

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Поздняков Илья Андреевич

**КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ: ВЫЯВЛЕНИЕ
РАЗНООБРАЗИЯ И РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОДХОДА
ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Скарлато Сергей Орестович

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Общая характеристика динофлагеллят.....	15
1.1.1 Морфологические и физиологические особенности	15
1.1.2 Филогенетическое положение и классификация	16
1.1.3 Ядерный аппарат и организация генома	18
1.1.4 Жизненный цикл и размножение	23
1.1.5 Покровы динофлагеллят и их реорганизация в ходе жизненного цикла.....	24
1.1.6 Экология и токсикология.....	31
1.1.7 Краткая характеристика модельного объекта – <i>Prorocentrum</i> <i>minimum</i> (Pavillard) Schiller 1933	33
1.2 Ионные каналы.....	36
1.2.1 Общие сведения	36
1.2.2 Суперсемейство потенциал-управляемых катионных каналов	40
1.2.3 Эволюция четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов	44
1.2.4 Метод локальной фиксации потенциала на мембране	52
1.3 Ионные каналы динофлагеллят	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
2.1 Культура динофлагеллят <i>P. minimum</i>	60
2.2 Биоинформатический анализ данных	60

2.2.1 Нуклеотидные и аминокислотные базы данных и поиск гомологов потенциал-управляемых катионных каналов	60
2.2.2 Выравнивание аминокислотных последовательностей.....	61
2.2.3 Оценка идентичности гомологичных последовательностей	62
2.2.4 Филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов.....	62
2.2.5 Предсказание вторичных структур участков четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов	65
2.3 Получение и исследование сферопластов <i>P. minimum</i>	65
2.3.1 Индукция экдизиса	65
2.3.2 Получение сферопластов	65
2.3.3 Подсчет нативных и экдизировавших клеток и сферопластов.....	66
2.3.4 Микроскопия и анализ изображений.....	66
2.4 Электрофизиологические исследования	67
2.4.1 Используемая аппаратура и программы.....	67
2.4.2 Условия регистрации трансмембранного тока.....	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	69
3.1 Идентификация представителей суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов в транскриптомах динофлагеллят	69
3.1.1 Калиевые каналы	70
3.1.2 Каналы, управляемые циклическими нуклеотидами.....	72
3.1.3 Удвоенные последовательности каналов K_v и HCN/CNG	74
3.1.4 Каналы TRP	77
3.1.5 Каналы TRP	78
3.1.6 Потенциал-управляемые протонные каналы.....	79

3.1.7	Четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы	79
3.2	Филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят	80
3.2.1	Филогенетическое разнообразие потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят в пределах супергруппы SAR	80
3.2.2	Филогенетическое разнообразие четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят в пределах домена Eukaryota	88
3.3	Анализ структуры функционально значимых участков аминокислотных последовательностей четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят	93
3.3.1	Структура селективного фильтра	94
3.3.2	Структура сегментов S4	97
3.3.3	Первичная и вторичная структура области инактивационных ворот	100
3.4	Регистрация активности ионных каналов динофлагеллят	108
3.4.1	Разработка подхода к применению метода локальной фиксации потенциала на мембране для изучения ионных каналов динофлагеллят	108
3.4.2	Максимальный выход ДХБ-индуцированных сферопластов	112
3.4.3	ДХБ-индуцированный экдизис клеток <i>P. minimum</i>	113
3.4.4	Сравнение экдизировавших клеток и ДХБ-индуцированных сферопластов	114
3.4.5	Регистрация активности ионных каналов плазматической мембраны ДХБ-индуцированных сферопластов <i>P. minimum</i>	115
	ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	123
4.1	Суперсемейство потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят	123

4.1.1 Калиевые каналы K_{ir} , K_v , K_{Ca} и K_{2P}	124
4.1.2 Каналы TRP, EAG и HCN/CNG.....	125
4.1.3 Удвоенные последовательности K_v и HCN/CNG	126
4.1.4 Каналы TRP	127
4.1.5 Каналы H_v	128
4.2 Четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКТ) динофлагеллят.....	129
4.2.1 Филогенетическое разнообразие ЧД ПКТ	129
4.2.2 Структурно-функциональное разнообразие ЧД ПКТ	131
4.2.2.1 Селективный фильтр	132
4.2.2.2 Структура сегментов S4.....	134
4.2.2.3 Первичная и вторичная структура области инактивационных ворот	136
4.2.3 Возможная функциональная роль ЧД ПКТ динофлагеллят	139
4.3 Образование сферопластов армированных динофлагеллят <i>P. minimum</i>	140
4.4 Трансмембранные ионные токи <i>P. minimum</i>	144
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
ВЫВОДЫ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	150
БЛАГОДАРНОСТИ	166
ПРИЛОЖЕНИЕ	167

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АП – амфиесмальные пузырьки

ВМАП – внешняя мембрана амфиесмальных пузырьков

ВнМАП – внутренняя мембрана амфиесмальных пузырьков

ДИК – дифференциально-интерференционный контраст

ДМСО – диметилсульфоксид

ДХБ – 2,6-дихлорбензонитрил

ЛПД – потенциал действия, обеспечивающий запуск люминесценции

НМ – наружная мембрана

ПД – потенциал действия

ПКК – потенциал-управляемые катионные каналы

ПМ – плазматическая мембрана

ПП – потенциал покоя

ТП – текальные пластины

ТПД – потенциал действия, управляющий движениями тентакля

ЧД ПКК – четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы

Ank – анкириновый домен

Sch – подсемейство потенциал-нечувствительных кальциевых каналов грибов

CFW – флуоресцентный краситель Calcofluor White M2R

CNBD – домен, связывающий циклические нуклеотиды

EAG – семейство калиевых каналов, активируемых циклическими нуклеотидами

GLUR – семейство ионотропных глутаматных рецепторов

HCN/CNG – семейство катионных каналов, активируемых циклическими нуклеотидами

H_v – семейство потенциал-управляемых протонных каналов

HVA Ca_v – подсемейство потенциал-управляемых кальциевых каналов, активируемых высокими потенциалами

K_{2p} – семейство двухпоровых калиевых каналов

K_{Ca} – семейство кальций-активируемых калиевых каналов

kH_v1 – потенциал-управляемый протонный канал *Karlodinium veneficum* 1

K_{ir} – калиевые каналы входящего выпрямления

K_v – семейство потенциал-управляемых калиевых каналов

LVA Ca_v – подсемейство потенциал-управляемых кальциевых каналов, активируемых низкими потенциалами

MMETSP – база данных Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project

NaBacCh – семейство бактериальных потенциал-управляемых натриевых каналов

NALCN – подсемейство натриевых каналов утечки

Na_v – подсемейство потенциал-управляемых натриевых каналов

P-loop – поровая петля

S0–S6 – трансмембранные сегменты

SAR – монофилетическая группа эукариот, включающая Stramenopiles, Alveolata и Rhizaria

TM1, TM2 – трансмембранные сегменты каналов K_{ir} и K_{2p}

TPC – семейство двухпоровых кальциевых каналов

TRP – семейство неселективных катионных каналов

VSD – потенциал-чувствительный домен

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Ионные каналы – это трансмембранные белковые комплексы, опосредующие пассивный транспорт ионов через мембрану. Они вовлечены во все важнейшие процессы жизнедеятельности клетки: передачу сигналов, возбудимость, подвижность, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, экзо- и эндоцитоз и др. (Hille, 2001). Большинство идентифицированных и функционально охарактеризованных ионных каналов эукариот принадлежат трем группам организмов (многоклеточные животные, грибы и растения), которые представляют собой лишь малую часть филогенетического разнообразия Eukaryota (Adl et al., 2012). В то же время данные об ионных каналах большинства групп эукариот очень скудны, что затрудняет понимание эволюции этих физиологически важных трансмембранных комплексов (Martinac et al., 2008). Основное разнообразие ионных каналов, описанное на сегодняшний день, относится к суперсемейству потенциал-управляемых катионных каналов (Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009). Среди них особый интерес представляют четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы, поскольку их эволюция тесно связана с возникновением нервной системы у многоклеточных животных и разнообразием типов возбудимых мембран эукариот (Hille, 2001; Liebeskind et al., 2011; Berzilai et al., 2012; Cai, 2012). Таким образом, очевидна необходимость получения данных о наличии, филогенетическом положении и структурно-функциональных особенностях потенциал-управляемых катионных каналов у удаленных от многоклеточных организмов групп Eukaryota, представленных одноклеточными организмами (протистами).

Одной из таких групп являются динофлагелляты – широко распространенные морские и пресноводные эукариотные микроорганизмы, играющие важную роль в функционировании водных экосистем (Hackett et al., 2004; Околотков, 2011). Динофлагелляты являются важнейшими первичными продуцентами в Мировом океане. Наряду с другими микроорганизмами, они

играют первостепенную роль в глобальных циклах биогенных элементов и таким образом оказывают влияние на формирование климата Земли (Godhe et al., 2008). Кроме того, эти протисты известны своей способностью к синтезу большого числа вторичных метаболитов различной химической природы, многие из которых токсичны для позвоночных животных, в том числе человека (Cembella, 2003; Wang, 2008). Значительное число видов динофлагеллят способно к вспышкам размножения, приводящим к так называемому цветению воды («красным приливам»). В результате массового размножения токсин-продуцирующих видов происходит накопление токсичных веществ в моллюсках, ракообразных и рыбе, что наносит значительный вред промысловому хозяйству, здоровью человека и, следовательно, экономике прибрежных регионов в целом (Heil et al., 2005; Wang, 2008; Околотков, 2011). Несмотря на огромное значение динофлагеллят, многие физиологические особенности этих протистов, определяющие их экологическую роль, в настоящее время остаются малоизученными. Поскольку ионные каналы являются неотъемлемыми участниками всех физиологических процессов в клетке, изучение этих трансмембранных белковых комплексов у столь экологически важной группы организмов является весьма актуальным.

Тем не менее, на сегодняшний день получено крайне ограниченное количество информации об ионных каналах динофлагеллят, что связано с отсутствием секвенированных геномов у свободноживущих представителей (Mendez et al., 2015) и методическими сложностями применения к их клеткам наиболее эффективного метода для изучения функционирования ионных каналов – метода локальной фиксации потенциала на мембране (Pozdnyakov et al., 2014). Заполнение этого пробела представляет собой одно из приоритетных направлений исследований как в области клеточной биологии динофлагеллят, так и в области изучения эволюции ионных каналов в целом.

Цель работы: выявить разнообразие катионных каналов динофлагеллят и разработать экспериментальный подход для исследования их функциональной активности.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать представителей суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов у динофлагеллят с помощью анализа транскриптомных баз данных.
2. Исследовать филогению четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят.
3. Исследовать структуру селективного фильтра, сегментов S4 и участка инактивационных ворот четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят методами биоинформатики.
4. Разработать подход, позволяющий применять метод локальной фиксации потенциала на мембране к клеткам армированных динофлагеллят, и на примере модельного объекта *Prorocentrum minimum* выявить активность ионных каналов, зарегистрировав трансмембранные ионные токи.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Динофлагелляты обладают высоким разнообразием ионных каналов суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов, сопоставимым с разнообразием этих каналов у многоклеточных животных.
2. Динофлагелляты имеют по крайней мере четыре филогенетически обособленные группы четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов, характеризующиеся разнообразием структурно-функциональных детерминант.
3. Ингибирование синтеза целлюлозы у армированных динофлагеллят приводит к образованию сферопластов, пригодных для регистрации одиночных ионных каналов методом локальной фиксации потенциала на мембране, что делает возможным экспериментальное изучение активности ионных каналов у этих организмов.

Научная новизна работы. С помощью анализа транскриптомных баз данных у динофлагеллят впервые идентифицировано большинство известных представителей суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов, в том числе четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы. Впервые проведен анализ филогении четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят, выявлены структурные детерминанты функционально значимых участков молекулярного комплекса канала. На примере модельного объекта *P. minimum* разработан оригинальный подход, позволяющий изучать ионные каналы динофлагеллят с помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране (patch-clamp). Впервые у этих микроорганизмов удалось зарегистрировать ионные токи, отражающие активность одиночных каналов в клеточной мембране.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе данные о структурном и филогенетическом разнообразии катионных каналов динофлагеллят важны для понимания эволюции этих трансмембранных белковых комплексов, играющих важную роль во многих физиологических процессах в клетке. Предложенный в настоящей работе метод получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят впервые позволил зарегистрировать трансмембранные токи на уровне одиночных каналов у этих организмов. В перспективе данный метод открывает принципиально новые возможности для выяснения роли ионных каналов в физиологии этой экологически, токсикологически и фармацевтически значимой группы эукариот. Результаты настоящей работы могут быть использованы в курсах лекций и экспериментальных исследованиях в области клеточной биологии, протистологии, микробиологии и биофизики.

Личный вклад автора. Результаты, включенные в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы. Результаты работы докладывались и обсуждались на международных и российских научных форумах: Международной конференции

«Актуальные проблемы планктонологии» (Светлогорск, 2012); 38-м Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (38th FEBS Congress, Санкт-Петербург, 2013); IV Конференции молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2014), Международном научном совещании «Фундаментальная наука для образования и менеджмента окружающей среды» («Basic science for education and environmental management», Росток, Германия, 2014); Международной конференции «Микроорганизмы в Балтике: маленькие существа, маленькое море, большие вопросы» («Microbes in the Baltic: small things, small sea, big questions», Гдыня, Польша, 2014); Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы экологии, физиологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014); семинаре Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2015); заседании объединенного научного семинара Лаборатории цитологии одноклеточных организмов, Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности и Лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации (Санкт-Петербург, 2015); 7-м Европейском протистологическом конгрессе (VII European Congress of Protistology, Севилья, Испания, 2015), Международном форуме «Протист-2016» (Moscow Forum «Protist-2016», Москва, 2016), V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2016), Международной конференции «Биомембраны 2016: механизмы старения и возрастных заболеваний» («Biomembranes 2016: mechanisms of aging and age-related diseases», Долгопрудный, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ: 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 10 тезисов докладов.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Pozdnyakov, I. Dinoflagellate amphiesma at different stages of the life cycle / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // *Protistology*. – 2012. – V. 7. – N. 2. – P. 108–115.

2. Pozdnyakov, I. Obtaining spheroplasts of armored dinoflagellates and first single-channel recordings of their ion channels using patch-clamping / I. Pozdnyakov,

O. Matantseva, Y. Negulyaev, S. Skarlato // *Marine drugs*. – 2014. – V. 12. – N. 9. – P. 4743–4755.

3. Поздняков, И. А. Анализ транскриптома динофлагеллят *Prorocentrum minimum* : идентификация представителей суперсемейства потенциалуправляемых катионных каналов / И. А. Поздняков, С. О. Скарлато // *Цитология*. – 2015. – Т. 57. – № 7. – С. 533–543.

Тезисы докладов:

1. Поздняков, И. А. Проблемы регистрации ионных токов через мембраны одноклеточных организмов и пути их решения / И. А. Поздняков // *Актуальные проблемы планктонологии : тез. докл. междунар. конф.* – Калининград : АтлантНИРО, 2012. – С. 96–97.

2. Pozdnyakov, I. The first single-channel recordings of voltage-dependent ionic channels in dinoflagellates / I. Pozdnyakov, O. Matantseva // *38th FEBS Congress : abstracts*. – The FEBS Journal, 2013. – V. 280. – P. 192.

3. Поздняков, И. А. Метод получения сферопластов динофлагеллят *Prorocentrum minimum*, пригодных для регистрации ионных каналов / И. А. Поздняков // *IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре : тез. докл.* – *Цитология*, 2014. – Т. 56. – № 5. – С. 375.

4. Pozdnyakov, I. What electrophysiology can do for aquatic ecology? / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // *Microbes in the Baltic : Small things, small sea, big questions : abstracts of international workshop*. – Gdynia, Poland, 2014. – P. 12.

5. Поздняков, И. А. Электрофизиологические исследования динофлагеллят / И. А. Поздняков // *Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов : материалы Всероссийского симпозиума с международным участием*. – М. : ООО «МАКС Пресс», 2014. – С. 185.

6. Pozdnyakov, I. Ion channels in dinoflagellates revealed by patch-clamping and analysis of transcriptomes / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // *VII European Congress of Protistology : abstracts*. – Seville, Spain, 2015. – P. 360.

7. Pozdnyakov, I. Chasing ion channels of dinoflagellates / I. Pozdnyakov, O. Matantseva, S. Skarlato // Moscow Forum «Protist-2016» : abstracts. – Protistology, 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 61.

8. Pozdnyakov, I. Phylogeny of protistan four-domain voltage-gated ion channels / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // Moscow Forum «Protist-2016» : abstracts. – Protistology, 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 61–62.

9. Поздняков, И. А. Разнообразие четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов эукариот / И. А. Поздняков // V Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН : тез. докл. – СПб., 2016. – С. 57–58.

10. Pozdnyakov, I. Diversity and evolution of four-domain voltage-gated ion channels revealed by bioinformatics analysis / I. Pozdnyakov // International conference «Biomembranes 2016: mechanisms of aging and age-related diseases» : abstracts. – Dolgoprudny, MIPT, 2016. – P. 139.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика динофлагеллят

1.1.1 Морфологические и физиологические особенности

Динофлагелляты (*Dinoflagellata*) – широко распространенная группа морских и пресноводных эукариот, представленная преимущественно одноклеточными формами (Околодков, 2011).

Динофлагелляты обладают целым рядом цитологических особенностей, таких как: 1) постоянно конденсированные хромосомы в клеточном цикле; 2) особый тип митоза (диномитоз), при котором микротрубочки веретена деления располагаются в каналах, пронизывающих делящееся ядро; 3) наличие одних из самых больших геномов среди эукариот (до 250 пг ДНК на клетку, или около 200 млрд п.н.); 4) наличие особых многослойных покровов (амфиесма); 5) наличие уникальной органеллы – пузулы; 6) присутствие у многих представителей (около половины современных видов) хлоропластов, являющихся результатом вторичного или третичного эндосимбиоза; 7) наличие у некоторых видов наиболее сложноустроенной среди одноклеточных эукариот светочувствительной органеллы – оцеллоида (Morrill, Loeblich, 1983; Raikov, 1995; Hacket et al., 2004; Околодков, 2011; Pozdnyakov, Skarlato, 2012).

Кроме того, эти протисты обладают рядом уникальных физиолого-биохимических особенностей, среди которых: 1) синтез особых стеролов (диностеролы); 2) способность многих видов синтезировать широкий спектр вторичных метаболитов, являющихся токсинами для позвоночных животных; 3) способность некоторых видов к биолуминесценции; 4) разнообразие типов питания, в том числе способность сочетать авто- и гетеротрофию (миксотрофия); 5) синтез особого каротиноида – перидинина (Eckert, Sibaoka, 1968; Leblond,

Chapman, 2002; Yoon et al., 2002; Cembella, 2003; Окологков, 2011; Матанцева, Скарлато, 2013).

К общей характеристике этой группы эукариот следует также добавить, что клетки динофлагеллят содержат митохондрии с тубулярными кристами, подвижные клетки имеют два неравных жгутика, а для группы в целом характерно высокое разнообразие клеточной формы (Окологков, 2011).

В следующих разделах настоящей главы рассматриваются отдельные морфологические, физиологические, биохимические и экологические особенности динофлагеллят, имеющие значение для данной работы.

1.1.2 Филогенетическое положение и классификация

Наиболее древние ископаемые остатки, определенно принадлежащие динофлагеллятам, относят к среднему триасу (около 240 млн лет назад). Пик разнообразия этих организмов предположительно пришелся на меловой период (около 145 млн лет назад) (Fensome et al., 1996). В настоящее время насчитывают около 2500 современных видов динофлагеллят (Taylor et al., 2008).

Ультратруктурные и молекулярно-биологические исследования указывают на то, что динофлагелляты – одна из линий монофилетической группы *Alveolata* (у разных авторов имеет ранг надтипа, царства или не имеет ранга), общей чертой которых является наличие особо устроенных покровов, содержащих мембранные везикулы – альвеолы. Кроме динофлагеллят, к альвеолятам относятся споровики (*Apicomplexa*) и инфузории (*Ciliata*), причем данные молекулярной филогении митохондриальной ДНК и ряда ядерных генов в наибольшей степени сближают динофлагеллят и споровиков (Cavalier-Smith, 1993; Inagaki et al., 1997; Fast et al., 2002; Saldarriaga et al., 2004). В настоящее время большинство исследователей разделяют точку зрения о том, что *Alveolata*, *Stramenopiles* (*Heterokonta*) и *Rhizaria* образуют монофилетическую супергруппу, именуемую SAR (Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria), в которой альвеолы сближаются со страменопилами (Adl et al., 2012) (рисунок 1.1).

