однако в силу того, что динофлагелляты обладают одним из самых больших геномов, размер которого часто значительно превышает размер генома человека (Hackett et al., 2004), к настоящему времени геномы представителей рода *Prorocentrum* не секвенированы. Поэтому для поиска соответствующих генов у *P. minimum* исследователи обращаются к транскриптомным базам данных. Проведенный в настоящей работе анализ двух транскриптомов динофлагеллят *P. mi-*

nimum выявил наличие большинства семейств ионных каналов, объединяемых в суперсемейство потенциалуправляемых катионных каналов (см. таблицу).

Хотя найденные в транскриптоме *P. minimum* последовательности менее чем на 30 % идентичны гомологичным им последовательностям ионных каналов Metazoa (*H. sapiens*), они имеют все структурные мотивы, характерные для соответствующих семейств ионных каналов. Важно отметить, что значение статистического показателя E-value, характеризующего степень гомологии, во всех случаях меньше 10^{-10} , что является достаточным основанием для того, чтобы считать обнаруженные нами последовательности членами соответствующих семейств ионных каналов многоклеточных животных (Pearson, 2013).

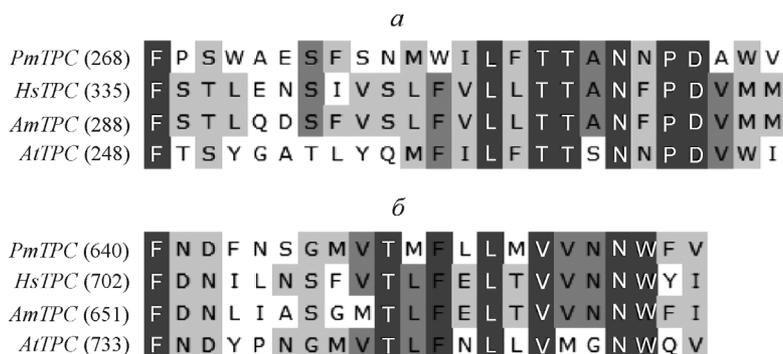


Рис. 6. Результаты множественного выравнивания участков поровой петли аминокислотных последовательностей первого (а) и второго (б) доменов каналов TPC разных видов организмов.

AmTPC — *Apis mellifera* (NCBI: NP_001201833.1), *AtTPC* — *Arabidopsis thaliana* (NCBI: NP_567258.1), *HsTPC* — *Homo sapiens* (NCBI: NP_001137291.2), *PmTPC* — *Prorocentrum minimum* (MMETSP, Prorocentrum minimum-CCMP2233: 16420_1).