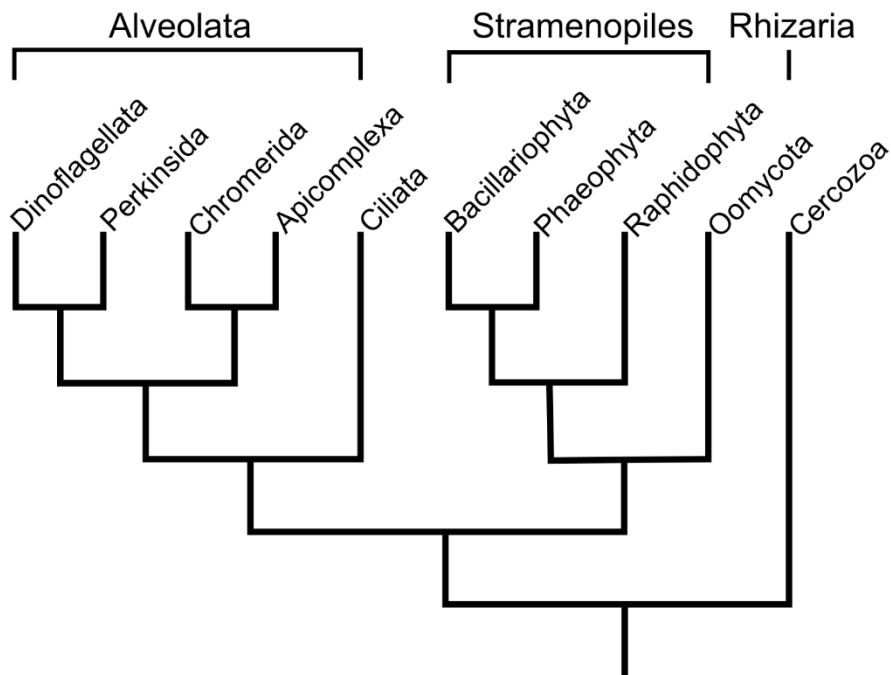


Рисунок 1.1. Упрощенная схема филогенетических отношений внутри супергруппы SAR. По: Leander, Keeling, 2004; Moore et al., 2008; Adl et al., 2012.

Помимо Apicomplexa и Ciliata, наиболее близкими родственниками динофлагеллят являются представители родов *Perkinsus* и *Parvilucifera*, которых предложено поместить в новый тип Perkinsozoa, а также группа Ellobiopsidae, которая, как и перкинсозои, была выделена из динофлагеллят. Род *Oxyrrhis* в настоящее время рассматривают либо как базальную группу внутри динофлагеллят, либо как сестринскую динофлагеллятам линию. Другие родственные группы альвеолят – Chromerida и Colpodella в наибольшей степени близки к Apicomplexa (Wisecaver, Hackett, 2011). Новейшие метагеномные данные показывают, что истинное разнообразие альвеолят значительно выше. Так, сравнительно недавно было показано существование большого разнообразия некультивируемых морских организмов, близких динофлагеллятам, объединенных в группу Marine Alveolate Group I (MAGI) (López-García et al., 2001; Moon-van der Staay et al., 2001).

В настоящее время наиболее проработанными системами динофлагеллят остаются классификации, построенные, главным образом, на основании

морфологических данных. Среди них широкое распространение получила классификация по Фенсому с соавторами (Fensome et al., 1993), разделяющая тип *Dinoflagellata* на 2 подтипа, 3 класса и 12 порядков.

Морфологи выделили так называемые базальные линии (например, *Oxyrrhis*), отошедшие от общего ствола динофлагеллят ранее других, и группу так называемых коровых динофлагеллят, к которой относится большинство современных родов. На основании ультраструктурных данных (главным образом, данных об ультраструктуре клеточных покровов) было выдвинуто предположение о том, что динофлагелляты с более просто устроенными покровами (атекальные динофлагелляты) относятся к наиболее рано дивергировавшим линиям (Morrill, Loeblich, 1983).

Данные молекулярной филогении в основном согласуются с этими представлениями. При этом, более точные отношения между родами внутри группы коровых динофлагеллят до сих пор являются в значительной степени спекулятивными. Так, молекулярная филогения динофлагеллят, построенная на основе анализа генов малой или большой субъединицы рибосом, не дает хорошего разрешения этих отношений (Hackett et al., 2004, Wisecaver, Hackett, 2011). В настоящее время для реконструирования филогении динофлагеллят также используются гены актина, бета-тубулина и белка теплового шока Hsp90, а также мультигенная филогения, основанная на анализе генов большой и малой субъединиц рибосомы и гена белка Hsp90 (Leander, Keeling, 2004; Shalchian-Tabrizi et al., 2006).

1.1.3 Ядерный аппарат и организация генома

Как правило, динофлагелляты имеют одно ядро – динокарион, или «хромосомное ядро» (Raikov, 1995). Однако известны виды и с двумя ядрами, одно из которых унаследовано от эндосимбиоза с диатомовой водорослью (Figueroa et al., 2009). Конденсированные хромосомы могут присутствовать на всем протяжении жизненного цикла динофлагеллят (у большинства видов) или на

определенной его стадии (напр., у *Noctiluca*). Кроме постоянно конденсированных хромосом для динокариона характерны и другие особенности, проявляющиеся в ходе деления этого ядра – диномитоза. Диномитоз – это разновидность закрытого внеядерного плевромитоза, имеющего следующие характерные черты: 1) ядерная оболочка не разрушается; 2) веретена деления не связаны с центриолями и располагаются вне ядра; 3) нити веретена деления проходят сквозь образующиеся в ядре цитоплазматические каналы и не имеют непосредственного контакта с хроматидами (Raikov, 1995; Окологков, 2011).

Роль гистонов в хроматине динофлагеллят достоверно не установлена до сих пор. Долгое время считалось, что гистоны отсутствуют у этих организмов, а их функции выполняют другие основные белки. Вследствие этого считается, что хроматин динофлагеллят не имеет нуклеосомного уровня организации. Негистоновые основные белки хроматина ряда видов динофлагеллят были обнаружены гистохимическими и иммунологическими методами. Эти белки имеют вторичную структуру, схожую с гистоноподобными белками бактерий. Кроме того, эти белки влияют на компактизацию ДНК в дозозависимой манере и, следовательно, могут принимать участие в регуляции транскрипции (Chan, Wong, 2007).

Недавно в транскриптомах динофлагеллят был выявлен полный набор коровых гистонов (два варианта H2A, H2B, H3 и H4). Тем не менее, следует отметить, что гистоны динофлагеллят наиболее дивергентны среди гистонов эукариот. Полагают, что эти гистоны не принимают участия в упаковке большей части ядерной ДНК (Lin et al., 2010; Wisecaver, Hackett, 2011).

Динофлагелляты имеют одни из самых больших геномов среди эукариот (до 200 млрд п. н.). По-видимому, столь большие размеры генома не обусловлены полиплоидией, о чем свидетельствуют данные о кинетике реассоциации ДНК. При этом количество хромосом, как правило, морфологически схожих, у разных видов варьирует от 24 до 220 (Wisecaver, Hackett, 2011).

Другой особенностью генома динофлагеллят является феномен высокой (до 35%) доли замен тимина на гидроксиметилурацил. Роль этого основания в геноме до сих пор не известна (Hackett et al., 2004).

Транскрипция и экспрессия генов динофлагеллят также имеют ряд характерных особенностей. Так, у этих протистов обнаружено явление 5'-трансплайсинга, которое состоит в присоединении к 5'-области ядерного транскрипта одинаковой последовательности (так называемого сплайс-лидера) длиной 22 нуклеотида (Zhang et al., 2007). Эти последовательности консервативны и кодируются отдельными генами, которые, как и многие другие гены динофлагеллят, организованы в кластеры тандемных копий (рисунки 1.2–1.3). В таких кластерах копии гена разделены между собой стоп-кодоном и 3'-некодирующей областью предыдущей копии, межгенным участком, несущим сигнал полиаденилирования и 5'-некодирующей областью следующей копии, с сайтами трансплайсинга (Bachvaroff, Place, 2008). Для копий генов внутри таких кластеров характерна высокая степень идентичности с преобладанием синонимичных замен над несинонимичными. Число копий одного и того же гена и степень их идентичности неодинакова у разных видов. Так, кластер гена белка перидинин-хлорофилла а (PCP) у *Simbiodium* sp. состоит из приблизительно 36 копий, степень отличия между которыми достигает 2,2 % (Reichman et al., 2003). В то же время кластер гена PCP у *Lingulodinium polyedrum* имеет в своем составе около 5000 практически идентичных копий (Bachvaroff, Place, 2008). В отличие от кодирующих участков кластеров тандемных копий, межгенные области могут быть весьма вариабельными (Liu, Hastings, 2005).

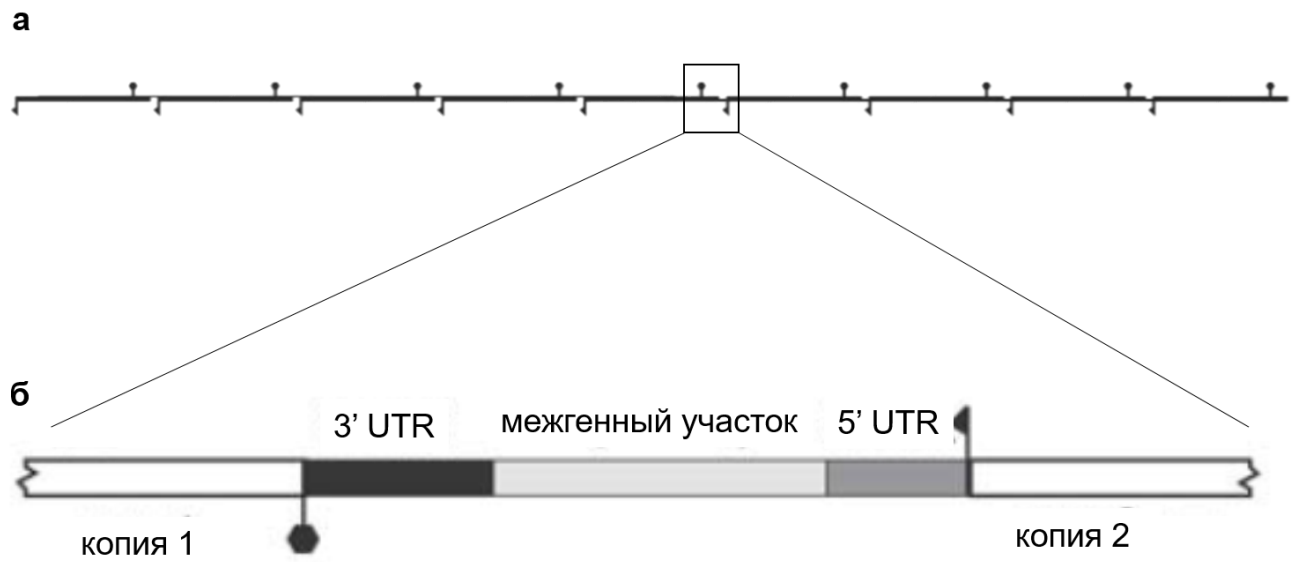


Рисунок 1.2. Тандемные копии генов динофлагеллят: общая организация (а) и организация участка между двумя соседними копиями гена (б). Шестиугольный флажок – стоп-кодон, треугольный флажок – старт-кодон. По: Bachvaroff, Place, 2008, с изменениями.

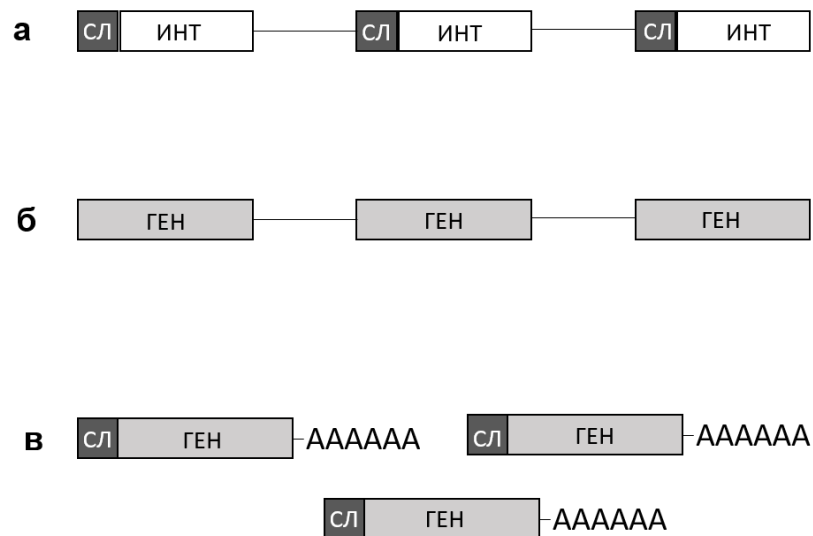


Рисунок 1.3. 5'-транссплайсинг: последовательности сплайс-лидера (СЛ), организованные в тандемные копии (а); гены, организованные в тандемные копии (ГЕН) (б); зрелые мРНК со сплайс-лидерами и полиаденилированными концами (AAAAAA) (в). По: Wisecaver, Hackett, 2011.

Явление трансплайсинга известно у ряда эукариот, но наиболее хорошо изучено у трипаносом (Michaeli, 2011), гены которых также организованы в кластеры тандемных копий, не имеющих характерных для эукариот промоторных областей. На основании этих, по-видимому, конвергентных сходств, данные о транскрипции и процессинге у трипаносом экстраполируются на динофлагеллят. Так, известно, что у трипаносом кластеры генов транслируются в единую полицистронную мРНК, которая затем претерпевает процессинг в виде трансплайсинга. В результате полицистронная мРНК разделяется на отдельные моноцистронные транскрипты, в 5'-области которых находятся лидирующие последовательности. Эта модель была полностью перенесена на экспрессию генов у динофлагеллят (Wisecaver, Hackett, 2011). Однако, изучая кластеры тандемных копий динофлагеллят *L. polyedrum*, Бошемен с соавторами (Beauchemin et al., 2012) пришли к выводу, что транскрипция кластеров происходит без образования полицистронных интермедиатов. В своей работе Бошемен с соавторами указывают на то, что изложенная выше «трипаносомная» модель делает несколько предсказаний. Первое состоит в том, что при сборке транскриптома последовательности РНК должны содержать межгенные участки, разделяющие копии гена. Биоинформатический анализ показал, что накопления таких транскриптов не происходит. Второе предсказание состоит в том, что число зрелых (т.е. моноцистронных) транскриптов должно грубо приближаться к числу копий соответствующего гена в кластере. Анализ транскриптома для 5 генов с известным числом копий показал, что гены с разным числом копий могут быть представлены одинаковым числом транскриптов. В то же время гены с одинаковым числом копий могут быть представлены на разном уровне в транскриптоме. Третье следствие вышеизложенной модели состоит в том, что транскрипты каждой из копий гена должны накапливаться в эквивалентном количестве. Тестируя эту гипотезу на примере гена люциферазы, авторы пришли к выводу, что этого не происходит.

Таким образом, в настоящее время транскрипция динофлагеллят изучена недостаточно полно. С одной стороны, множественные сходства в организации

генома с трипаносомами, дают основания полагать, что данные, полученные на этой группе, могут быть экстраполированы и на динофлагеллят. С другой стороны, анализ транскриптома *L. polyedrum*, свидетельствует о том, что механизмы транскрипции и посттранскрипционного процессинга у динофлагеллят могут быть совершенно иными.

1.1.4 Жизненный цикл и размножение

Динофлагелляты характеризуются гаплофазным жизненным циклом с зиготической редукцией: вегетативные клетки и гаметы имеют гаплоидный набор хромосом, диплоидны лишь зиготы (Околодков, 2011). На сегодняшний день исключение составляют сем. Noctiluciphyceae и вид *Pyrocystis lunula*, вегетативные клетки которых имеют диплоидный набор хромосом (Zingmark, 1970; Seo, Fritz, 2006).

При половом процессе слияние гамет может быть как гомоталличным (сливаются гаметы одной клетки), так и гетероталличным (сливаются гаметы разных клеток). Образующаяся зигота внешне схожа с вегетативной клеткой, имеет два жгутика и в течение последующих дней увеличивается в размере (планозигота). Затем плавающая зигота теряет подвижность, опускается на дно, а ее клеточная стенка утолщается (гипнозигота). Гипнозиготы могут оставаться жизнеспособными в течение нескольких лет, представляя собой покоящиеся цисты. При благоприятных условиях гипнозигота претерпевает мейотическое деление, приводящее к образованию новых вегетативных клеток, которые в оптимальных условиях размножаются бесполом путем (Околодков, 2011).

Известны четыре способа бесполого размножения у разных видов динофлагеллят. Атекальные виды претерпевают деление надвое. Армированные динофлагелляты делятся либо путем десмошизиса (деление надвое, при котором каждая из дочерних клеток наследует половину теки материнской клетки), либо путем элеутерошизиса (деление надвое происходит под материнской оболочкой, которая затем полностью сбрасывается). Для паразитических видов характерен

спорогенез, происходящий во время фазы питания (палиспорогенез) или же после ее завершения (палинтомия) (Околодков, 2011).

Для многих видов динофлагеллят описаны сложные жизненные циклы, включающие множество стадий и смен бесполого и полового поколений. В то же время известно множество видов, для которых характерно исключительно бесполое размножение (Faust, Gualledge, 2002).

1.1.5 Покровы динофлагеллят и их реорганизация в ходе жизненного цикла

В настоящей работе особое внимание было уделено организации покровов динофлагеллят, поскольку сложные покровы клетки существенно затрудняют изучение ионных каналов живых организмов.

В литературе для обозначения покровов динофлагеллят существует несколько вариантов названия: «тека», «пелликула» и «кортекс», которые используются при описании клеточных покровов многих групп эукариот, а также «амфиесма» – термин, употребляемый исключительно по отношению к динофлагеллятам (Morrill, Loeblich, 1983). Также следует отметить, что термины «тека» и «пелликула» могут обозначать не только покровы в целом, но и отдельные структурные компоненты в составе амфиесмы. В настоящей работе для обозначения покровов динофлагеллят мы употребляем термин «амфиесма».

Амфиесма включает в себя три обязательных компонента: плазматическую мембрану (также называемую наружной), слой везикул, расположенных под ней (альвеолы, или амфиесмальные пузырьки) и еще ниже ряд кортикальных микротрубочек. Амфиесмальные пузырьки (АП) могут содержать целлюлозные текальные пластины (ТП) и/или пелликулярный слой, а на плазматической мембране (ПМ) могут находиться дополнительные органические чешуйки (Morrill, Loeblich, 1983; Hausmann, Hülsmann, 2010; Pozdnyakov, Skarlato, 2012).

Додж и Кроуфорд (Dodge, Crawford, 1970), а затем Моррилл и Леблич (Morrill, Loeblich, 1983) обобщили имеющиеся на тот момент ультраструктурные сведения об организации амфиесмы (рисунок 1.4). Авторы выделили несколько

типов структуры амфиесмы, основываясь на данных о степени сложности покровов у различных видов динофлагеллят. Классическая обобщенная модель амфиесмы Моррил и Леблиха (Morrill, Loeblich, 1983) предполагает наличие трех мембранных структур: 1) наружной мембраны (НМ), 2) внешней мембраны амфиесмальных пузырьков (ВМАП) и 3) внутренней мембраны амфиесмальных пузырьков (ВнМАП). НМ амфиесмы представляет собой собственно плазматическую мембрану клетки. Это подтверждается тем фактом, что именно НМ непрерывно переходит в мембрану жгутика (Soyer, 1970; Morrill, 1984).

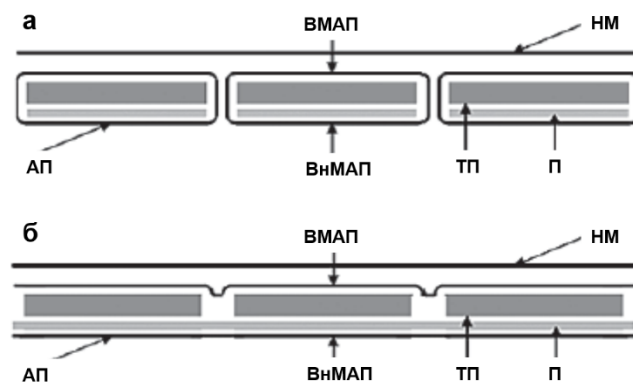


Рисунок 1.4. Планы строения амфиесмы с обособленными (а) и слитыми (б) амфиесмальными пузырьками согласно Моррилл и Леблих (Morrill, Loeblich, 1983). АП – амфиесмальный пузырек, ВМАМ – внешняя мембрана амфиесмального пузырька, ВнМАП – внутренняя мембрана амфиесмального пузырька, НМ – наружная мембрана, П – пелликула, ТП – текальная пластинка. Из: Pozdnyakov, Skarlato, 2012, с изменениями.

Неармированные (атекальные, или «голые») динофлагелляты, такие как *Ocyropsis*, *Amphidinium* и *Noctiluca*, имеют наиболее просто устроенную амфиесму. Их покровы состоят из НМ и множества отдельных АП (рисунок 1.4, а). Неармированные динофлагелляты из рода *Gymnodinium* в своих АП содержат пелликулярный слой (рисунок 1.4, а). Кроме того, АП некоторых других

представителей этого рода (*G. micrum*) слиты в структуру, содержащую непрерывный пелликулярный слой (рисунок 1.4, б).

Подобные типы организации амфиесмы характерны и для армированных динофлагеллят, чьи АП дополнительно содержат ТП из целлюлозы (рисунок 1.4) (*Heterocapsa*, *Ceratium*, *Peridinium*, *Prorocentrum*, *Zooxanthella* и др.).

Таким образом, согласно данной типологии, наиболее сложноустроенные покровы состоят из НМ и непрерывных ВМАП, текального слоя, пелликулярного слоя и ВнМАП, образованных слиянием АП, как, например, у *Zooxanthella microadriatica* (рисунок 1.4, б) (Morrill, Loeblich, 1983).

Амфиесма – динамичная структура, претерпевающая изменения в течение жизненного цикла (Morrill, 1984; Kwok and Wong, 2003). Одни виды динофлагеллят имеют сложный жизненный цикл, включающий как половое, так и бесполое поколения (напр., *Alexandrium*), в то время как жизненный цикл других состоит только из бесполой фазы (*Prorocentrum*). Кроме того, в жизненных циклах всех динофлагеллят присутствуют подвижная и неподвижная стадии (Pfiester, Anderson, 1987). Реорганизация покровов динофлагеллят была изучена на ряде модельных объектов с простыми жизненными циклами: *Heterocapsa niei* (Morrill, 1984; Höhfeld, Melkonian, 1992), *Amphidinium rhynchocephalum* (Höhfeld, Melkonian, 1992) *Glenodinium foleaceum* (Bricheux et al., 1992), *Symbiodinium* sp. (Wakefield et al., 2000), *Scrippsiella hexapraecingula* (Sekida et al., 2001), *Cryptocodinium cohnii* (Kwok, Wong, 2003).

Можно выделить три основных процесса, в результате которых происходит реорганизация амфиесмы: два типа бесполого размножения (десмошизис и элеутерошизис) и сбрасывание клеточных покровов (экдизис). Следует различать экдизис, ассоциированный с размножением (завершающий этап элеутерошизиса) и стресс-индуцированный экдизис, не связанный с делением клетки (рисунок 1.5) (Pozdnyakov, Skarlato, 2012).

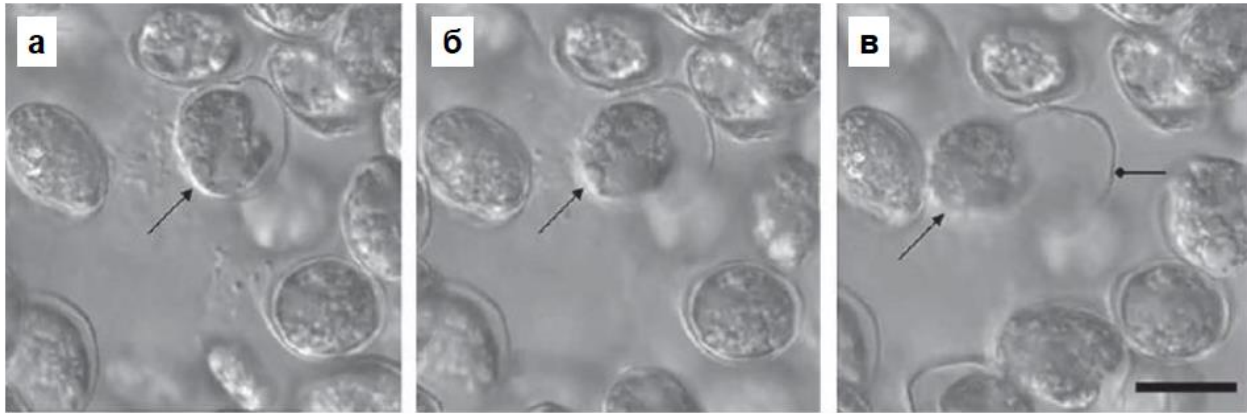


Рисунок 1.5. Стресс-индуцированный экдизис *P. minimum*. Начало (а), прогресс (б) и завершение (в) экдизиса. Треугольной стрелкой отмечена экдизирующая клетка, квадратной стрелкой отмечены сброшенные покровы. Метод микроскопии – ДИК. Масштабная линейка 10 мкм. Из: Pozdnyakov, Skarlato, 2012, с изменениями.

Экдизис представляет собой два связанных процесса: 1) сбрасывание НМ, ВМАП и текальных пластин (у армированных динофлагеллят) и 2) формирование новой плазматической (наружной) мембраны из ВнМАП с предварительным слиянием АП (Morrill, 1984). Морилл (Morrill, 1984) и Секида с коллегами (Sekida et al., 2001) показали, что мембрана вновь образованного жгутика (то есть ПМ) непрерывно переходит во ВнМАП экдизирующей клетки, что доказывает, что новая НМ формируется не *de novo*, а из ВнМАП. Важно отметить существование стадии, когда старая ПМ и ВнМАП (т.е. прекурсор новой ПМ) одновременно являются мембранами, полностью покрывающими клетку. Именно на этой стадии должны происходить важнейшие процессы перестройки везикулярной мембраны в плазматическую. Известно, что у многих видов экдизис сопровождается формированием толстой пелликулярной оболочки, которая затем также сбрасывается (Höhfeld, Melkonian, 1992, Sekida et al., 2001). Эта оболочка могла бы давать клетке дополнительную защиту во время формирования новой ПМ. Однако в настоящее время не известно, является ли процесс формирования толстой пелликулы облигатной стадией экдизиса.

Если источник формирования НМ амфиесмы известен, то вопрос происхождения АП и формирования в них ТП остается открытым до сих пор. Везерби (Wetherbee, 1975) показал наличие удлинённых везикул у *Ceratium tripos*, вероятно происходящих из цистерн аппарата Гольджи и содержащих электронноплотный материал. Эти везикулы увеличивались в размере путем слияния друг с другом. Электронноплотный материал рассматривался в этой работе как прекурсор ТП. Автор выделил два пути депозиции прекурсоров ТП: слияние этих везикул с АП в области швов (контактов соседних АП) и слияние с АП по всей их длине. Ведемаер и Вилкокс сообщали о наличии электронноплотных везикул под АП у *Peridiniopsis berolinianse* (Wedemayer, Wilcox, 1984). Похожие везикулы были обнаружены у *Heterocapsa niei* Моррил и Леблихом (Morril, 1984; Morril, Loeblich, 1984). Авторы предполагали, что эти везикулы сами по себе являются прекурсорами АП.

В то же время Бришо с соавторами (Bricheux et al., 1992) получили данные, противоречащие описанным выше наблюдениям. Исследователи наблюдали тубулярные везикулы и везикулы с нерегулярной структурой с электронноплотным или с электроннопрозрачным содержимым у *Glenodinium foliaceum*. Структуры с электронноплотным материалом сливались с плазмалеммой и высвобождали свое содержимое наружу. Этот материал не окрашивался антителами, специфично связывающимися с ТП или пелликулой. Оба этих факта ставят под сомнение вышеизложенные предположения о том, что электронноплотные везикулы являются предшественниками АП. В то же время структуры с электроннопрозрачным содержимым были названы авторами «альвеосомами» и рассматривались в качестве прекурсоров АП. Кроме того, авторы предположили, что транспорт ювенильных АП происходит по кортикальным микротрубочкам амфиесмы.

Секида с коллегами (Sekida et al., 2001) изучали формирование новых АП во время экдизиса *Scrippsiella hexapraecingula*. Они наблюдали появление электронноплотных везикул под кортикальными микротрубочками вскоре после экдизиса. Затем эти везикулы проникали в пространство между микротрубочками

и новой ПМ, со временем их число и размер увеличивались, они сливались друг с другом и формировали ТП в областях, характерных для зрелой клетки. Основываясь на этих наблюдениях, авторы предположили, что эти везикулы и являются предшественниками АП.

Таким образом, в настоящий момент имеется ряд иногда противоречащих друг другу данных относительно формирования АП и ТП. Тем не менее, может быть предложена интегральная модель формирования амфиесмы после экдизиса (Pozdnyakov, Skarlato, 2012). На подвижной стадии жизненного цикла амфиесма содержит следующие компоненты: НМ (плазмалемму), АП, которые могут содержать ТП и/или пелликулярный слой, и кортикальные микротрубочки, подстилающие АП (рисунок 1.6, а). Перед началом экдизиса клетка сбрасывает жгутики и становится неподвижной. В такой клетке отдельные АП сливаются, в результате чего клетка имеет три непрерывные мембраны: НМ, ВМАП и ВнМАП (рисунок 1.6, б). На этой стадии между ВМАП и ВнМАП под ТП формируется непрерывный защитный пелликулярный слой. У пелликулярных динофлагеллят этот слой формируется при слиянии отдельных пелликулярных слоев каждой АП. На этой стадии ВнМАП трансформируется в новую плазмалемму (НМ). Сначала новая плазмалемма подстлана лишь кортикальными микротрубочками, но вскоре небольшие везикулы, ювенильные АП, появляются между ними (рисунок 1.6, в–д). Эти везикулы концентрируются в областях, соответствующих паттерну ТП у зрелой клетки. Во время экдизиса слои над новой НМ сбрасываются. Известно, что для тех видов, у которых доказано формирование пелликулы, она сбрасывается в последнюю очередь, после того, как под ней сформируются новые жгутики (рисунок 1.6, е) (Sekida et al., 2001).

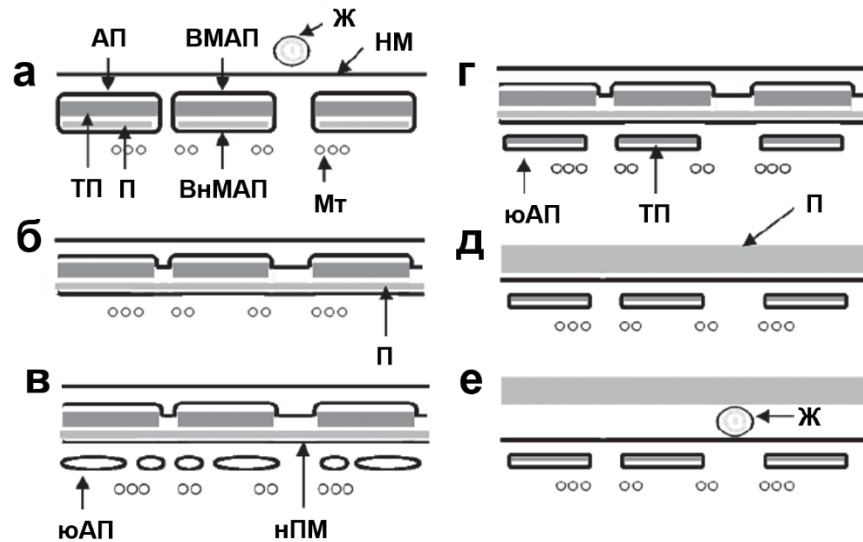


Рисунок 1.6. Обобщенная схема изменений структуры амфиесмы в ходе экдизиса. а – амфиесма подвижной клетки; б – амфиесма после сбрасывания жгутика и слияния амфиесмальных пузырьков; в – формирование новой плазматической мембраны и появление ювенильных амфиесмальных пузырьков; г – формирование текальных пластин в ювенильных амфиесмальных пузырьках; д – амфиесма клетки, прошедшей экдизис; е – появление нового жгутика. АП – амфиесмальный пузырек, ВнМАП – внешняя мембрана амфиесмального пузырька, ВнМАП – внутренняя мембрана амфиесмального пузырька, Ж – жгутик, Мт – микротрубочки, НМ – наружная мембрана, нПМ – новая плазматическая мембрана, П – пелликула, ТП – текальная пластинка, юАП – ювенильный амфиесмальный пузырек. Из: Pozdnyakov, Skarlato, 2012, с изменениями.

Однако предложенная модель в настоящее время не может рассматриваться в качестве универсальной. Во-первых, она исключает неармированных динофлагеллят, таких как *Noctiluca* и *Amphidinium*, у которых, возможно, реализуется иной механизм формирования пелликулы (Melkonian, Höhfeld, 1984; Höhfeld, Melkonian, 1992). Во-вторых, не известно, является ли стадия формирования пелликулы облигатной для всех видов динофлагеллят.

1.1.6 Экология и токсикология

Большинство видов динофлагеллят представлены морскими планктонными организмами, приспособленными для жизни как в прибрежных, так и в открытых частях морей и океанов. Кроме того, среди динофлагеллят есть пресноводные планктонные виды, представители морского бентоса, эндосимбионты, экто- и эндопаразиты других протистов и многоклеточных животных. Примерно половина всех известных видов динофлагеллят обладает строго гетеротрофным метаболизмом и осуществляет фаготрофию – поедание других организмов или твердых частиц органического вещества. Другая половина динофлагеллят имеет пластиды и, следовательно, способна осуществлять фотосинтез (Околодков, 2011). Следует отметить, что доля первичной продукции Мирового океана, обеспечиваемая динофлагеллятами, очень велика. По этому показателю они занимают второе место среди всех фототрофных протистов после диатомовых (Smayda, 2002). При этом многие фототрофные виды в действительности являются миксотрофами, т.е. сочетают черты автотрофии (фотосинтеза) и гетеротрофии (хищничества или поглощения растворенных органических веществ) (Hansen, 2011). Такое разнообразие типов метаболизма определяет сложную роль динофлагеллят в круговороте основных биогенных элементов, таких как углерод, азот и фосфор. Так, гетеротрофные представители являются консументами, фототрофные – продуцентами, а миксотрофные – и консументами, и продуцентами одновременно (Jeong et al., 2010; Матанцева, Скарлато, 2013).

В последние десятилетия увеличивающаяся антропогенная нагрузка приводит к эвтрофированию прибрежных вод во всех густонаселенных частях мира. В частности, повышается концентрация растворенных соединений азота и углерода в воде, что дает миксотрофным динофлагеллятам конкурентное преимущество по сравнению с другими представителями фитопланктона. В результате доля динофлагеллят в прибрежных сообществах возрастает. Нередко антропогенное загрязнение воды связывают и с учащением случаев «цветений»

динофлагеллят, так называемыми «красными приливами», обусловленными вспышками массового размножения этих протистов и наносящими урон экономике прибрежных регионов (Anderson et al., 2002; Glibert et al., 2005; Heil et al., 2007).

Основной вред, причиняемый рыболовному и рекреационному хозяйству, а также здоровью человека связан с тем, что многие виды, формирующие «красные приливы», также продуцируют разнообразные вторичные метаболиты, многие из которых токсичны для животных и человека. Известно, что в год происходит от 50 до 500 тысяч случаев отравления человека токсинами морских водорослей, что является причиной примерно 1,5 % всех смертельных случаев. Подавляющее большинство токсин-продуцирующих водорослей – это динофлагелляты (Wang, 2008).

Токсины динофлагеллят различны по своей химической природе: алкалоиды, азотистые основания, поликетиды, полициклические эфиры и др. Они являются причиной многих типов отравлений: паралитическое отравление (сакситоксин), нейротоксическое отравление (бреветоксин), амнезийное отравление (домоевая кислота), диарейное отравление (окадаевая кислота), отравление, связанное с рыбой цигуэтра (цигуатоксин) и др. (Cembella, 2003; Wang, 2008).

Различные токсины динофлагеллят воздействуют на различные компоненты клетки. Среди них есть как блокаторы (сакситоксин), так и активаторы (цигуатоксин) каналов Na_v , разобщители Na^+/K^+ -АТФазы (палитоксин), ингибиторы протеиновых фосфатаз (окадаевая кислота), мускориновых рецепторов и холинэстеразы (спиролиды) и др. (Cembella, 2003). В связи с этим токсины динофлагеллят широко используют для исследования сигнальных путей клетки и свойств ионных каналов (Camacho et al., 2007; Wang, 2008).

Высокая физиологическая активность вторичных метаболитов динофлагеллят делает их и фармакологически значимыми компонентами при терапии ряда серьезных заболеваний. Различные токсины используются в качестве активных компонентов фармакологических средств при лечении

наркотической зависимости (сакситоксин), онкологических заболеваний (амфидинолиды и колопсинолы, пектенотоксины, йесотоксин и др.), микозов (гониаутоксин), когнитивных дисфункций, например, шизофрении (окадаевая кислота). Кроме того, токсины динофлагеллят рассматриваются как потенциальные компоненты новых лекарств для лечения многих других заболеваний (Camacho et al., 2007).

1.1.7 Краткая характеристика модельного объекта – *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller 1933

Prorocentrum minimum (в настоящее время рассматривается как таксономический синоним *P. cordatum* (Ostenfeld) Dodge 1975; гетеротипичные синонимы: *P. triangulatum*, *Exuviella minima*, *E. marie-lebourae*, *P. cordiforme*, *P. marie-lebourae*) в системе Фенсома и соавторов принадлежит к семейству Prorocentraceae, порядку Prorocentrales и классу Dinophyceae (Fensome et al., 1993; Faust, Gualledge, 2002).

Клетки *P. minimum* (рисунок 1.7) имеют уплощенную форму различных очертаний, от овальной до треугольной. Размер клеток варьирует: 14–20 мкм в длину и 13–17 мкм в ширину. На апикальном конце клетки выходят два неравных жгутика (Petrola et al., 2003; Hajdu et al., 2005).

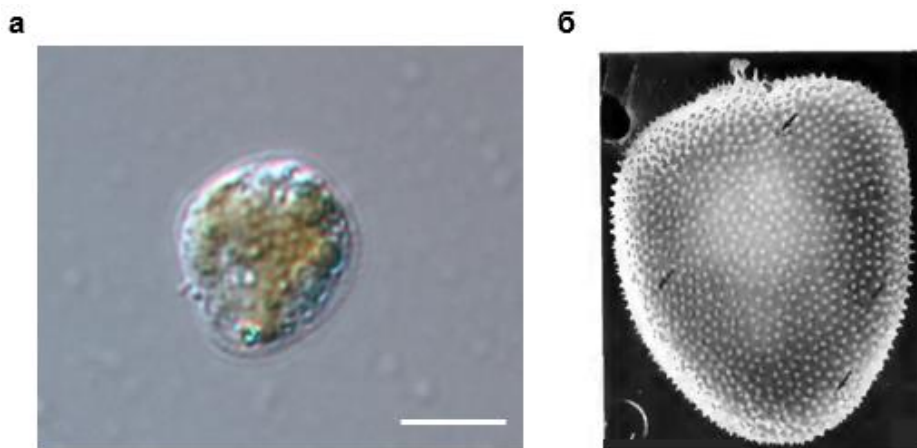


Рисунок 1.7. Микрофотографии *Prorocentrum minimum*, полученные методом ДИК (а) и с помощью сканирующей электронной микроскопии (б, из: Faust, Gualledge, 2002, с изменениями). Масштабная линейка 10 мкм.

Покровы зрелых вегетативных клеток состоят из НМ, ВМАП, целлюлозных ТП с шипиками и ВнМАП (рисунок 1.8). Амфиесмальные пузырьки слиты в две крупные вальвы, покрывающие большую часть клетки; на апикальном конце вокруг жгутиковой поры расположены еще восемь небольших АП со слоями целлюлозы внутри. Целлюлозные шипики густо распределены по обеим вальвам (295–500 шт. на каждой вальве с минимальным расстоянием друг от друга 0,4–0,7 мкм; плотность приблизительно 4 шипика на 1 мкм²) и имеют диаметр основания около 0,15 мкм при длине 0,3–0,5 мкм. Кроме того, на поверхности каждой из вальв расположено около 20 пор, которые, вероятно, являются порами трихоцист (Dodge, 1965; Petrola et al., 2003).

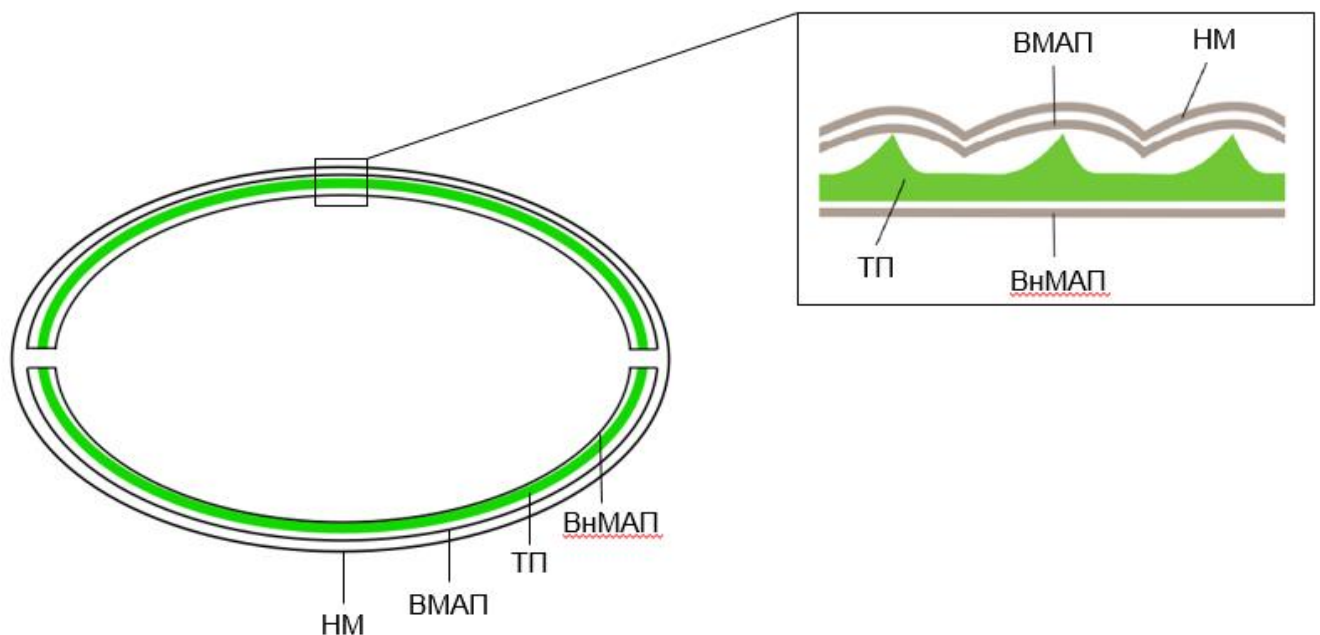


Рисунок 1.8. Схема организации покровов клетки *Prorocentrum minimum*. Вставка: увеличенный участок покровов. НМ – наружная мембрана, ВМАП – внешняя мембрана амфиесмальных пузырьков, ТП – текальные пластины, ВнМАП – внутренняя мембрана амфиесмальных пузырьков. По: Pozdnyakov et al., 2014, с изменениями.