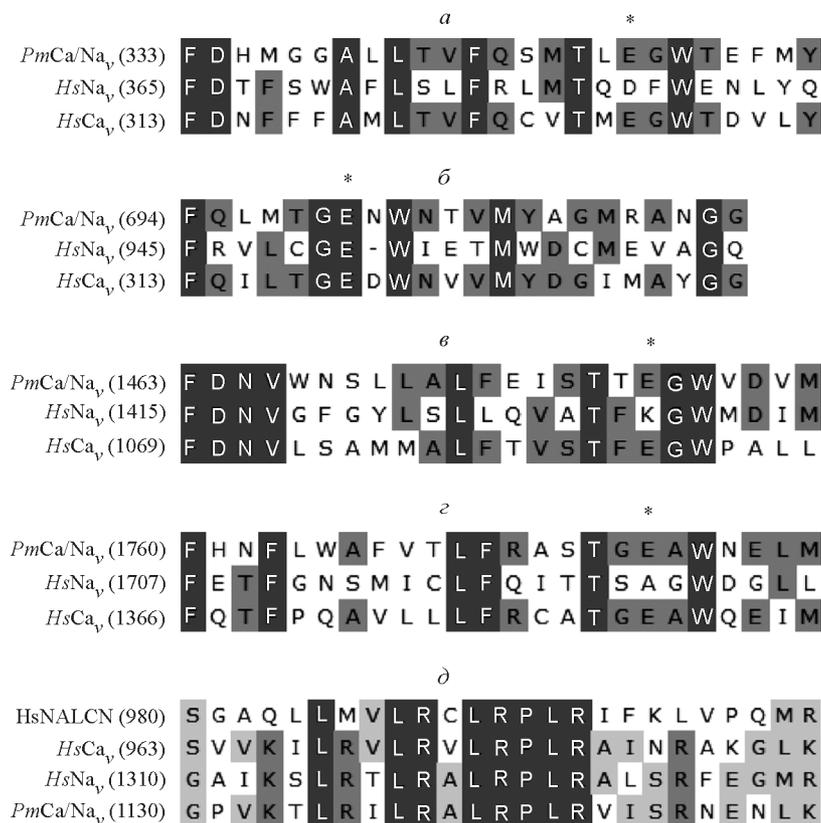


Рис. 7. Результаты множественного выравнивания участков поровой петли (а—г) и сегмента S4 (д) III домена аминокислотных последовательностей четырехдоменных потенциалактивируемых кальциевых Ca_v , натриевых Na_v и NALCN каналов человека и каналов Ca_v/Na_v динофлагелляты *Prorocentrum minimum*.

HsNALCN — *Homo sapiens* (NCBI: NP_443099.1), *HsCa_v* — *H. sapiens* (NCBI: AAF15290.1), *HsNa_v* — *H. sapiens* (NCBI: NP_001189364.1), *PmCa*/*Na_v* — *Prorocentrum minimum* (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP2233: 40145_1). Звездочка — аминокислотные остатки, составляющие селективный фильтр.

В настоящее время в литературе имеются лишь отрывочные сведения об ионных каналах динофлагеллят, полученные в результате электрофизиологических исследований. В этих работах было показано наличие потенциалуправляемых токов ионов Na^+ , H^+ и Cl^- у ночесветки *Noctiluca miliaris* (Eckert, Sibaoka, 1968; Oami et al., 1990), а также каналов H_v у *K. veneficum* (Smith et al., 2011). В свою очередь анализ транскриптомов *P. minimum* в настоящей работе выявил представителей по крайней мере десяти семейств ионных каналов (включая два подсемейства TRP-каналов).

Калиевые каналы K_{ir} , K_v , K_{Ca} и K_{2P} являются компонентами системы регуляции мембранного потенциала клетки (Hille, 2001; Зефиоров, Ситдикова, 2010). Присутствие всех типов калиевых каналов, за исключением K_{2P} , в транскриптом *P. minimum* позволяет предполагать наличие подобной системы контроля над мембранным потенциалом и у динофлагеллят. Следует отметить, что отсутствие в рассмотренных транскриптомах последова-

тельств, гомологичных K_{2P} , само по себе не является свидетельством отсутствия соответствующих последовательностей в геноме *P. minimum*.

В настоящей работе показано, что в геноме *P. minimum* экспрессируются гены каналов TRP, EAG и HCN/CNG. Кроме того, TRP-каналы у *P. minimum* представлены по крайней мере двумя подсемействами — TRPV и TRPP, что согласуется с имеющимися в литературе данными о наиболее ранней дивергенции именно этих двух групп TRP-каналов (Cai, Clapham, 2012). Каналы семейств TRP, EAG и HCN/CNG главным образом вовлечены в трансдукцию разнообразных сенсорных сигналов клеток как многоклеточных животных, так и простейших. Например, в геноме инфузории *Paramecium tetraurelia*, обладающей комплексными поведенческими реакциями (ускорение в направлении движения клетки, реакция избегания опасности), большинство генов калиевых каналов кодирует каналобразующие белки, управляемые циклическими нуклеотидами (Martinac et al.,



Рис. 8. Результаты множественного выравнивания участков S4 аминокислотных последовательностей потенциалактивируемых протонных каналов H_v динофлагеллят и человека.

HsH_v — *Homo sapiens* (NCBI: NP_001035196.1), *KvH_v* — *Karlodinium veneficum* (NCBI: AEQ59286.1), *PmH_v* — *Prorocentrum minimum* (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP2233: 128_1).

2008). В то же время представитель хлорофитовых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* в своем геноме имеет, по разным оценкам, от шести до восьми представителей семейства TRP, также играющих важную роль в поведении этих микроорганизмов, в частности при механорецепции (Huang et al., 2007; Fujiu et al., 2011; Arias-Darrag et al., 2015).

У динофлагеллят описаны разнообразные поведенческие реакции — гео-, хемо- и фототаксисы, суточная миграция в водном столбе и стрессиндуцированный экдизис (Kamykowski et al., 1998; Pozdnyakov, Skarlato, 2012). Хотя молекулярные механизмы этих поведенческих реакций динофлагеллят практически не изучены, можно предположить участие в них каналов из семейств TRP, EAG и HCN/CNG, так как эти процессы связаны с восприятием клеткой внешних стимулов.