Клетки *P. minimum*, как и клетки большинства видов динофлагеллят, содержат один динокарион с 30–34 хромосомами, постоянно конденсированными

на протяжении клеточного цикла (Dodge, 1963). Считается, что жизненный цикл этих динофлагеллят довольно прост, так как содержит исключительно вегетативную фазу. Деление вегетативной клетки происходит путем десмошизиса (Lebour, 1925; Honsell, Talarico, 1985; Hoppenrath et al., 2013).

P. minimum – космополитный вид морских фотосинтезирующих планктонных динофлагеллят, склонных к формированию обширных цветений. Часто способность этих динофлагеллят к формированию цветений связывают с наличием у них миксотрофии, то есть сочетания авто- и гетеротрофии (Heil et al., 2005). Кроме того, способность этих организмов успешно существовать в различных соленостных и температурных условиях открывает для них возможности к инвазии в новые места обитания. Так, известно, что в солоноватоводном Балтийском море *P. minimum* является видом-вселенцем, распространение которого в этом регионе началось в 1980-х годах (Hajdu et al., 2005; Petrola et al., 2005). В настоящее время *P. minimum* может доминировать по численности среди прочих видов фитопланктона Балтийского моря в летние и осенние периоды (Petrola et al., 2005).

P. minimum относят к потенциально токсичным видам: в большинстве случаев его штаммы не токсичны, однако некоторые из них были ассоциированы с различными типами отравлений у людей, употреблявших в пищу моллюсков или рыбу из цветущих вод (Heil et al., 2005). Акиба и Хаттори (Akiba, Hattori, 1949) выделили токсин венерупин, предположительно синтезируемый клетками *P. minimum*, отравление которым связано с разрушением клеток печени. Также два водорастворимых токсина, выделенных из *P. minimum* (Okaichi, Imatomi, 1979), вызывали отравление, сопровождающееся протрацией, одышкой, диареей и некрозом печени у мышей. Кроме того, токсичность некоторых клонов *P. minimum* связана с паралитическим типом отравлений (Heil et al., 2005). Несмотря на это, вопрос о токсичности данного вида динофлагеллят долгое время оставался дискуссионным, так как во многих случаях связь между отравлением моллюсками или рыбой и цветениями *P. minimum* была неоднозначной. Однако Гржебику и соавторам (Grzebyk et al., 1997) удалось получить аксеническую культуру

средиземноморского *P. minimum* и изолировать из нее фракцию водорастворимых нейротоксинов. Воздействие этих токсинов на мышей приводило к их быстрой гибели. Затем исследователи смогли выделить такую же токсичную фракцию из моллюсков, изъятых из региона, подвергшемуся длительному и крупному «цветению» *P. minimum* у французского побережья Средиземного моря.

Такие особенности *P. minimum*, как высокая степень адаптивности к широкому диапазону температуры и солености, инвазивность, способность к формированию обширных цветений и потенциальная токсичность, делают его важным модельным объектом для изучения экологии и физиологии динофлагеллят. Об особой экологической роли этого вида и повышенном интересе к нему свидетельствует то, что в 2005 году исследованиям *P. minimum* был посвящен специальный выпуск журнала *Harmful Algae* (Glibert, Sillner, 2005).

1.2 Ионные каналы

1.2.1 Общие сведения

Ионные каналы представляют собой трансмембранные белковые комплексы, опосредующие движение ионов через мембрану по градиенту их электрохимического потенциала. Важными свойствами этих комплексов являются их селективность в отношении определенного типа ионов и гейтинг, или воротная функция (т.е. наличие открытого и закрытого состояний). Ионные каналы являются участниками всех важнейших клеточных процессов, таких как возбудимость, проведение сигналов, подвижность, экзо- и эндоцитоз, пролиферация, апоптоз и многие другие (Крутецкая, Лонский, 1994; Крутецкая, Лебедев, 2000; Крутецкая и др., 2003; Hille, 2001). Эти физиологически важные трансмембранные комплексы присутствуют в мембранах любой клетки всех трех доменов живых организмов (Бактерии, Археи и Эукариоты), а также встречаются в липидных мембранах ряда оболочечных вирусов (Martinac et al., 2008).

В зависимости от ионной селективности ионные каналы можно подразделить на неселективные катионные или анионные каналы, селективные натриевые, калиевые, кальциевые, магниевые, протонные, хлорные и др. каналы (Зефилов, Ситдикова, 2010).

Под действием определенных стимулов ионные каналы могут переходить из закрытого состояния в открытое. В зависимости от природы стимула ионные каналы разделяют на несколько типов: 1) потенциал-управляемые ионные каналы, активирующиеся при изменении мембранного потенциала; 2) светочувствительные ионные каналы, активирующиеся под действием света с определенной длиной волны; 3) механочувствительные каналы, активирующиеся при действии механического стимула; 4) pH-зависимые каналы; 5) ионные каналы, управляемые изменениями температуры; 6) лиганд-управляемые каналы, активирующиеся под действием вне- или внутриклеточного лиганда (Martinac et al., 2008; Зефилов, Ситдикова, 2010). Помимо способности к активации, многие каналы обладают особыми механизмами инактивации, также запускаемыми различными физическими и/или химическими стимулами (Hille, 2001).

Поскольку ионные каналы играют очень важную роль в физиологических процессах всех организмов, включая человека, нарушения в их структуре и функциях приводят ко множеству серьезных патологий – каналопатий. Вследствие этого ионные каналы рассматриваются, прежде всего, как объекты биомедицинских технологий (Зефилов, Ситдикова, 2010). Однако вовлеченность ионных каналов в разнообразные процессы жизнедеятельности любой клетки делает их объектом интереса и для экофизиологических исследований. У микроорганизмов пассивный транспорт ионов, помимо важнейших клеточных процессов, опосредует и такие экологически-значимые процессы как таксисы и взаимодействие хищник-жертва (Martinac et al., 2008; Verret et al., 2010; Taylor et al., 2012; Echevarria et al, 2014; Echevarria et al, 2015).

Пора ионного канала образована одной (например, потенциал-управляемые натриевые каналы), но чаще несколькими (например, потенциал-управляемые калиевые каналы) трансмембранными белковыми субъединицами. Также в ряде

случаев ионный канал может иметь более одной поры (например, потенциал-управляемые хлорные каналы из семейства CLC). Пора ионного канала имеет устья по обе стороны мембраны и селективный фильтр, образованный кольцом определенных аминокислотных остатков. Кроме того, способность канала к инактивации часто связана с наличием воротных структур (рисунок 1.9) (Hille, 2001; Jegla et al., 2009).

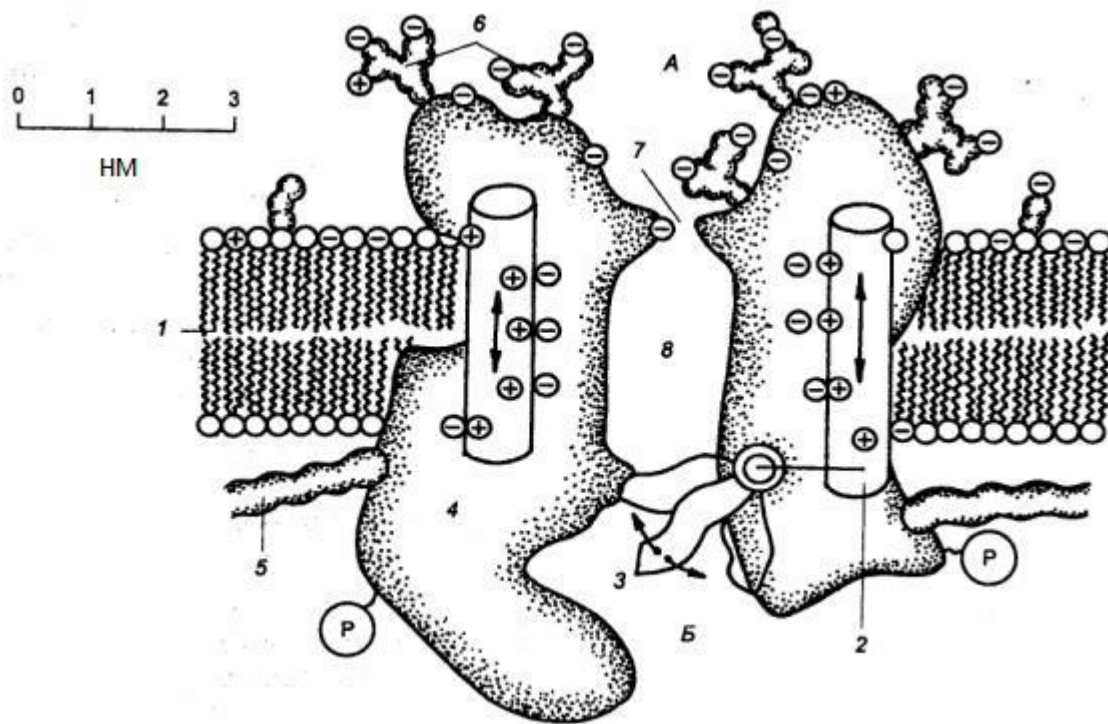


Рисунок 1.9. Строение потенциал-управляемого ионного канала. А – наружное устье, Б – внутреннее устье, 1 – бислойная мембрана, 2 – сенсор напряжения, 3 – ворота, 4 – порообразующая белковая субъединица, 5 – якорный белок, 6 – полисахаридные группы, 7 – селективный фильтр, 8 – пора канала, Р – участки фосфорилирования. Из: Hille, 2001, с изменениями.

Наряду с порообразующими субъединицами в комплекс ионного канала могут входить как мембраносвязанные, так и водорастворимые регуляторные субъединицы, не участвующие в образовании поры, но влияющие на кинетику активации и инактивации канала (Hille, 2001). Так, потенциал-управляемые кальциевые каналы Ca_v1 кроме порообразующей $\alpha1$ субъединицы имеют

дополнительные мембраносвязанные α_2/δ и γ субъединицы и водорастворимую β субъединицу (рисунок 1.10) (Khosravani, Zamponi, 2006).

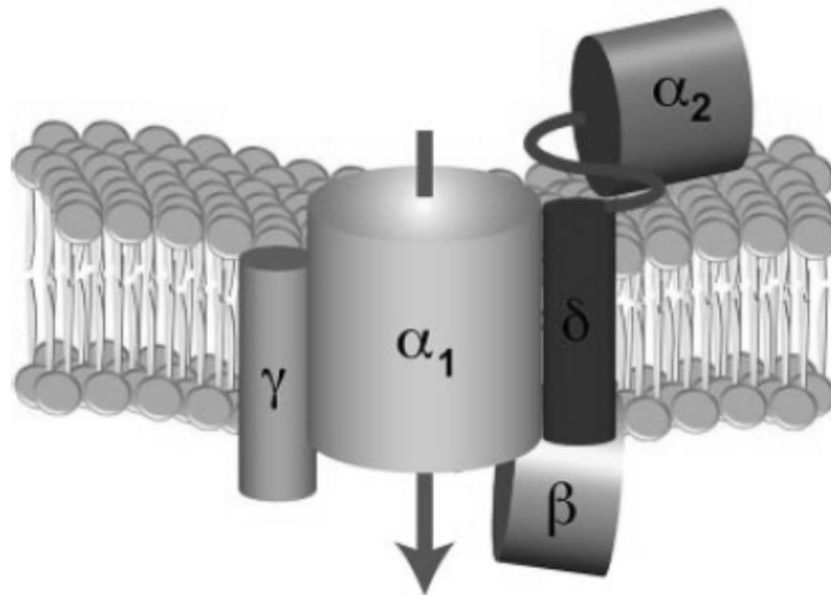


Рисунок 1.10 Схема строения потенциал-управляемого кальциевого канала Ca_v1 . α_1 – порообразующая субъединица, α_2 , β , γ – вспомогательные субъединицы, стрелка – поток ионов. Из: Khosravani, Zamponi, 2006, с изменениями.

На основании гомологии аминокислотных последовательностей порообразующих субъединиц ионные каналы подразделяются на ряд генетических семейств и суперсемейств. Так, выделяют обширное суперсемейство потенциал-управляемых катионных каналов, включающее в себя большинство известных на сегодняшний день групп катионных каналов. Наряду с этим суперсемейством у многоклеточных животных, грибов и растений выделяют также семейства ионотропных глутаматных рецепторов, потенциал-управляемых хлорных каналов, Cys-loop-рецепторов, эпителиальных натриевых каналов, каналов Orai, рианодиновых рецепторов, рецепторов инозитол-4,5-бисфосфата, P2X-рецепторов и др. (Jegla et al., 2009).

1.2.2 Суперсемейство потенциал-управляемых катионных каналов

Большинство известных семейств ионных каналов прокариот и эукариот объединены в суперсемейство потенциал-управляемых катионных каналов (ПКК). Данное суперсемейство выделяется на основании гомологии аминокислотных последовательностей каналов и их доменной организации (рисунок 1.11). При этом необходимо отметить, что не все его представители в действительности активируются при изменении мембранного потенциала. Само же название «потенциал-управляемые катионные каналы» указывает лишь на то, что исторически первыми описанными ионными каналами из этой группы стали каналы, действительно активирующиеся при сдвигах мембранного потенциала: потенциал-управляемые калиевые, натриевые и кальциевые каналы. Широко распространенным в литературе является название «потенциал-управляемые *ионные* каналы», не указывающее на катионную селективность представителей этого суперсемейства. Между тем, селективность к катионам – это непременное свойство всех его представителей. В данной работе мы придерживаемся варианта «потенциал-управляемые *катионные* каналы», чтобы подчеркнуть обособленность этой группы ионных каналов от потенциал-управляемых анионных каналов и, в частности, от потенциал-управляемых хлорных каналов из неродственного семейства CLC (Hille, 2001; Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009).

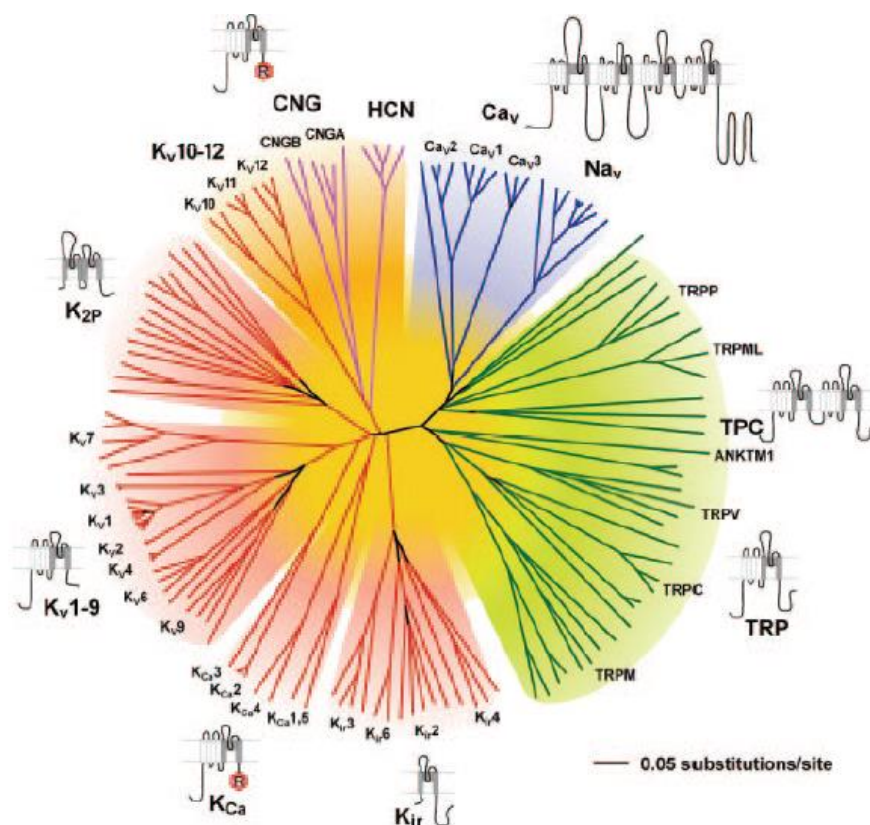


Рисунок 1.11. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей порового региона различных представителей суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов. Из: Yu et al., 2005.

На рисунке 1.12 представлены варианты структурной организации, характерные для представителей различных семейств ионных каналов, относящихся к суперсемейству ПКК. Общая структурная единица для большинства представителей данного суперсемейства – два трансмембранных сегмента (TM1 и TM2 или S5 и S6) с поровой петлей (P-loop) между ними. К каналам с такой организацией относится семейство калиевых каналов входящего выпрямления (K_{ir}) (рисунок 1.12, а) (Jegla et al., 2009).

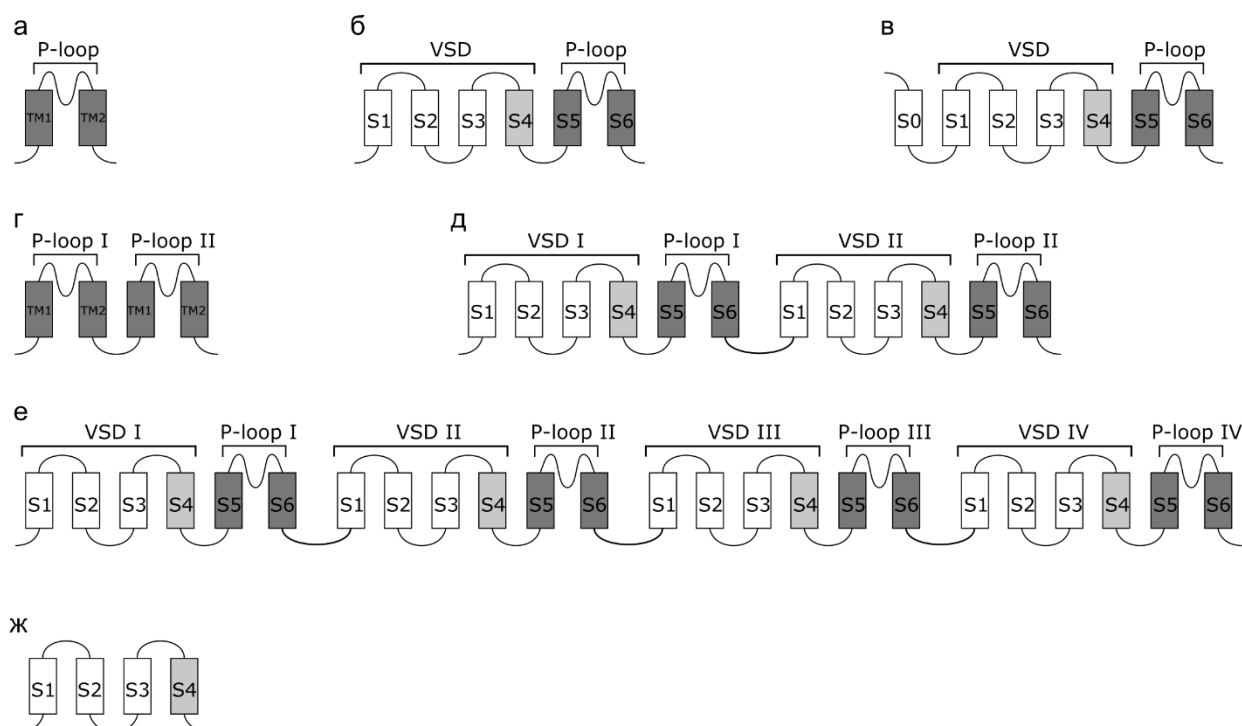


Рисунок 1.12. Общая схема структурной организации ионных каналов суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов: калиевого канала входящего выпрямления K_{ir} (а), потенциал-активируемого калиевого канала K_v , каналов EAG, HCN/CNG и TRP (б), кальций-зависимого калиевого канала K_{Ca} (в), калиевых каналов утечки K_{2P} (г), каналов TRP (д), потенциал-активируемых кальциевых Ca_v , натриевых Na_v и NALCN-каналов (е), и потенциал-активируемого протонного канала H_v (ж). P-loop – поровая петля, VSD – потенциал-чувствительный домен, TM1–TM2 и S0–S6 – трансмембранные сегменты, I–IV – порядковый номер домена. Из: Поздняков, Скарлато, 2015, с изменениями.

Большая группа ионных каналов, включающая в себя несколько семейств, имеет дополнительно 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 (рисунок 1.12, б). К каналам с такой доменной организацией относятся потенциал-управляемые

калиевые каналы (K_v), бактериальные потенциал-управляемые натриевые каналы (NaBacCh), 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 кальций-зависимые калиевые каналы (K_{Ca}), имеющие в N-концевой области дополнительный трансмембранный сегмент S0 (рисунок 1.12, в). Домен с сегментами S1–S6, в котором участок S5-P-loop-S6 гомологичен участку TM1-P-loop-TM2, образует одну субъединицу ионного канала, функционирующего в клеточной мембране как тетрамер. С-концевой участок всех этих каналов несет ряд дополнительных доменов, выполняющих функции тетрамеризации канальных субъединиц, а также функцию связывания различных вторичных посредников (Hille, 2001; Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009).

Также к суперсемейству ПКК относятся двухпоровые калиевые каналы (K_{2P}), представляющие собой удвоенную структуру [TM1–P-loop–TM2], каждая из которых гомологична каналам K_{ir} (рисунок 1.12, г) (Jegla et al., 2009).

Субъединицы так называемых двухпоровых кальциевых каналов (two-pore calcium channels, TPC) образованы двумя доменами [S1–S6] (рисунок 1.12, д), каждый из которых гомологичен каналам K_v (Jegla et al., 2009). В то же время существует большое семейство четырехдоменных ионных каналов, субъединица которых образована четырьмя гомологичными доменами [S1–S6] (рисунок 1.12, е). К таким каналам относятся потенциал-управляемые кальциевые каналы, активирующиеся при высоких потенциалах (HVA Ca_v), потенциал-управляемые кальциевые каналы, активирующиеся при низких потенциалах (LVA Ca_v), потенциал-управляемые натриевые каналы (Na_v) (Hille, 2001), а также потенциал-независимые натриевые каналы утечки (Na^+ -leak channels, NALCN) животных и потенциал-независимые кальциевые каналы грибов (Cch) (Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009).

Особую группу каналов представляют собой потенциал-управляемые протонные каналы (H_v). Субъединицы этих каналов образованы лишь одним

доменом [S1–S4], гомологичным VSD (рисунок 1.12, ж). Таким образом, эти каналы лишены характерной для остальных представителей суперсемейства ПКК поровой структуры, образованной [TM1–P-loop–TM2], и относятся к ряду гомологии доменов VSD, которыми также обладают потенциал-чувствительные фосфатазы. Однако каналы H_v традиционно рассматриваются в качестве членов суперсемейства ПКК (DeCoursey, 2008; Jegla et al., 2009).

Ионные каналы из семейства ионотропных глутаматных рецепторов (GLUR), представителями которых являются NMDA, AMPA и каинатные рецепторы многоклеточных животных, по-видимому, имеют общее происхождение с каналами суперсемейства ПКК. Вероятно, семейство GLUR обособилось довольно рано, еще до появления эукариот (Jegla et al., 2009). Традиционно это семейство не включается в состав суперсемейства ПКК и поэтому не рассматривается в настоящей работе.

1.2.3 Эволюция четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов

Каналы семейства ЧД ПКК играют ключевую роль в генерации такого фундаментального с точки зрения клеточной физиологии процесса как потенциал действия (ПД). По этой причине их появление у эукариот связывают с эволюцией механизмов возбуждения и межклеточного сигналинга, а также с эволюцией нервной системы многоклеточных животных (Hille, 2001). В последние годы в области изучения эволюции ЧД ПКК были достигнуты большие успехи благодаря все большей доступности геномных данных по различным группам эукариот. Стало очевидным, что для того чтобы лучше понимать как эволюцию нервной системы животных, так и эволюцию самих четырехдоменных каналов, необходимо исследовать эти каналы не только у животных, но и у других эукариот (Liebeskind et al, 2011; Barzilai et al., 2012; Cai, 2012).

В связи с тем, что эволюция ЧД ПКК не может быть отделена от эволюции самих эукариот, необходимо дать краткий очерк современных воззрений на филогению Eukaryota.

Большинством исследователей в настоящее время признается система, которая разделяет всех организмов на три домена: Bacteria, Archaea и Eukaryota (Woese et al., 1990). Домен Eukaryota, в свою очередь, делится на царства, число которых варьируется в системах разных авторов. Современные методы реконструкции филогении не дают возможности полностью разрешить эволюционное древо эукариот, что может быть связано со «взрывообразным» характером эволюции этой группы организмов на самых ранних ее этапах (рисунок 1.13) (Adl et al., 2012). В результате на современных филограммах древо эукариот имеет неопределенную топологию в отношении многих ветвей. Тем не менее, целый ряд филетических линий ядерных организмов группируется в крупные хорошо очерченные клады – безранговые супергруппы, порядок ветвления между которыми, впрочем, остается неопределенным (Фролов, Костыгов, 2013). Супергруппа Opisthokonta включает в себя грибы (Fungi), животных (Metazoa), сестринских им хоанофлагеллят (Choanoflagellata) и некоторые другие группы протистов. Супергруппа Archaeplastida объединяет высших растений (Embryophyta), зеленых (Chlorophyta) и красных (Rodophyta) водорослей, а также глаукофитовых (Glaucophyta). SAR объединяет большое количество групп протистов, включая Stramenopiles (например, диатомовые, бурые и рафидофитовые водоросли и оомицеты), Alveolata (динофлагелляты, инфузории и споровики) и Rhizaria (например, церкозои и фораминиферы). Множество эукариот также объединены в супергруппы Amoebozoa и Excavata. Кроме того, существует большое количество филетических линий одноклеточных эукариот, не входящих ни в одну из перечисленных супергрупп (Adl et al., 2012). Тем не менее, по последним литературным данным, одна из таких ветвей – Apusozoa – образует общую кладу с супергруппой Opisthokonta и является сестринской по отношению к последней (Cavalier-Smith et al., 2014).

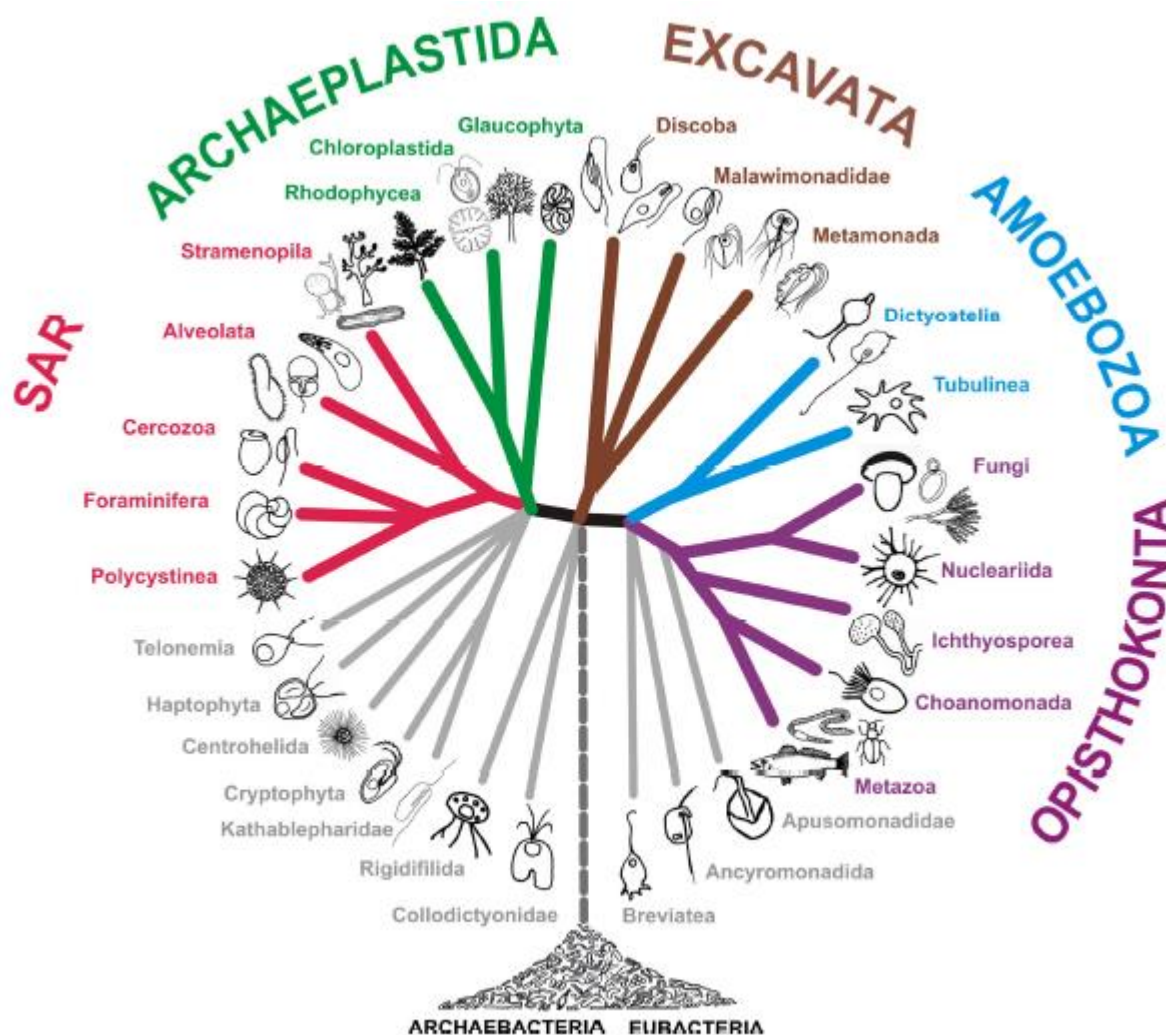


Рисунок 1.13. Эволюционное древо эукариот. Из Adl et al., 2012.

Суперсемейство ПКК представлено во всех трех доменах живых организмов, что свидетельствует о его раннем появлении в биологической эволюции. Дивергенция внутри него началась еще у прокариот (Martinac et al., 2008). По-видимому, предковым каналом для этого суперсемейства был катионный (вероятно, калиевый) канал, по своей структурной организации напоминающий каналы семейства K_{ir} . Одним из ключевых моментов эволюции суперсемейства стало появление дополнительного модуля, обеспечившего способность канала сопрягать гейтинг с изменением мембранного потенциала, — домена VSD. В результате быстрой дивергенции этой группы каналов возникло основное разнообразие современных семейств, входящих в состав суперсемейства ПКК (Yu et al., 2005; Jegla et al., 2009; Moran et al., 2015).

В настоящее время существуют весомые доказательства того, что еще до появления многоклеточных животных произошли два последовательных раунда дупликации гена, кодировавшего катионный канал с организацией [S1-S6] и напоминавшего представителей семейства TRP. Результатом первого раунда стало появление двухдоменных каналов, к которым относятся каналы TRP. Результатом второго раунда дупликации стало появление крупного семейства – семейства четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов (ЧД ПКК) (Jegla et al., 2009). В составе ЧД ПКК выделяют пять подсемейств каналов животных (HVA Ca_v , LVA Ca_v , Na_v и NALCN) и грибов (Cch) (Liebeskind et al., 2012).

Эволюция именно этого семейства ПКК долгое время приковывает внимание ученых, поскольку представители ЧД ПКК обеспечивают возбудимость клеток многих групп эукариот, в том числе электровозбудимых тканей многоклеточных животных, играя ключевую роль в формировании ПД (Hille, 2001; Liebeskind et al., 2011; Barzilai et al., 2012; Cai, 2012).

HVA Ca_v – это каналы Ca_v1 , ответственные за кальциевый ток L-типа, и Ca_v2 , разные подгруппы которых обеспечивают кальциевый ток N, P/Q и R-типов. LVA Ca_v – это каналы Ca_v3 , обеспечивающие кальциевый ток T-типа (Jegla et al., 2009). Хотя предполагается, что оба подсемейства каналов Ca_v имеют общее происхождение от одной предковой последовательности, на сегодняшний день нет четких доказательств этого предположения, поскольку: 1) филогенетический анализ не всегда дает общий узел для этих подсемейств, часто эти каналы группируются в две независимые клады; 2) общие узлы, если и есть, часто не имеют высокой статистической поддержки (Liebeskind et al., 2012; Moran, Zakon, 2014). Таким образом, в настоящее время подсемейства HVA Ca_v и LVA Ca_v следует рассматривать как две независимые группы (подсемейства) ЧД ПКК.

По последним литературным данным подсемейства HVA Ca_v и LVA Ca_v появились по крайней мере до расхождения Metazoa и Choanoflagellata. Следует отметить, что в некоторых работах появление каналов Ca_v относят ко времени до обособления всей супергруппы Opisthokonta (Verret et al., 2010; Cai, 2012; Moran,

Zakon, 2014). Однако при более пристальном взгляде на предлагаемые авторами филограммы очевидно, что гомологи каналов Ca_v из линий эукариот, не относящихся к опистоконтам, не формируют общих клад с представителями подсемейств HVA Ca_v или LVA Ca_v , хотя функционируют как потенциал-управляемые кальциевые каналы и входят в состав семейства ЧД ПКК.

Долгое время считалось, что появление подсемейства потенциал-управляемых натриевых каналов Na_v связано с возникновением и эволюцией нервной системы у многоклеточных животных (Metazoa) (Strong et al., 1993; Armstrong and Hille, 1998; Hille, 2001). Гипотеза основывалась на имеющихся на тот момент филогенетических построениях, которые, в свою очередь, зависят от полноты данных по последовательностям ЧД ПКК. Предполагалось, что каналы Na_v произошли от неких предковых потенциал-управляемых кальциевых или натрий/кальциевых каналов, характерных для ряда одноклеточных эукариот, на поздних этапах эволюции одновременно с формированием группы Metazoa и возникновением нервной системы. Эта гипотеза хорошо согласуется с тем, что разделение натрий- и кальций-проводящих сигнальных систем необходимо для быстрого и точного проведения нервного импульса по нервной системе посредством ионов натрия, так как ионы кальция вовлечены в огромное количество других важных внутриклеточных процессов.

Однако работы последних лет показали, что подсемейство Na_v появилось не только до возникновения нервной системы (Liebeskind et al., 2011), но и, по-видимому, до появления многоклеточности, а точнее до расхождения групп Opisthokonta и Apusozoa (Cai, 2012) (рисунок 1.14). Необходимо отметить, что в настоящее время для анализа доступны последовательности только одного вида апусомонад – *Thecamonas trahens*, а из нескольких найденных у этого организма гомологов ЧД ПКК лишь один группируется с подсемейством Na_v , еще один – с каналами NALCN и Cch, а остальные не группируются ни с одним из известных подсемейств (Cai, 2012; Liebeskind et al., 2012).

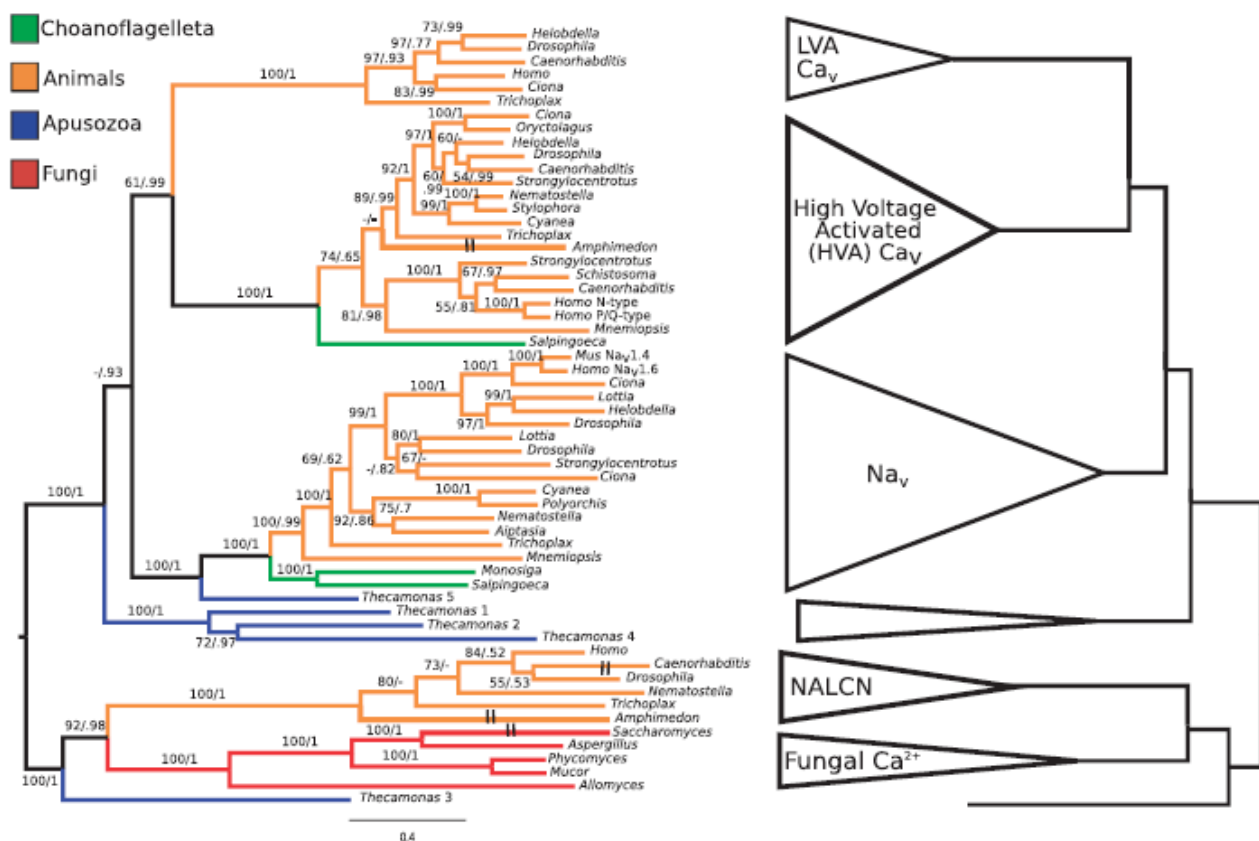


Рисунок 1.14. Филогения каналов ЧД ПКК Opisthokonta. Из: Liebeskind et al., 2012.

За время, прошедшее с момента выдвижения этой гипотезы, было установлено, что каналы Na_v более гетерогенны, чем считалось ранее. Каналы этого подсемейства могут быть разделены на 2 родственные группы: Na_v1 , классические потенциал-управляемые каналы, селективные для ионов натрия, и Na_v2 , потенциал-управляемые каналы, преимущественно проводящие ионы кальция. Первые имеют селективный фильтр, образованный определенным аминокислотным остатком из P-loop каждого из четырех доменов канала, D/E/K/A. Большинство каналов Na_v2 имеют селективный фильтр вида D/E/E/A (D/E/E/S у *T. trahens*) и являются неселективными каналами, проводящими ионы натрия, калия и кальция, с выраженным предпочтением к ионам кальция. В свою очередь, селективный фильтр каналов Ca_v1 , селективных в отношении ионов кальция, имеет вид E/E/E/E. Таким образом, важно отметить, что большинство

известных представителей подсемейства Na_v функционируют как кальциевые каналы (Liebeskind et al., 2011; Barzilai et al., 2012).

Недавно было показано, что натриевая селективность в подсемействе Na_v появлялась по крайней мере два раза независимо: у *Bilateria* (каналы Na_v1) и у *Cnidaria* (среди каналов Na_v2 *Meduzozoa*). Каналы $Na_v2.5$ медуз имеют селективный фильтр не D/E/E/A, как у остальных радиально- и билатеральносимметричных животных, а D/K/E/A. Натриевая селективность этих каналов (впрочем, меньшая, чем для каналов с фильтром D/E/K/A) была доказана экспериментально (Barzilai et al., 2012). Таким образом, замена одного из остатков отрицательно заряженного глутамата на положительно заряженный остаток лизина, дважды и независимо произошедшая в эволюции *Bilateria* и *Cnidaria*, привела к возникновению двух групп натрий-селективных каналов внутри подсемейства Na_v , которое по преимуществу является кальций-проводящим.

Именно кальций-проводящие каналы Na_v2 доминировали у многоклеточных животных до появления натрий-селективных каналов Na_v1 . Так, базальные линии *Metazoa* (книдарии, гребневики и пластинчатые) имеют исключительно Na_v2 каналы, членистоногие имеют по 1 гену Na_v1 и Na_v2 , а позвоночные – 9–10 генов каналов Na_v1 (Jegla et al., 2009; Barzilai et al., 2012). Вероятно, появление натриевой селективности в подсемействе Na_v давало преимущество в связи с усложнением нервной системы. Это преимущество, прежде всего, могло быть связано с разделением внутриклеточного кальциевого сигналинга, регулирующего многие жизненно важные процессы в клетке, и собственно нейронального сигналинга, то есть передачи нервных импульсов от клетки к клетке. Более того, ток ионов калия, которые вместе с ионами кальция и натрия проходят через каналы Na_v2 , терминирует ПД и реполяризует мембрану, в то время как ток ионов натрия, наоборот, деполяризует мембрану и составляет начальную фазу ПД. Таким образом, очевидно и преимущество появления натрий-селективных каналов с точки зрения разделения двух антагонистических функций.

Под действием отбора той же направленности могли появиться и натрий-селективные каналы $Na_v2.5$ у медуз, для которых характерны быстрая реакция на стимулы и наиболее сложные паттерны поведения среди всех кишечнополостных. Однако следует отметить, что эти каналы экспрессируются лишь в небольшой подгруппе клеток, в то время как большинство нервных клеток медуз экспрессирует именно кальций-проводящие каналы $Na_v2.1-4$. Это свидетельствует о том, что основную роль в нервной системе таких животных все-таки играет кальциевый сигналинг. Более того, вероятно, именно кальциевые каналы дают преимущество в наиболее просто устроенных нервных системах, таких как нервные системы кишечнополостных и гребневиков (Barzilai et al., 2012). Кроме того, некоторые другие линии животных с относительно просто устроенной нервной системой (например, нематоды и иглокожие), по-видимому, вторично утратили натрий-селективные каналы (Jegla et al., 2015). Важная роль кальций-проводящих каналов Na_v2 в функционировании нервных систем животных может объяснить и факт сосуществования этих каналов вместе с каналами Na_v1 во многих линиях Metazoa.

Подсемейство NALCN, обнаруженное не так давно, включает в себя представителей потенциал-независимых четырехдоменных каналов, функционирующих как каналы утечки ионов натрия в нейронах позвоночных животных. Хотя они и не имеют строгой селективности к натрию, в физиологических условиях они проводят преимущественно ионы натрия и имеют селективный фильтр E/E/K/E (Lu et al., 2007). Однако многие каналы из этого подсемейства, обнаруженные у беспозвоночных, проводят кальций (селективный фильтр E/E/E/E). Было показано, что, подобно каналам Na_v , среди каналов NALCN способность проводить преимущественно ионы натрия возникала по крайней мере дважды. У позвоночных есть только один вариант канала NALCN с фильтром E/E/K/E. В то же время для моллюсков характерно разнообразие каналов NALCN, создаваемое за счет альтернативного сплайсинга. Одни продукты такого сплайсинга являются кальциевыми каналами с фильтром E/E/E/E, а другие – натриевыми каналами с селективным фильтром E/K/E/E.