Предполагается, что двух- и четырехдоменные ионные каналы являются результатом последовательных раундов дупликации исходного гена, кодирующего катионный канал с характерной для каналов K_v доменной организацией. В результате первого раунда дупликации возникли ионные каналы, содержащие в одной последовательности два гомологичных домена, каждый из которых имел сегменты S1—S4, образующие VSD, и сегменты S5—S6 с поровой петлей между ними (рис. 1, д). На роль таких каналов выдвигаются двухдоменные кальциевые каналы TRP, экспериментально обнаруженные в мембранах внутриклеточных вакуолей животных и растений. Кроме того, с помощью методов биоинформатики они обнаружены в геноме некоторых протистов (Jegla et al., 2009; Cai, 2012). Полученные нами данные о TRP-каналах в транскриптом *P. minimum* согласуются с предположением о том, что дупликация исходного гена, кодирующего субъединицу катионного канала, подобного K_v , произошла на самых ранних этапах эволюции эукариот (Cai, 2012), поскольку перечисленные группы организмов имеют общего предка лишь в самом основании современного глобального древа эукариот (Adl et al., 2012). При этом вопрос о времени последующего раунда дупликации, приведшего к появлению четырехдоменных потенциалуправляемых каналов Ca_v , Na_v и NALCN, долгое время оставался дискуссионным (Cai, 2012; Liebeskind et al., 2012).

Поскольку у грибов и растений отсутствуют гены четырехдоменных каналов Na_v , считали, что их появление связано с возникновением нервной системы Metazoa (Hille, 2001). Однако последние исследования с привлечением геномных данных по таким группам, как хоанофлагелляты и апусозои, опровергают эту гипотезу. Исследования убедительно показали, что появление каналов Na_v , обладающих четырехдоменной организацией, произошло еще до появления многоклеточности (Liebeskind et al., 2011; Cai, 2012).

Поскольку аминокислотные последовательности каналов Ca_v и Na_v и гомологичные им последовательности из транскриптома *P. minimum* имеют одинаковую степень сходства между собой, последние не могут быть отнесены ни к Ca_v , ни к Na_v на данном этапе исследований. С одной стороны, полученные нами данные о наличии семейства каналов Ca_v/Na_v у динофлагеллят согласуются с электрофизиологическими данными о потенциалуправляемом токе Na^+ во время развития потенциала действия у *N. miliaris* (Oami et al., 1990). С другой стороны, найденные нами гомологи обладают селективным фильтром

E/E/E/E, характерным именно для каналов Ca_v (Liebeskind et al., 2011), что может указывать на селективность данных каналов к ионам Ca^{2+} . При этом следует отметить, что у бактерий известны однодоменные каналы Na_v , которые имеют селективный фильтр E/E/E/E, однако проявляют избирательность в отношении ионов Na^+ , а не Ca^{2+} (Liebeskind et al., 2011). Таким образом, для того чтобы с уверенностью отнести каналы Ca_v/Na_v *P. minimum* к конкретной группе потенциалуправляемых каналов (Ca_v или Na_v), требуется более глубокий структурный и филогенетический анализ. Тем не менее уже на данном этапе можно предполагать участие Ca_v/Na_v -каналов *P. minimum* в процессах, требующих наличия потенциалов действия, таких как контроль над биением жгутиков.

Предположение о наличии у динофлагеллят каналов H_v впервые было сделано при изучении биоэлектрического контроля люминесценции ночесветки *N. miliaris* (Eckert, Sibaoka, 1968). Авторы предполагали, что люминесценция инициируется потенциалзависимым входом ионов H^+ в просвет внутриклеточных мембранных органелл — сцинтиллонов, содержащих фермент люциферазу. В 2011 г. у нелюминесцирующей динофлагелляты *K. veneficum* был идентифицирован и клонирован ген канала H_v (Smith et al., 2011). Как и *K. veneficum*, *P. minimum* не обладает способностью к биолюминесценции, однако можно предположить, что каналы H_v могут участвовать в регуляции уровня pH внутренней среды некоторых везикулярных органелл, подобно тому как это происходит у люминесцентных динофлагеллят или кокколитофорид (Eckert, Sibaoka, 1968; Taylor et al., 2011).

Ионные каналы вовлечены во все жизненно важные физиологические процессы в клетке, и, вероятно, динофлагелляты в этом отношении не являются исключением. Исследования ионных каналов динофлагеллят необходимы для понимания многих аспектов физиологии этой экологически важной группы микроорганизмов, а также для понимания хода эволюции самих ионных каналов. В связи с этим анализ транскриптомных баз данных играет особую роль, поскольку показывает имеющееся разнообразие этих трансмембранных белков и позволяет выдвигать гипотезы относительно их эволюции. В настоящей работе нами были выявлены следующие гомологи: 1) калиевых каналов входящего выпрямления, 2) потенциалуправляемых калиевых каналов, 3) кальцийактивируемых калиевых каналов, 4) каналов, управляемых циклическими нуклеотидами EAG и HCN/CNG, 5) каналов TRPV и TRPP, 6) двухпоровых кальциевых каналов TRP, 7) потенциалуправляемых натриевых и кальциевых каналов, а также 8) потенциалуправляемых протонных каналов. Однако очевидна и необходимость проведения электрофизиологических исследований, которые смогут продемонстрировать конкретные физиологические функции каждой группы ионных каналов.

Авторы выражают свою искреннюю благодарность сотрудникам Института цитологии РАН Е. А. Морачевской, Е. С. Насоновой и О. В. Матанцевой за критические замечания и ценные предложения в ходе подготовки рукописи к печати.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00703-а).