Первая сплайс-форма в основном экспрессируется в клетках сердечной мышцы (с кальциевым ПД), в то время как вторая сплайс-форма экспрессируется преимущественно в клетках центральной нервной системы (с натриевым ПД) (Senatore et al., 2013).

Грибы – это линия опистоконт, которая утратила все гены семейства ЧД ПКК, за исключением обособленных генов, кодирующих потенциал-независимые кальциевые каналы Csch. В работе Морана и Закона (Moran, Zakon, 2014) было показано, что каналы Csch в действительности образуют общую кладу с каналами NALCN и одной из последовательностей апусомонад *T. trahens*, следовательно, обособлению каналов Csch предшествовало появление общего предка всех этих каналов еще до разделения линий Apusozoa и Opisthokonta (Liebeskind et al., 2012).

Обобщая современные данные по эволюции каналов семейства ЧД ПКК, можно предполагать, что предковые ЧД ПКК представляли собой группу кальциевых потенциал-управляемых каналов. Натриевая селективность появлялась независимо несколько раз среди ЧД ПКК в линии Metazoa и связана с аминокислотной заменой глутамата на лизин в поровой петле II или III домена. Таким образом, современные данные позволяют уточнить гипотезу о том, что появление потенциал-управляемых натриевых каналов связано с возникновением нервной системы. Вероятно, подсемейство потенциал-управляемых натриевых каналов (Na_v) возникло задолго до появления Metazoa, а с эволюцией нервной системы животных связано появление потенциал-управляемой натриевой селективности как таковой в этом подсемействе и, вероятно, появление в подсемействе NALCN потенциал-независимой натриевой проводимости, играющей важную роль в ритмической активности нейронов.

1.2.4 Метод локальной фиксации потенциала на мембране

Метод локальной фиксации потенциала на мембране (patch-clamp) был разработан в 1980-е годы (Hamill et al., 1981), за что Эрвин Неер и Берт Сакман были удостоены Нобелевской премии в 1991 г. В основе этого метода лежат

способность стеклянной микропипетки с диаметром отверстия 1–2 мкм образовывать плотный контакт с клеточной мембраной с сопротивлением более 1 ГОм и фиксация потенциала на ограниченном микропипеткой участке мембраны (рисунок 1.15). Данный метод позволяет регистрировать как интегральный ионный ток через всю поверхность клетки, так и ток через единичные ионные каналы (Sakmann, Neher, 2009).

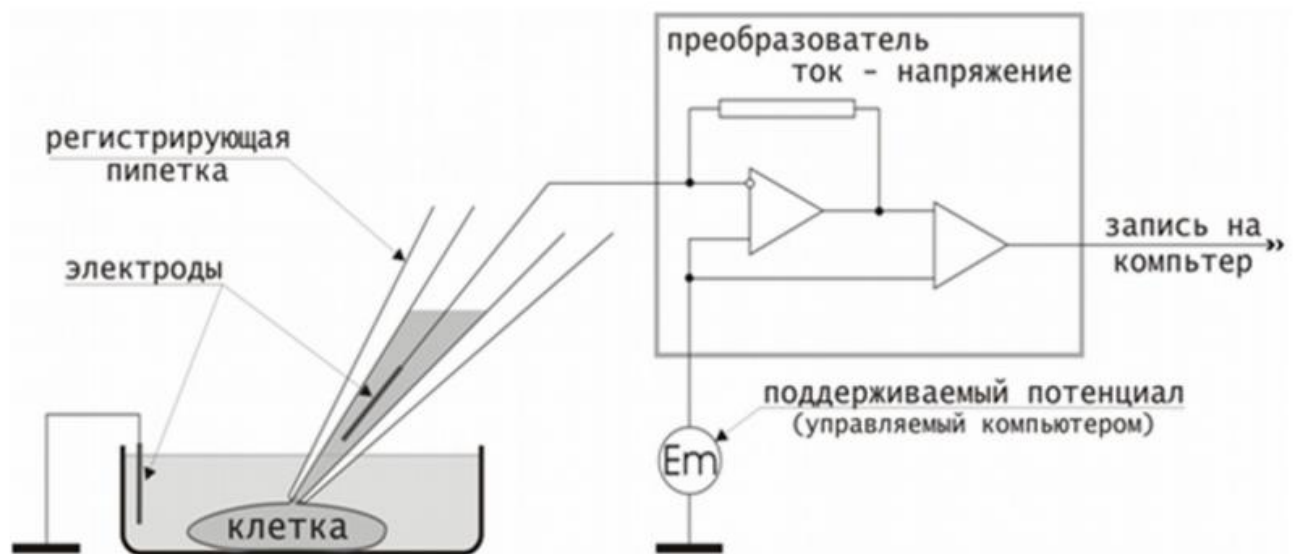


Рисунок 1.15. Упрощенная схема регистрации трансмембранных ионных токов методом локальной фиксации потенциала на мембране.

В настоящее время существует несколько конфигураций метода локальной фиксации потенциала на мембране, служащих разным задачам. Исходной является конфигурация «cell-attached» (клетка прикреплена), предполагающая формирование плотного контакта между стеклянной микропипеткой и мембраной клетки (рисунок 1.16, а). Этот подход позволяет регистрировать ионные токи через одиночные каналы неповрежденной клетки. Однако его недостаток состоит в отсутствии доступа регистрирующего электрода к цитозолю и, как следствие, в невозможности прямого измерения трансмембранного потенциала. Эта проблема решается использованием внешних растворов, близких по ионному составу к цитозолю. Использование таких растворов приводит к «обнулению» мембранного

потенциала клетки. Однако для применения данного подхода необходима информация об ионном составе цитозоля. Такая информация отсутствует в случае большинства микроорганизмов, поэтому конфигурация «cell-attached» может быть применена с ограничениями (Mollemann, 2003).

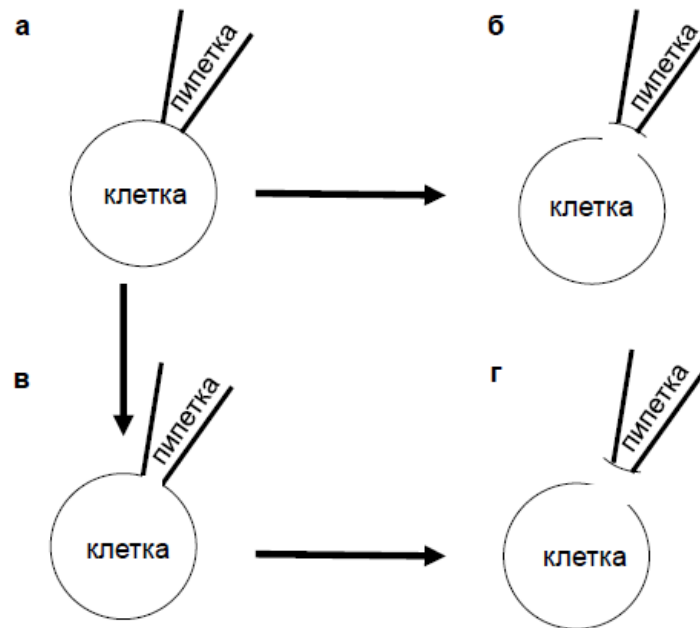


Рисунок 1.16. Конфигурации метода локальной фиксации потенциала на мембране: «cell-attached» (а), «whole-cell» (б), «inside-out» (в), «outside-out» (г).

Этого недостатка лишена конфигурация «whole-cell» (целая клетка). При данном подходе после получения плотного контакта между микропипеткой и клеточной мембраной в микропипетке создается отрицательное гидростатическое давление, достаточное, чтобы прорвать часть мембраны под кончиком микропипетки (рисунок 1.16, б). Таким образом, регистрирующий электрод имеет прямой контакт с внутриклеточным раствором, и трансмембранный потенциал может быть измерен. Так как под кончиком микропипетки мембрана клетки разрушена, а электрод имеет доступ к цитозолю, регистрируемый ток является интегральным ионным током, протекающим через поверхность всей клетки (Mollemann, 2003).

Еще одной конфигурацией метода локальной фиксации потенциала, позволяющей изучать активность одиночных каналов, является конфигурация «inside-out» (внутренняя сторона мембраны обращена в наружный раствор). После получения исходной конфигурации «cell-attached», часть мембраны, прикрепленная к стеклянной микропипетке, отрывается от остальной клеточной мембраны (рисунок 1.16, в). В результате внутриклеточная сторона изолированного участка мембраны оказывается обращенной во внешний раствор, а ее внешняя поверхность – в раствор стеклянной микропипетки. В данной конфигурации исследователь полностью контролирует трансмембранный потенциал на участке мембраны (Mollemann, 2003).

Четвертая конфигурация данного метода – «outside-out» (внешняя сторона мембраны обращена в наружный раствор) также позволяет регистрировать активность одиночных каналов. После получения исходной конфигурации «whole-cell», часть мембраны, прикрепленная к стеклянной микропипетке, отрывается от остальной клеточной мембраны (рисунок 1.16, г). При этом внутриклеточная сторона изолированного участка мембраны оказывается обращенной в раствор микропипетки, а ее внешняя поверхность – в наружный раствор (Mollemann, 2003).

Метод локальной фиксации потенциала был разработан и адаптирован, в первую очередь, для изучения ионных каналов животных клеток. В отличие от большинства типов клеток животных, клетки микроорганизмов чаще всего обладают сложно организованными покровами и/или подвижностью, препятствующими образованию плотного контакта. Важно отметить, что вследствие высокого морфологического разнообразия микроорганизмов (бактерий, архей и протистов), задача адаптации этого метода для работы с ними не имеет универсального решения (Taylor, Brownlee, 2003; Martinac et al., 2008).

1.3 Ионные каналы динофлагеллят

Большая часть литературных данных об ионных каналах динофлагеллят была получена в результате электрофизиологических исследований ночесветки *Noctiluca miliaris* (syn. *N. scintillans*) с использованием прокалывающих электродов. *N. miliaris* представляет собой удобный электрофизиологический объект, так как, в отличие от многих других динофлагеллят, это весьма крупные (диаметром до 200 мкм) практически неподвижные клетки, не имеющие целлюлозных пластин. Особенностью ночесветок является наличие двух функционально разделенных систем возбуждения: система, запускающая биолюминесценцию, и система, регулирующая движения ловчего щупальца (тентакля) (Eckert, Sibaoka, 1967).

Впервые ночесветки *N. miliaris* (*N. scintillans*) были исследованы электрофизиологически Хисадой в 1957 году (Hisada, 1957). С помощью техники прокалывающих электродов автор провел измерения потенциала покоя (ПП) этих клеток, а также зарегистрировал необычные гиперполяризационные ПД (ПД с обратной по отношению к ПД других типов клеток полярностью). ПП имел обратную зависимость от внеклеточной концентрации K^+ . В дальнейшем было установлено, что ночесветки имеют два вида ПД, обеспечиваемых разными механизмами и возникающих по принципу «все или ничего». (Chang, 1960; Eckert, 1965a; Eckert, Sibaoka, 1967).

ПД, обеспечивающий запуск люминесценции (ЛПД), возникает на мембране флотационных вакуолей, занимающих практически весь объем клетки (в то время как цитозоль представлен лишь перинуклеарным пространством и узкими тяжами между крупными вакуолями). Генерация ЛПД на мембране вакуоли объясняет его обратную полярность, поскольку при его регистрации из перинуклеарного пространства ЛПД имеет «нормальную» полярность (Eckert, Sibaoka, 1968). Следует отметить, что на сегодняшний день ночесветки – это единственный пример клеток с внутренними возбудимыми мембранами.

ЛПД может быть инициирован механическим или электрическим стимулом. Возникая в определенном участке клетки, этот ПД распространяется по всему ее объему и запускает вспышки люминесценции в особых цитоплазматических компартментах размером до 1,5 мкм – сцинтиллонах (Eckert, 1965a; Eckert, 1965b; Eckert, 1966; Eckert, Raynolds, 1967). Другой особенностью ЛПД является то, что он обеспечивается потенциал-активируемым током H^+ , на основании чего было сделано предположение, что в основе этого ПД лежит активация каналов H_v (Fogel, Hastings, 1972; Nawata, Sibaoka, 1979). Вход протонов через эти каналы должен обеспечивать закисление среды сцинтиллона и тем самым активировать люциферазную реакцию. Недавно Смит с коллегами идентифицировали и клонировали ген такого канала (kH_v1) у нелюминесцентной динофлагелляты *Karlodinium veneficum* (Smith et al., 2011). Канал kH_v1 был изучен в гетерологичной системе экспрессии (клетки линии НЕК293) методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» («whole-cell»). Исследования показали, что это действительно протон-селективный канал, активирующийся при деполяризации мембраны. В отличие от каналов H_v других организмов, kH_v1 способны обеспечивать входящий ток протонов в физиологических условиях, что и требуется для активации люминесценции. Кроме того, в то время как H_v животных функционируют как димеры за счет coil-coiled-домена на С-терминальном конце, H_v *K. veneficum*, вероятно, представляют собой мономеры, так как на их С-концевом участке подобных доменов не выявлено.

ПД, управляющий движениями тентакля (ТПД), в отличие от ЛПД, спонтанен. Однако ТПД могут следовать за ЛПД при стимуляции клетки (Eckert, Sibaoka, 1967; Sibaoka, Eckert, 1967). В физиологических условиях при концентрации Ca^{2+} порядка 10 мМ ТПД имеет негативный гиперполяризационный спайк. Исследования показали, что вход ионов кальция необходим для сопряжения ТПД с движениями тентакля, так как в отсутствие ионов кальция снаружи движения тентакля прекращались (Eckert, Sibaoka, 1967). Однако при низких концентрациях Ca^{2+} во внешнем растворе (0,01–0,3 мМ) у

ТПД сначала появлялся положительный (деполяризационный) спайк, отделенный от следующего негативного (гиперполяризационного) спайка фазой плато (Oami et al. 1988). В дальнейшем положительный и негативный спайки были ассоциированы соответственно с входом Na^+ через некий Ca^{2+} -зависимый канал, активирующийся при деполяризации плазмалеммы, и с выходом Cl^- через каналы, активирующиеся при ее гиперполяризации. В то время как каналы, обеспечивающие ток Na^+ , расположены в области цитостомы, хлорные каналы распределены по всей плазматической мембране клетки (Oami et al., 1990; Oami et al., 1995a).

Таким образом, в настоящий момент у динофлагеллят описаны всего три типа потенциал-управляемых токов (H^+ , Na^+ , Cl^-) и идентифицирован один канал (kH_v1).

Основным препятствием на пути к применению метода локальной фиксации потенциала, наиболее эффективного метода для изучения ионных каналов, к клеткам армированных динофлагеллят были и остаются их сложные покровы (Pozdnyakov, Skarlato, 2012). В отличие от большинства эукариот, клеточная стенка армированных динофлагеллят содержит слои ригидного материала (целлюлозы) не над плазматической мембраной, а под ней, в амфиесмальных пузырьках. Таким образом, этот ригидный слой защищен от возможного воздействия гидролитических ферментов двумя слоями мембран. Это обстоятельство делает неприменимым подход к получению сферопластов с помощью гидролитических ферментов, таких как целлюлаза и хитиназа, успешно применяемый в случае растений и грибов. Несмотря на то что плазматическая мембрана доступна для прямого контакта с микропипеткой, слой целлюлозы делает покровы клетки слишком жесткими для образования плотного контакта. Более того, целлюлозные текальные пластины, находящиеся под двумя слоями мембран, могут формировать шипы (например, у *Prorocentrum*), также препятствующие образованию плотного контакта стеклянной микропипетки с плазматической мембраной клетки.

Другим препятствием для изучения ионных каналов динофлагеллят является отсутствие полностью секвенированных геномов вследствие их огромных размеров у большинства видов (Hackett et al., 2004). По этой причине исследователи вынуждены работать с транскриптомными базами данных, содержащими лишь частичную информацию о генах, кодирующих субъединицы ионных каналов.

Таким образом, несмотря на то что ионные каналы динофлагеллят уже давно вызывают интерес у исследователей, методологические трудности и отсутствие подхода, позволяющего применять метод локальной фиксации потенциала на мембране, стали причиной недостатка знаний об ионных каналах этих организмов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Культура динофлагеллят *P. minimum*

Динофлагеллят *P. minimum*, изолированных из Черного моря, культивировали в среде f/2 (Guillard, Ryther, 1962) без силикатов с соленостью 17 ‰ при комнатной температуре и режиме освещения 12 ч день : 12 ч ночь, интенсивность освещения составляла $50 \text{ мкмоль фотонов} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$. Среда f/2 готовилась на основе искусственной морской воды (на 1 л: 11,97 г NaCl, 0,34 г KCl, 1,7 г MgSO₄, 0,098 г NaHCO₃, 0,049 г KBr, 0,013 г H₃BO₃, 0,0015 г NaF, 5,4 г MgCl₂ × 6H₂O, 0,56 г CaCl₂, 0,00085 г SrSO₄, 17 ‰, pH 8,2) (Kester et al., 1967) с добавлением NaNO₃ и NaH₂PO₄ до конечной концентрации 0,88 мМ и 0,22 мМ соответственно, а также микроэлементов и витаминов.

2.2 Биоинформатический анализ данных

2.2.1 Нуклеотидные и аминокислотные базы данных и поиск гомологов потенциал-управляемых катионных каналов

В работе были использованы следующие базы данных: 1) база данных аннотированных нуклеотидных последовательностей и их аминокислотных продуктов «GenBank» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 2) избыточная база данных нуклеотидных последовательностей и их аминокислотных продуктов «RefSeq» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), 3) база секвенированных геномов и белковых продуктов протистов «Origins of Multicellularity» (https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/multicellularity_project/MultiHome.html), 4) избыточная аннотированная белковая база данных «UniProtKB/SwissProt» (<http://www.uniprot.org/>), 5) база данных геномов и белковых продуктов нематод «WormBase» (<http://www.wormbase.org/#01-23-6>), 6)

транслированные транскриптомы базы данных проекта «Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project» (MMETSP; <http://data.imicrobe.us/project/view/104>, Combined Assemblies; Keeling et al., 2014): транскриптомы *Alexandrium-tamarense*-CCMP1771, *Amphidinium-carterae*-CCMP1314, *Chattonella-subsula*-CCMP2191, *Cryptothecodinium-cohnii*-Seligo, *Gephyrocapsa-oceanica*-RCC1303, *Isochrysis-glabana*-CCMP1323, *Karenia-brevis*-CCMP2229, *Kryptoperidinium-foleaceum*-CCMP1326, *Lingulodinium-polyedra*-CCMP1738, *Lotharella-globoso*-CCCM811, *Oxyrrhis-marina*-LB1974, *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329, *Prorocentrum-minimum*-CCMP2233, *Scrippsiella-trochoidea*-CCMP3099, *Symbiodinium-sp*-Mp.

Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей потенциал-управляемых катионных каналов производили с помощью алгоритма BLASTP (матрица весов аминокислотных замен BLOSUM62) в программе BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) или с помощью встроенных сервисов на сайте соответствующей базы данных.

В качестве последовательностей запроса использовали аминокислотные последовательности катионных каналов человека из базы данных белковых последовательностей National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). В случае поиска гомологов ЧД ПКК в различных группах эукариот с целью максимально увеличить число выявленных гомологичных последовательностей результаты первичного поиска были использованы в качестве повторного запроса. Параметр E-value для всех выбранных результатов запроса был $\leq 10^{-10}$.

2.2.2 Выравнивание аминокислотных последовательностей

Для демонстрации гомологии аминокислотных последовательностей потенциал-управляемых катионных каналов осуществляли множественное выравнивание этих последовательностей 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).

2.2.3 Оценка идентичности гомологичных последовательностей

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. Оценка идентичности проводилась для аминокислотных последовательностей потенциал-управляемых катионных каналов модельного объекта *P. minimum*.

2.2.4 Филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов

Для филогенетического анализа были отобраны аминокислотные последовательности, содержащие четыре консервативных домена, индексируемых базой данных консервативных белковых доменов Pfam (Finn et al., 2016; <http://pfam.xfam.org/>) как домены pfam00520 (таблица 2.1), каждый из которых представляет собой типичный для суперсемейства ПКК домен с шестью трансмембранными сегментами. В ряде случаев первый из доменов pfam00520 был представлен частично, участком S5-P-loop-S6. Минимальная и максимальная длина используемых в дальнейшем анализе последовательностей составила 1277 а.о. и 4695 а.о., соответственно, при средней длине 1992,3 а.о.

Таблица 2.1. Гомологи четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят, выявленные в транскриптомах из базы данных MMETSP. Серым цветом выделены наиболее полные последовательности, которые были использованы для дальнейшего анализа.