Список литературы

- Зефирова А. Л., Ситдикова М. А. 2010. Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология). Казань: Арт-кафе. 271 с. (Zefirova A. L., Sitdikova M. A. 2010. Ion channels of an excitable cell (structure, function, and pathology). Kazan: Art-cafe. 271 p.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С. 2003. Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб.: Изд-во СПбГУ. 209 с. (Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S. 2003. Mechanisms of intracellular signaling. St. Petersburg: Izdatelstvo SPbGU. 209 p.)
- Околюков Ю. Б. 2011. Dinoflagellata. В кн.: Протисты: Руководство по зоологии. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК: 3 : 7—94. (Okolodkov Y. B. 2011. Dinoflagellata. In: Protists: Guide book in zoology. St. Petersburg—Moscow: KMK. 3 : 7—94.)
- Adl S. M., Simpson A. G. B., Lane C. E., Lukes J., Bass D. et al. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59 : 429—493.
- Arias-Darraz L., Cabezas D., Colenso C. K. et al. 2015. A transient receptor potential ion channel in *Chlamydomonas* shares key features with sensory transduction-associated TRP channels in mammals. *The Plant Cell Online*. C. tpc. 114.131862.
- Cai X. 2012. Ancient origin of four-domain voltage-gated Na⁺ channels predates the divergence of animals and fungi. *J. Membrane Biol.* 245 : 117—123.
- Cai X., Clapham D. E. 2012. Ancestral Ca²⁺ signaling machinery in early animal and fungal evolution. *Mol. Bio. Evol.* 29 : 91—100.
- Cembella A. D. 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*. 42 : 420—447.
- Craven K. B., Zagotta W. N. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol.* 68 : 375—401.
- DeCoursey T. E. 2008. Voltage-gated proton channels. *Cell Mol. Life Sci.* 65 : 2554—2573.
- Eckert R., Sibaoka T. 1968. The flash-triggering action potential of the luminescent dinoflagellate *Noctiluca*. *J. Gen. Physiol.* 52 : 258—282.
- Figueroa R. I., Cuadrado A., Stuken A., Rodriguez F., Fraga S. 2014. Ribosomal DNA organization patterns within the dinoflagellate genus *Alexandrium* as revealed by FISH: life cycle and evolutionary implications. *Protist*. 165 : 343—363.
- Fujiu K., Nakayama Y., Iida H., Sokabe M., Yoshimura K. 2011. Mechanoreception in motile flagella of *Chlamydomonas*. *Nat. Cell. Biol.* 13 : 630—632.
- Hackett J. D., Anderson D. M., Erdner D. L., Bhattacharya D. 2004. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Amer. J. Bot.* 91 : 1523—1534.
- 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.
- Huang K., Diener D. R., Mitchell A., Pazour G. J., Witman G. B., Rosenbaum J. L. 2007. Function and dynamics PKD2 in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella. *J. Cell Biol.* 179 : 501—514.
- 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.
- Kamykowski D., Milligan E. J., Reed R. E. 1998. Relationships between geotaxis/phototaxis and diel migration in autotrophic dinoflagellates. *J. Plankton Res.* 20 (9) : 1781—1796.
- 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., Burki F., Wilcox H. M., Allam B. 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.
- Li M., Yu Y., Yang J. 2011. Structural biology of TRP channels. In: Transient receptor potential channels. Advances in experimental medicine and biology. Dordrecht; Heidelberg; London; New York: Springer. 704 : 1—23.
- 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.
- Martinac B., Saimi Y., Kung C. 2008. Ion channels in microbes. *Physiol. Rev.* 88 : 1449—1490.
- Mollemann A. 2003. Patch-clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley and Sons, Ltd. 175 p.
- Morrill L. C., Loeblich A. R., III. 1983. Ultrastructure of the dinoflagellate amphiesma. *Int. Rev. Cytol.* 82 : 151—180.
- Oami K., Naitoh Y., Sibaoka T. 1990. Distribution of ion channels in the membrane of the dinoflagellate *Noctiluca miliaris*. *J. Exp. Biol.* 150 : 473—478.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 28 : 1166—1167.
- Pearson W. R. 2013. An introduction to sequence similarity («Homology») searching. *Curr. Protoc. Bioinform.* DOI:10.1002/0471250953.bi0301s42.
- 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.
- Pozdnyakov I., Skarlato S. 2012. Dinoflagellate amphiesma at different stages of the life cycle. *Protistology*. 7 : 108—115.
- Raikov I. B. 1995. The dinoflagellate nucleus and chromosomes: mesokaryote concept reconsidered. *Acta Protozool.* 34 : 239—247.
- Sakmann B., Neher E. (ed.). 2009. Single-channel recording. 2nd ed. New York; Dordrecht; Heidelberg; London: Springer-Science and Business Media. 700 p.
- Smith S. M. E., Morgan D., Musset B., Cherny V. V., Placc A. R., Hastings J. W., DeCoursey T. E. 2011. Voltage-gated proton channel in a dinoflagellate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108 : 18 162—18 167.
- Soyer-Gobillard M.-O., Gillet B., Geraud M.-L., Bhaud Y. 1999. Dinoflagellate chromosome behavior during stages of replication. *Int. Microbiol.* 2 : 93—102.
- Taylor A. R., Charchri A., Wheeler G., Goddard A., Brownlee C. 2011. A voltage-gated H⁺ channel underlying pH homeostasis in calcifying coccolithophores. *PLoS Biol.* 9 : e1001085.
- Vandenberg J. I., Perry M. D., Perrin M. J., Mann S. A., Ke Y., Hill A. P. 2012. hERG K⁺ channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol. Rev.* 92 : 1393—1478.
- Yu F. H., Yarov-Yarovoy V., Gutman G. A., Catterall W. A. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol. Rev.* 57 : 387—395.

ANALYSIS OF THE DINOFLAGELLATE *PROROCENTRUM MINIMUM* TRANSCRIPTOME:
IDENTIFYING THE MEMBERS OF THE VOLTAGE-GATED CATION CHANNELS SUPERFAMILY*I. A. Pozdnyakov,¹ S. O. Skarlato*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: pozdnyakov@cytspb.rssi.ru

Dinoflagellates are an ecologically important group of aquatic single-cell eukaryotes. At the present time relatively little is known about physiological features that determine the role of these protists in natural ecosystems. Lack of knowledge on the diversity, structure, and functioning of dinoflagellate ion channels significantly hampers the interpretation of physiological reactions and adaptations in these microorganisms. We performed the analysis of the translated transcriptome databases that belong to two strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* in order to identify the members of the voltage-gated cation channels superfamily. We found out that transcriptomes of these potentially toxic microorganisms contained the homologues of: 1) inwardly rectifying potassium channels (K_{ir}), 2) voltage-gated potassium channels (K_v), 3) calcium-activated potassium channels (K_{Ca}), 4) cyclic nucleotide-gated channels (EAG and HCN/CNG), 5) TRPV and TRPP channels, 6) two-pore calcium channels TPC, 7) voltage-gated sodium (Na_v) and calcium (Ca_v) channels, 8) voltage-gated proton channels (H_v).

Key words: unicellular eukaryotes, protists, dinoflagellates, ion channels, transcriptome.