Транскриптом	номер	Длина, а.о.	E-value	Кол-во доменов pfam00520
Alexandrium-tamarense- CCMP1771	409914_1	1078	2e-47	3
	406677_1	1138	8e-49	3
	406917_1	1545	e-105	4
	407112_1	1078	e-92	3
	1934_1	992	e-45	3
Amphidinium-carterae- CCMP1314	156993_1	2222	5e-47	4
	29873_1	1895	4e-42	4
Cryptocodinium-cohnii- Seligo	195135_1	1338	2e-38	3
Karinia-brevis-CCMP2229	20887_1	2222	2e-52	4
	269344_1	2068	7e-46	4
	53452_1	1926	e-39	4
	10719_1	1408	e-43	3
	9800_1	1311	e-85	3
	269973_1	1885	4e-92	4
	20579_1	1962	4e-72	4
Kryptoperidinium- foleaceum-CCMP1326	702_1	1268	4e-49	3
	405392_1	1921	4e-39	4
	407651_1	1962	3e-34	4
	416989_1	2077	e-40	4
Lingulodinium-polyedra- CCMP1738	90575_1	1996	6e-44	4
Oxyrrhis-marina-LB1974	66577_1	1096	e-57	3
	761_1	1316	4e-57	3
	66317_1	983	2e-50	2
	66755_1	1868	3e-50	4
	62022_1	1265	e-48	3
	43081_1	1242	7e-48	2
Prorocentrum-minimum- CCMP1329	259712_1	1533	3e-44	3
	258836_1	956	7e-34	2
	52065_1	1162	4e-31	3
Prorocentrum-minimum- CCMP2233	40145_1	2087	3e-44	4
	47759_1	2059	3e-37	4
	20998_1	1961	4e-30	4

	2595_1	2046	6e-31	4
Scrippsiella-trochoidea- CCMP3099	388392_1	1968	2e-44	4
	9808_1	1990	2e-38	4
	26908_1	1893	3e-38	4
	391309_1	1968	6e-44	4
	17126_1	2121	3e-78	4
Symbiodinium-sp-Mp	189168_1	1292	e-57	3
	190870_1	1884	9e-57	4
	188361_1	1829	4e-41	4
	191095_1	1015	e-20	2

Для проведения филогенетического анализа ЧД ПКК динофлагеллят были сформированы два массива данных: 1) массив, включающий 277 последовательностей ЧД ПКК различных групп эукариот и 2) массив, включающий 162 последовательности ЧД ПКК, принадлежащих исключительно организмам из группы SAR (Приложение, таблица 1). Оба массива данных использовались далее при множественном выравнивании в программе MAFFT 7 методами E-INS-I и FFT-NS-i, соответственно (Katoh, Standley, 2013) (матрица аминокислотных замен BLOSUM62).

С целью удаления наименее консервативных участков результаты множественных выравниваний подвергались автоматическому триммингу с помощью алгоритма GUIDANCE 2 (Sela et al., 2015) (порог guidance score = 0,377, что соответствовало удалению примерно 60 % позиций).

На подготовленных вышеописанным образом массивов данных в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013) были протестированы различные эволюционные модели, из которых была выбрана модель с наименьшим значением AIC: модель Le and Gascuel (LG) (Le, Gascuel, 2008), с учетом частот аминокислотных остатков (+ F) и вариации частот между сайтами с помощью гамма-распределения (+ G, 4 дискретные категории). Таким образом, была использована эволюционная модель, обозначаемая как LG + F + G.

Филогенетический анализ проводился методами максимального правдоподобия с помощью программы GARLI 2.1 (Bazinet et al., 2014) и байесовского анализа в программе MrBayes 3.2.5 (Ronquist et al., 2012) (4

марковские цепи; 5000000 генераций и 600000 генераций с подбором деревьев каждые 5000 и 500 генераций для массивов из 277 и 162 последовательностей, соответственно; удаление первых 25 % деревьев). Бутстреп анализ проводился путем построения 1000 альтернативных деревьев. Все значения бутстрепа приведены в процентах. Полученные деревья визуализировали с помощью программы FigTree 1.4.2. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.2.5 Предсказание вторичных структур участков четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов

Предсказание вторичных структур идентифицированных аминокислотных последовательностей проводилось с помощью программы PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

2.3 Получение и исследование сферопластов *P. minimum*

2.3.1 Индукция экдизиса

Экдизис клеток *P. minimum* индуцировали центрифугированием при 10000 g в течение 5 мин. После центрифугирования клетки ресуспензировали в среде и инкубировали в течение 1,5–2 ч.

2.3.2 Получение сферопластов

2,6-дихлорбензонитрил (ДХБ) растворяли в ДМСО до концентрации 10 мМ и хранили при –20 °С. Для получения сферопластов 10 мМ раствор ДХБ добавляли к культуре *P. minimum* (10^4 – 10^5 кл × мл⁻¹) до достижения конечной концентрации ДХБ 50–300 мкМ и аккуратно перемешивали. Пробирки с обработанными клетками инкубировали при стандартных условиях культивирования в течение 1–5 суток.

2.3.3 Подсчет нативных и экдизировавших клеток и сферопластов

Подсчет клеток и сферопластов осуществляли в камере Фукс-Розенталя или при помощи сетчатого окуляра под микроскопом. Выход сферопластов рассчитывали, как процентное отношение числа сферопластов к общему количеству клеток в камере. Уровень экдизиса рассчитывали, как процентное отношение числа пустых тек к общему количеству клеток в камере.

2.3.4 Микроскопия и анализ изображений

Микрофотографии клеток и сферопластов *P. minimum* получали с помощью методов дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) и флуоресцентной микроскопии.

Для окрашивания целлюлозы, содержащейся в покровах динофлагеллят, использовали флуоресцентный краситель Calcofluor White M2R (CFW, Sigma, USA), специфически связывающийся с β -глюканами: 0,1 % краситель добавляли к клеточной суспензии (конечная концентрация 0,006 %) непосредственно перед началом микроскопических исследований.

Окрашенные клетки наблюдали и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) в ультрафиолетовом свете (длина волны возбуждения – 365 нм, эмиссия – 445–450 нм) при $\times 100$ увеличении.

Для того чтобы нормировать флуоресценцию клеток в разных образцах, в микроскопических исследованиях в качестве стандартов использовали флуоресцентные шарики Flow-CheckTM fluorospheres (Beckman Coulter, USA) диаметром 10 мкм.

Полученные изображения анализировали в программе ImageJ (Rasband, 2013). Уровень флуоресценции окрашенных клеток и флуоресцентных шариков рассчитывали как:

$$F = ID - (A \times MFB),$$

где F – уровень флуоресценции клеток или шариков, ID – интегрированная плотность, A – площадь клетки или шарика, MFB – средняя флуоресценция фона. Относительную флуоресценцию вычисляли как отношение среднего уровня флуоресценции клеток к среднему уровню флуоресценции шариков в данном образце.

2.4 Электрофизиологические исследования

2.4.1 Используемая аппаратура и программы

Трансмембранные токи регистрировали с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments/Molecular Devices, USA) с фильтром нижних частот (2 кГц). Далее сигнал оцифровывали на 5 кГц с помощью аналого-цифрового преобразователя. Полученные данные обрабатывали в пакете программ pClamp10 (Axon Instruments/Molecular Devices, USA) и Origin 6.1 (OriginLab Corp., USA).

Стеклянные микропипетки изготавливали из боросиликатных заготовок BF150-110-10 и BF150-86-10 (Sutter Instrument Company, USA) с помощью пуллера P-97 (Sutter Instrument Company, USA).

2.4.2 Условия регистрации трансмембранного тока

Перед началом эксперимента клетки и сферопласты центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин с целью их обездвиживания. Затем заменяли среду f/2 на внешний раствор для регистрации ионных токов, ресуспензировали пеллету и инкубировали клетки в течение 30 мин. Далее 100–150 мкл подготовленной суспензии клеточной культуры помещали в экспериментальную камеру.

Сферопласты хорошо отличались от нативных клеток благодаря сферической форме и отсутствию видимой в фазовом контрасте клеточной

стенки. В случае попыток получить плотный контакт с экдизировавшими клетками использовались клетки, соединенные со сброшенной текой.

Регистрацию активности одиночных ионных каналов проводили в конфигурациях «cell-attached» (клетка прикреплена) и «inside-out» (наружная сторона мембраны внутри пипетки). В последнем случае после получения плотного контакта (> 1 ГОм) микропипетку с прикрепленной клеткой выводили из наружного раствора камеры в воздушную среду, а затем быстро возвращали в раствор.

В зависимости от эксперимента использовали следующие растворы камеры.

1. «240KCl»_к: 240 mM KCl, 5 mM Hepes/Tris, pH 7,2;
2. «240KAsp»_к: 240 mM KAsp, 5 mM Hepes/Tris, pH 7,2;
3. «120K/120NaAsp»_к: 120 mM KAsp, 120 mM NaAsp, 5 mM Hepes/Tris, pH 7,2
4. «60K/180NaAsp»_к: 60 mM KAsp, 180 mM NaAsp, 5 mM Hepes/Tris, pH 7,2

В зависимости от эксперимента раствор микропипетки имел следующих состав:

1. «240NaCl»_п: 240 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM Hepes/Tris, pH 7,2;
2. «240KAsp»_п: 240 mM KAsp, 2 mM CaCl₂, 5 mM Hepes/Tris, pH 7,2;

Использовали два различных протокола регистрации ионных токов. Ступенчатый протокол представлял собой набор ступеней различных напряжений длительностью 100 мс. Поддерживаемый потенциал мембраны автоматически изменялся от -70 мВ до заданного значения (от -100 до +60 мВ с шагом 10 мВ), после чего автоматически возвращался на исходный уровень -70 мВ. Протокол непрерывной регистрации предполагал регистрацию спонтанной активности каналов на одном из поддерживаемых потенциалов от -70 до +60 мВ в течение 30 с.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Идентификация представителей суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов в транскриптомах динофлагеллят

Анализ транслированных транскриптомов динофлагеллят выявил аминокислотные последовательности, гомологичные большинству известных к настоящему времени типов ионных каналов из суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов (таблица 3.1; Приложение, таблица 2; здесь и далее в разделе приведены данные для модельного объекта *P. minimum*).

Таблица 3.1. Транслированные последовательности генов ионных каналов различных семейств, выявленные в транскриптомах *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329 и *Prorocentrum-minimum*-CCMP2233 из транскриптомной базы данных MMETSP. Номерами (1) и (2) обозначены одиночные и удвоенные последовательности соответствующих семейств. Из: Поздняков, Скарлато, 2015, с изменениями.

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	258896_1	1163	14899_1	1363
(2)				
K _{2p}	не выявлено	-	не выявлено	-
TRPV	42031_1	875	15802_1	904
TRPP	262008_1	1141	17215_1	1175
TRP	39996_1	827	16420_1	773
ЧД ПКК	259712_1	1533	40145_1	2087
H _v	146776_1	288	128_1	291

3.1.1 Калиевые каналы

Найденные у *P. minimum* гомологи каналов K_{ir} в области поровой петли содержат сигнатуру GYG, характерную для большинства калиевых каналов других живых организмов (рисунок 3.1, а). При этом идентичность аминокислотных последовательностей K_{ir}-каналов *Homo sapiens* (445 а.о.) и *P. minimum* (690 а.о.) составляет 27 % (445 а.о.; здесь и далее после значения идентичности в скобках указывается размер сравниваемого фрагмента выравнивания).

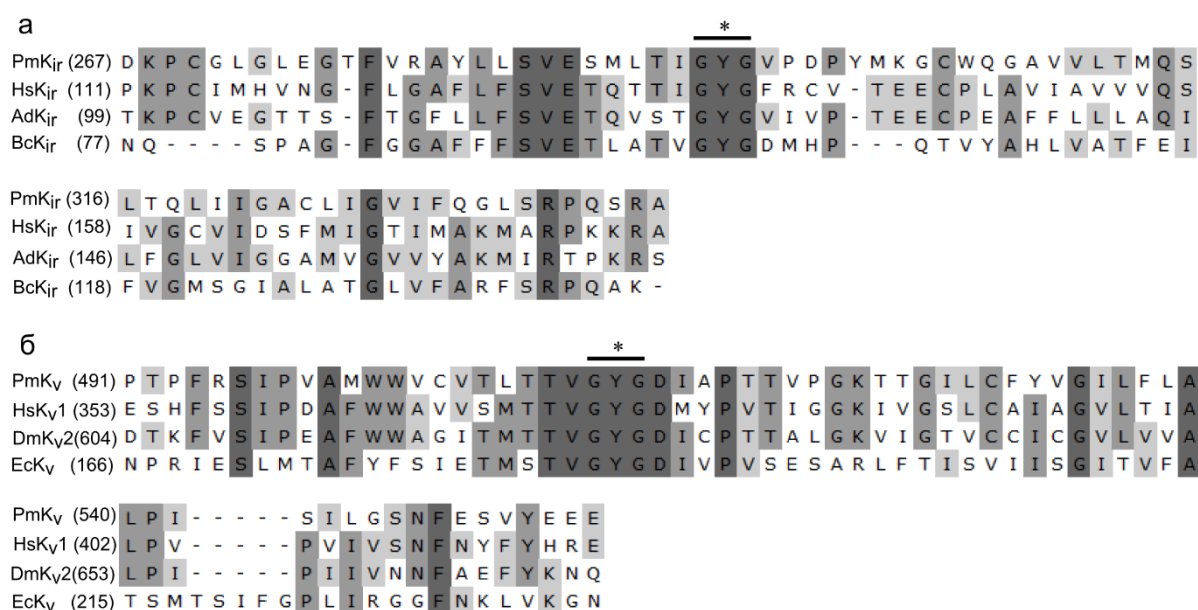


Рисунок 3.1. Результаты множественного выравнивания гомологичных участков

аминокислотных последовательностей калиевых каналов входящего выпрямления K_{ir} (а) и потенциал-активируемых калиевых каналов K_v (б) различных видов организмов. Ad K_{ir} – *Anopheles darling* (NCBI: ETN66688.1), Bc K_{ir} – *Burkholderia cenocepacia* (NCBI: EPZ91042.1), Dm K_v – *Drosophila melanogaster* (NCBI: AAC33365.1), Ec K_v – *Escherichia coli* (NCBI: CAR12756.1), Hs K_{ir} – *Homo sapiens* (NCBI: AAA19962.1), Hs K_v – *H. sapiens* (NCBI: NP_000208.2), Pm K_{ir} – *Prorocentrum minimum* (Prorocentrum-minimum-CCMP2233, MMETSP: 35921_1), Pm K_v – *P. minimum* (Prorocentrum-minimum-CCMP1329, MMETSP: 906_1). Звездочкой показана сигнатура GYG (здесь и на рисунках 3.3, 3.4), номер в скобках – порядковый номер первого в ряду аминокислотного остатка (рисунок 3.1–3.6). Интенсивность цвета отражает степень идентичности (рисунок 3.1–3.6). Из: Поздняков, Скарлато, 2015.

Гомологи каналов K_v (рисунок 3.1, б), также имеющие характерную сигнатуру GYG, в обоих транскриптомах представлены последовательностями длиной 400–600 а.о. Идентичность с каналом K_v человека составляет 24 %.

Сигнатуру GYG несут и последовательности каналов K_{Ca} (1100–1200 а.о.), гомологичные кальций-активируемым калиевым каналам большой проводимости (ВК) Metazoa (рисунок 3.2). Так же как и каналы ВК 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 ВК-каналу человека (1236 а.о.) на 22 % (1204 а.о.) и имеет домен RCK длиной 180 а.о.

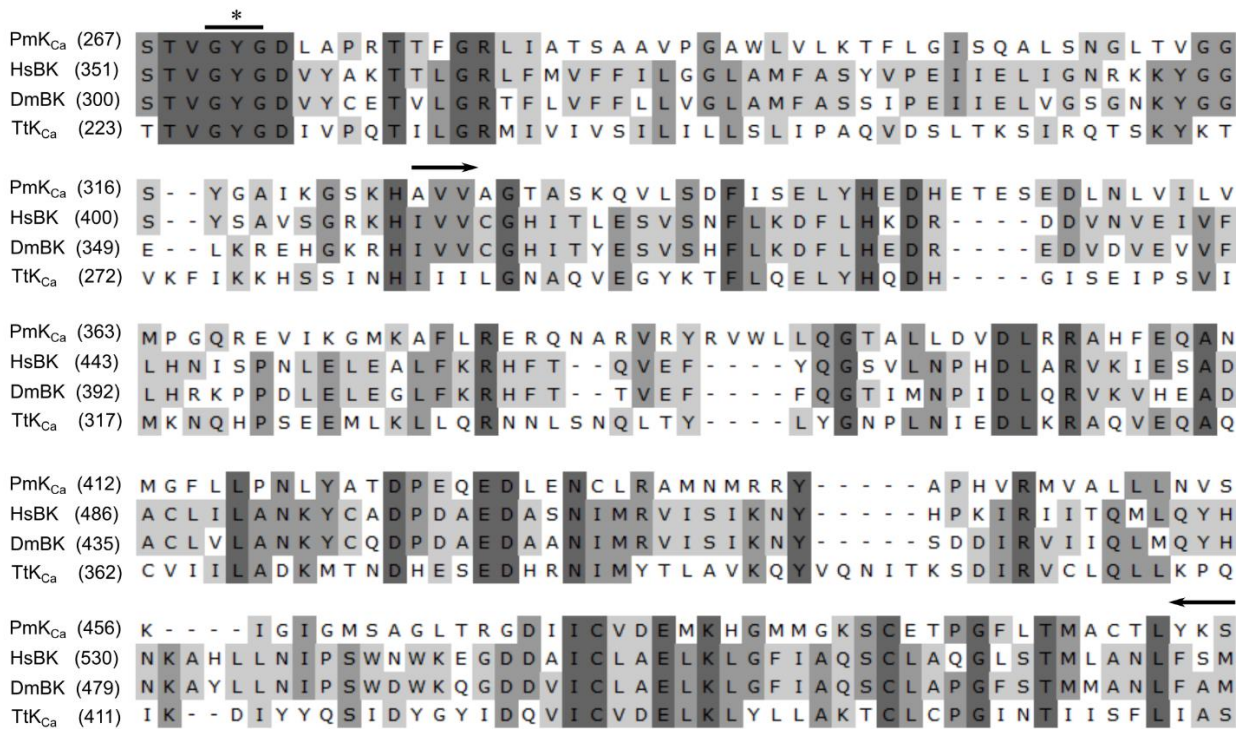


Рисунок 3.2. Результат множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей кальций-зависимых калиевых каналов K_{Ca} различных видов организмов. DmBK – *Drosophila melanogaster* (NCBI: Q03720.3), HsBK – *Homo sapiens* (NCBI: Q12791.2), PmKCa – *Prorocentrum minimum* (Prorocentrum-minimum-CCMP2233, MMETSP: 2963_1), TtKCa – *Tetrahymena thermophila* (NCBI: EAR88631.2). Стрелками обозначены границы RCK-домена. Из: Поздняков, Скарлато, 2015.

3.1.2 Каналы, управляемые циклическими нуклеотидами

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 (рисунок 3.3). В последовательностях EAG *P. minimum* присутствует и домен

CNBD длиной 180 а.о. При этом канал EAG *P. minimum* (около 800 а.о.) идентичен данному каналу *H. sapiens* (1159 а.о.) на 23 % (820 а.о.).



Рисунок 3.3. Результаты множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей каналов семейств EAG и HCN/CNG динофлагеллят *Prorocentrum minimum* и человека. HsCNG – *Homo sapiens* (NCBI: AAA65619.1), HsEAG – *Homo 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. Из: Поздняков, Скарлато, 2015.

Семейство HCN/CNG у многоклеточных животных и сестринских им хоанофлагеллят состоит из двух близких подсемейств HCN и CNG, включающих

катионные неселективные каналы. При этом каналы HCN имеют сигнатуру GYG, что, по-видимому, обуславливает несколько большую их селективность в отношении ионов калия по сравнению с каналами CNG, которые этой последовательности не имеют (Craven, Zagotta, 2006). Найденные у *P. minimum* гомологи катионных каналов семейства HCN/CNG (500–700 а.о.) обладают сигнатурой GYG (рисунок 3.3), что, вероятно, указывает на некоторую селективность обнаруженных каналов к ионам калия. Домен CNBD занимает локус длиной 130 а.о. Эти последовательности идентичны каналам HCN и CNG человека (600–900 а.о.) на 18–23 % (551–744 а.о.).

3.1.3 Удвоенные последовательности каналов K_v и HCN/CNG

Следует отметить, что среди гомологов K_v и HCN/CNG в обоих исследованных транскриптах *P. minimum* были обнаружены необычно длинные последовательности (таблица 3.1; рисунок 3.4). Анализ их консервативных участков показал, что они представляют собой удвоенные последовательности каналов K_v и HCN/CNG, то есть содержат по два домена [S1–S6]. Наличие удвоенных транскриптов может быть как следствием ошибки сборки транскриптома, так и следствием реально произошедшей дупликации предкового гена. Однако ошибка сборки транскриптома маловероятна, поскольку удвоенные последовательности каналов K_v и HCN/CNG были выявлены в девяти и пяти транскриптах, принадлежащих другим видам динофлагеллят, соответственно (Приложение, таблица 2). Кроме того, BLAST анализ белковой и нуклеотидной базы NCBI выявил гомологичные удвоенные последовательности каналов HCN/CNG у нескольких видов оомицет. Таким образом, удвоенные последовательности скорее всего являются результатом реально произошедшей дупликации предкового гена.

a

```

PmKv(2) DI (334) - I E T V C I V L F T L D Y V V R V A T A H A D E R G A S T C T Q G A L R - - - - -
PmKv(2) DII (677) V L E V F G I T I F T V D Y L L R V C T V H T A E - - A E E C G V S P E R V P R R D H P F R K L R M
PmKv(1) (129) S A E M F F T V L F T V E F A L R L H A Y D S L R G F V S N C - - - - -

PmKv(2) DI (370) T F W Y A V E P V N V V D I L A I A P Y Y I E F A - - - - - S G N G L
PmKv(2) DII (725) T W L Y C T Q W M N I I D L V A I V P F Y V Q T A - - - - - M G G G G S G G G M
PmKv(1) (160) - - - - - F N I I D M V A I F P G L L Q L V I M L L R I S E S D D V D E K L T A A S S Q R T A

PmKv(2) DI (400) G S L E I L R L A R I L R I F K M A R - - - - - H H P G M K M F A K V L Y K S G Q P F F I L V F
PmKv(2) DII (760) S A I R V V R L A R I F R V L R M R K - - - - - L Q T G V A M F S H V I M D S L P A M S L L A F
PmKv(1) (202) H I I Q V V R F V R V C R V L R I A K A A R H S Q M L T S I I A V F V E V F R S G - - L A V V L M

PmKv(2) DI (443) F L V I I I M L F A S I M Y I A E G Q K F S V A P K F T R E H Y D A E E C E N S S V F P T G V F V R
PmKv(2) DII (803) M T M M A C L F F A S C I T Y A E G S T Y S V D E N W L E K - - - - - Y P N G T F V R
PmKv(1) (249) L L C F T T L L S A S L V F L F E S D S C G A - - - - -

PmKv(2) DI (490) T S S D P V D G D E P T P F R S I P V A M W W V C V T L T T V G Y G D I A P T T V P G K T T G I L C
PmKv(2) DII (841) P T T D G Y - G N E V S P F R S I V D G F W W F F V T A T T V G Y G D I Y P T T T A G R M I G L V T
PmKv(1) (272) - S G D T C D G - A A A D F E S I P A A F W W A V S T L T T V G Y G D A V P Q T I A G K V V G I V T

PmKv(2) DI (543) F Y V G I L F L A L P I S I L
PmKv(2) DII (890) V Y F G I V L L A L P I S V I
PmKv(1) (320) A I T G M M I L A V G I - - -

```

б

```

PmHC(2) DI (173) V F D Y L V D V I F A V D T F L T F F V G Y Y N - - H Q E V Y I S D R R L I A R R Y L S G F F V P D
PmHC(2) DII (452) G I D L L V D L F F C V D M V L N F R T G F V D - - G D G L I N T V P S E I R S R Y L K T W F G I D
PmHC(1) (147) L I N R L I D A V F V I D L L L Q F V T A Q E D P H R P G L Y E R Q P R E I A R I Y F N S W F I I D

PmHC(2) DI (221) V L S W M P L D V M I R A V - - - - - T G G N T R S V R I I K F V R L V R L V K L M R L L K L
PmHC(2) DII (500) L C S T V P V D H L M D L V A L A T G S D G S G R S A R A L K M F K T L R L L R L L K L A R L L K M
PmHC(1) (197) F L S I L P V D I I C V L S - E S S A S F G W L Q M P R F L R N M K V L R L L R L A R L L R L A K V

PmHC(2) DI (263) S R F V R N L G E R M N L N P S A I Q L V K L M M K I V F L A H L L A C F W H F C A L P T C G D E N
PmHC(2) DII (550) G R L V R S F E E V V E V S P I V V K C F K L S G Q L I I L A H A I G C F W F H M S T H Q D V N A D
PmHC(1) (246) Q K L V R W Q S A T G I S F A A Q S L L Q F L V M I A I V S H W M A C L W A S L A W S S D G D D N

PmHC(2) DI (313) W P N D K A C P E P P E G I K V H P N W V R S F G A D H F D V S S R Y V A A T H F V V A T M M A V G
PmHC(2) DII (600) G C S S G M L G C S P - - G D S A T T W W E E I N I T A D D K G E Q Y I A S L Y W A F T T M T T V G
PmHC(1) (296) W I S K - - - - - L E V G R G G G V D I T S N A F Y V - - - Y C V S L Y W A V M T L T S I G

PmHC(2) DI (363) Y G D I Y A T N T M E R I I S I C M Q C M G A T A F G F I L A A V T A L V D
PmHC(2) DII (648) Y G D I I P K N S Y E R V Y A I M A M L L G A - - - - -
PmHC(1) (332) Y G D I V A T T H L E Y V V A T L C M L F M A G I W A Y T I G A V C - - -

```

Рисунок 3.4. Результаты множественного выравнивания участков удвоенных и одиночных аминокислотных последовательностей, соответствующих трансмембранным сегментам S1–S6 каналов K_v (a) и HCN/CNG (б) *Prorocentrum minimum*. PmKv(1) – последовательность K_v 51627_1 (MMETSP, *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329), PmKv(2) DI – первый домен удвоенной последовательности K_v 20439_1 (MMETSP, *Prorocentrum-minimum*-CCMP2233),

PmKv(2) DII – второй домен удвоенной последовательности K_v 20439_1 (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP2233), PmHC(1) – последовательность HCN/CNG 33715_1 (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP1329), PmHC(2) DI – первый домен удвоенной последовательности HCN/CNG 14899_1 (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP2233), PmHC(2) DII – второй домен удвоенной последовательности HCN/CNG 14899_1 (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP2233).

Известно, что многие гены динофлагеллят организованы в последовательности тандемных копий. По одной из гипотез при эксперсии таких генов может происходить образование полицистронных пре-мРНК, которые в результате последующего 5'-транс-сплайсинга преобразуются в моноцистронные РНК (Wisecaver, Hackett, 2011). Таким образом, важно учесть и тот факт, что обнаруженные нами последовательности могут являться полицистронными интермедиатами транскрипции. Однако на примере ряда тандемных кластеров динофлагеллят было показано, что копии одного и того же гена характеризуются высокой степенью консервативности (Beauchemin et al., 2012). Мы же обнаружили низкую степень идентичности двух транслированных участков, кодирующих домены [S1–S6] (pfam00520) в рамках удвоенной последовательности. Кроме того, каждый из доменов удвоенных последовательностей значительно отличался от гомологичных участков однодоменных последовательностей. Так, степень идентичности между двумя доменами [S1–S6] составила 31,96 % и 38,83 % для удвоенных последовательностей HCN/CNG и K_v *P. minimum*, соответственно. В то же время степень идентичности между каждым из доменов [S1–S6] удвоенных последовательностей и гомологичным доменом неудвоенной последовательности *P. minimum* составила 26,69 % и 31,96 % для I и II домена HCN/CNG и 29,55 % и 34,48 % для I и II домена K_v, соответственно. Таким образом, обе части удвоенных последовательностей обладают низкой степенью консервативности, что нехарактерно для тандемных копий.

3.1.4 Каналы TRP

Каналы TRP – 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 потенциал-управляемых калиевых каналов (рисунок 1.4, б), однако домен, гомологичный VSD у K_v , в данном случае 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 и имеющие Ank-домен длиной около 150 а.о (рисунок 3.5). Найденные последовательности идентичны TRPV5-каналу человека (729 а.о.) на 23 % (729 а.о.). В транскриптом *P. minimum* были также идентифицированы гомологи TRPP-каналов длиной 1100 а.о., не имеющие Ank-повторов.

PmTRP (107)	Y D G E G L L H I C V I K R D K V T - - - - - L Q K M F Q K K G V R I D G R A
HsTRPV (115)	F A G Q T A L H I A V V N Q N V N L - - - - - V R A L L T R R - A S V S A R A
DmTRPV (178)	Y Y G E S V L H I A I V N E D P A M - - - - - V K Y L L D A N - A D V Q E R C
CtTRP (988)	L A K A D Q V S I G L A S D D E S N P I L Q H P R F F K W K T K D Y K N F V S A A - S D L A A K M
PmTRP (141)	H G - - - - - T F F - - A P G - - - - - A Q T Y - - - - - F G E
HsTRPV (148)	T G - - - - - T A F R R S P R - - - - - N L I Y - - - - - F G E
DmTRPV (211)	C G A F M S A E D T K F S R T D S P D H E Y V A L C P M T N Y D G Y V Y - - - - - W G E
CtTRP (1036)	S S P I A G I L A L K F A L L S G - K R S Y V S R V C R Y I Q D G H V Y S P V L Q A M L K E L A Q
PmTRP (156)	Y V I S F A V A T - - - - - D W L E G L E L I K E Y V D S G N S A H G G T R F S E I L S L E
HsTRPV (165)	H P L S F A A C V - - - - - N S E E I V R L L I E - - - - - H G A D - - - - - I R A Q
DmTRPV (250)	Y P L S F A A C L - - - - - S Q E E C F R L V L A - - - - - R G A D - - - - - P D F Q
CtTRP (1084)	E Q P S Q A A T L L C N V P F I Y E D S I T I R I P R E R L G - - - - - R G W E - - - - - M W F T S
PmTRP (197)	D S W G N T A L H L A V L N K R R R - - - - T Y T W L R K H G N I G A I T Q - - - - - Q N C L G L
HsTRPV (193)	D S L G N T V L H I L I L Q P N K T F A C Q M Y N L L L S Y D G H G D H L Q P L D L V P N H Q G L
DmTRPV (278)	D T N G N T V L H M L V I Y E K I E M F D V G Y E V - - - - - G T N I H I K - - - - - N I Q N L
CtTRP (1124)	D Q A P P P A L K P E D P F E R T R M G S E K L N K - - - - - E S E R R V Y - - - - - S W Q N W
PmTRP (237)	T A I S L A A V V - N D A A T F E H V L
HsTRPV (242)	T P F K L A G V E - G N T V M F Q H L M
DmTRPV (316)	T P L T L A A K L - G R V E M F F H V M
CtTRP (1162)	V D W L A S G F L H G D Y A L W A Y T M

Рисунок 3.5. Результаты множественного выравнивания гомологичных участков аминокислотных последовательностей анкириновых доменов каналов семейства TRP различных 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). Из: Поздняков, Скарлато, 2015.

3.1.5 Каналы TPC

В результате анализа в транскриптомах *P. minimum* были обнаружены гомологи кальциевых каналов TPC (770–830 а.о.), идентичных TPC-каналу человека (888 а.о.) на 22 % (827 а.о.) (рисунок 3.6).

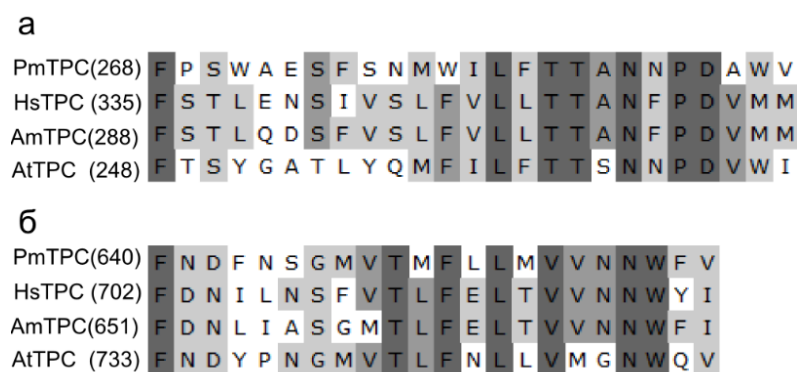


Рисунок 3.6. Результаты множественного выравнивания участков поровой петли аминокислотных последовательностей первого (а) и второго (б) домена каналов TPC различных видов организмов. AmTPC – *Apis mellifera* (NCBI: NP_001201833.1), AtTPC – *Arabidopsis thaliana* (NCBI: NP_567258.1), HsTPC – *Homo sapiens* (NCBI: NP_001137291.1), PmTPC – *Prorocentrum minimum* (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP2233: 16420_1). Из: Поздняков, Скарлато, 2015.

3.1.6 Потенциал-управляемые протонные каналы

Потенциал-управляемые протонные каналы (H_v) являются особой группой катионных каналов, поскольку каждая из субъединиц канала H_v представляет собой домен с сегментами S1–S4, гомологичный VSD-домену каналов K_v (Smith et al., 2011) (рисунок 1.4, ж). Найденные в транскриптомах *P. minimum* 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) (рисунок 3.7).

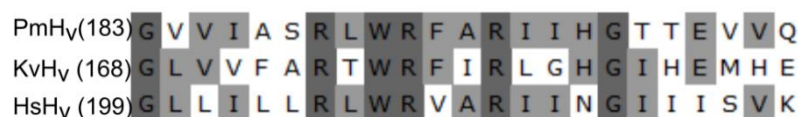


Рисунок 3.7. Результаты множественного выравнивания участков S4 аминокислотных последовательностей потенциал-активируемых протонных каналов H_v динофлагеллят и человека. HsH_v – *Homo sapiens* (NCBI: NP_001035196.1), KvH_v – *Karlodinium veneficum* (NCBI: AEQ59286.1), PmH_v – *Prorocentrum minimum* (MMETSP, Prorocentrum-minimum-CCMP2233: 128_1). Из: Поздняков, Скарлато, 2015.

3.1.7 Четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы

В транскриптомах *P. minimum* нами были найдены последовательности длиной 1500–2000 а.о., гомологичные каналам Ca_v и Na_v многоклеточных животных. Эти последовательности, принадлежащие семейству ЧД ПКК, имеют характерную четырехдоменную организацию. Идентичность каналов ЧД ПКК *P. minimum* и канала Na_v1 человека (2009 а.о.) составляет 22 % (2009 а.о.). Сравнение тех же последовательностей *P. minimum* с каналами Ca_v1 человека (1977 а.о.)

выявило идентичность, равную 21 % (1977 а.о.). В дальнейшем, с целью выявления и характеристики разнообразия этого семейства каналов, сыгравших важную роль в эволюции возбудимых мембран эукариот, был проведен филогенетический анализ ЧД ПКК *P. minimum* и других динофлагеллят, а также анализ структуры ряда функционально значимых участков (функциональных детерминант) этих каналов.

3.2 Филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят

3.2.1 Филогенетическое разнообразие потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят в пределах супергруппы SAR

С целью определения филогенетического положения и выявления филогенетического разнообразия четырехдоменных каналов динофлагеллят был проведен анализ 162 аминокислотных последовательностей каналов из семейства ЧД ПКК различных представителей супергруппы SAR, включая 24 последовательности динофлагеллят (Приложение, таблица 1) (Pozdnyakov, Skarlato, 2015; Pozdnyakov et al., 2016;). Реконструкция филогении ЧД ПКК внутри SAR с помощью метода максимального правдоподобия и байесовского анализа дала схожие топологии деревьев, различающиеся лишь в узлах с низкой статистической поддержкой, где значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют <62 % и <0,95, соответственно (рисунки 3.8–3.9; Приложение, рисунки 1–2). В обоих случаях наиболее дивергентным по отношению к основному массиву оказывается ряд последовательностей оомицет (Oomycota, одна из групп в составе Stramenopiles). Последовательности ЧД ПКК динофлагеллят распределились в четыре группы, которые были обозначены нами как A, B, C и D.

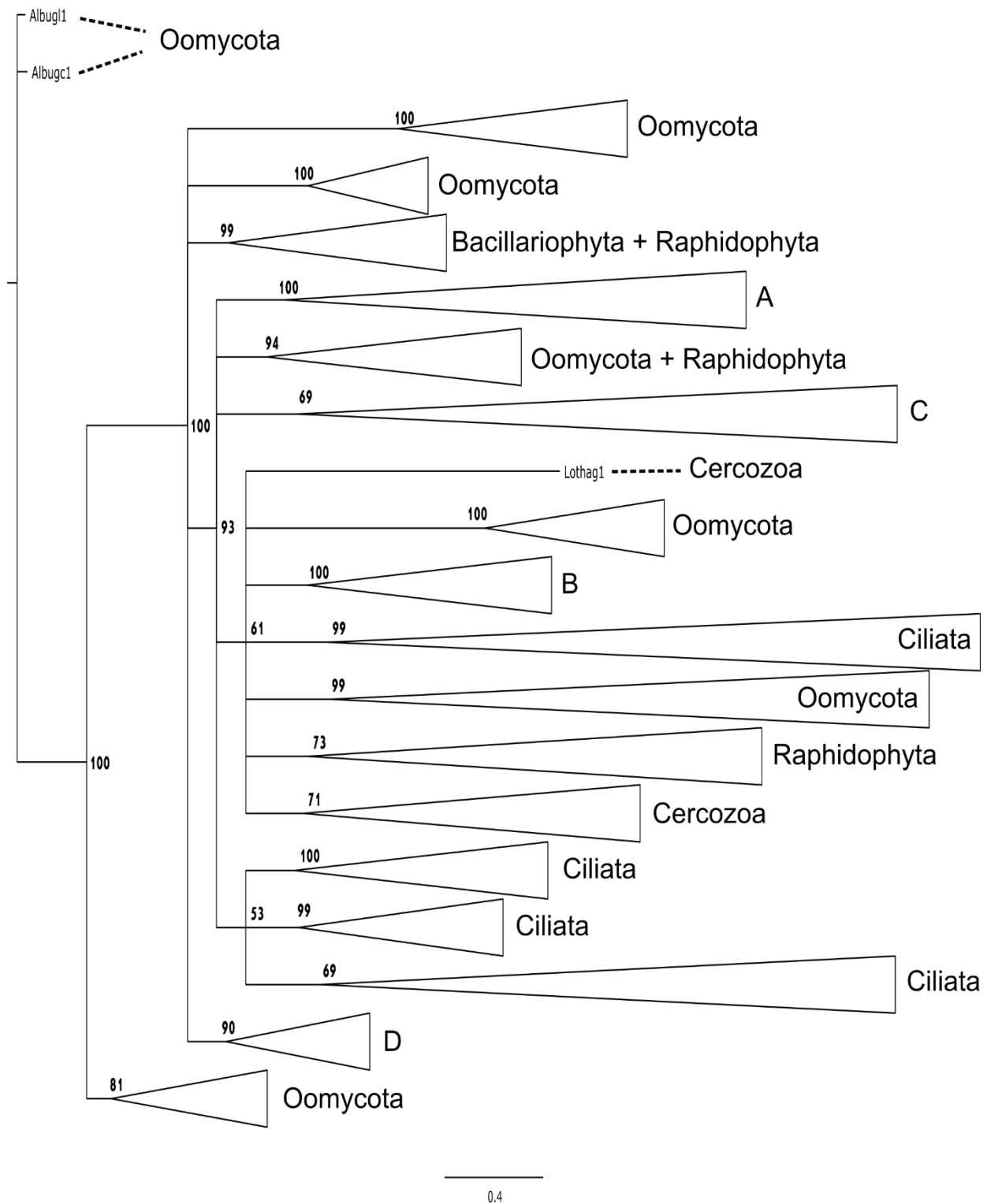


Рисунок 3.8. Сжатая филограмма семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенная методом максимального правдоподобия (LG + F + G). A, B, C, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения бутстреп в процентах. Масштабная линейка 0,4 замены на сайт. Здесь и на рисунках 3.9–3.17

аминокислотные последовательности обозначены в соответствии с таблицей 1 Приложения.

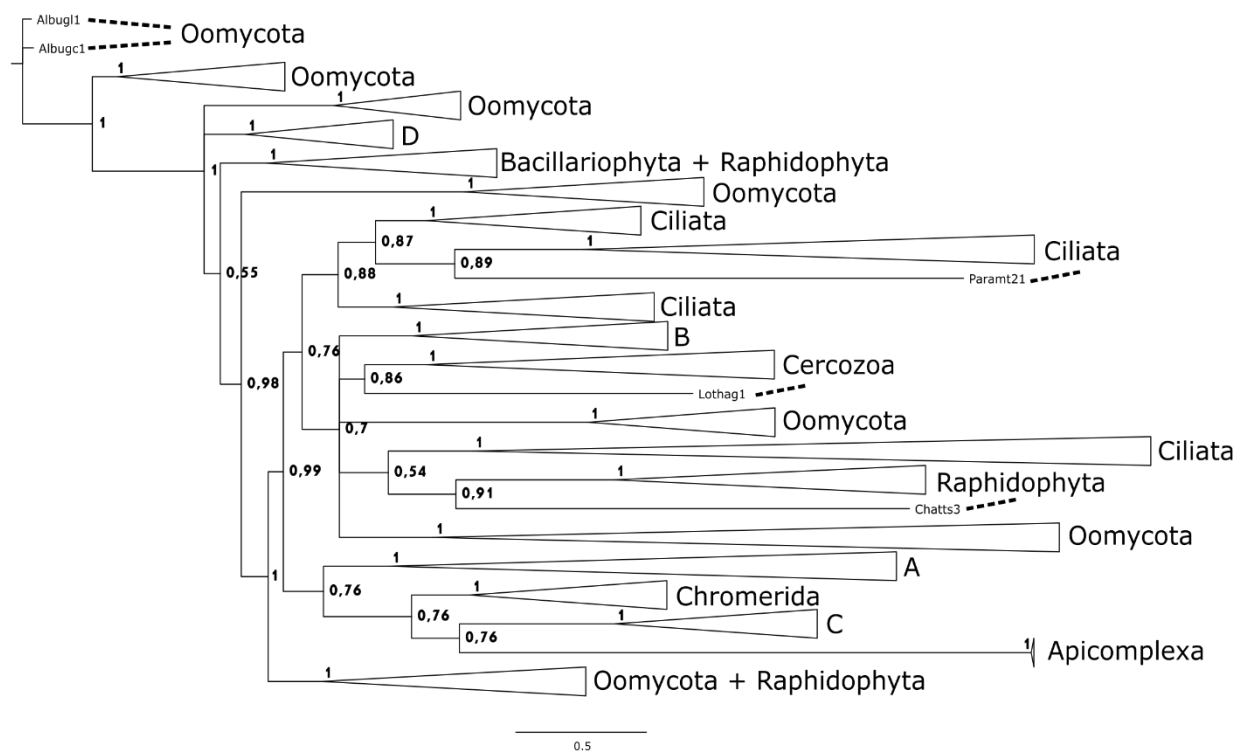


Рисунок 3.9. Сжатая филограмма семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенная с помощью байесовского анализа (LG + F + G). A, B, C, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения апостериорных вероятностей. Масштабная линейка 0,5 замены на сайт.

Кластер A (рисунок 3.10) содержит большинство последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят, представленных в анализе, и имеет статистическую поддержку (значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 100 % и 1, соответственно). Он объединяет большинство (20 из 24) последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят, представленных в данном анализе. Кроме того, данный кластер содержит последовательности четырехдоменных каналов других альвеолят: *Perkinsus marinus* (Perkinsozoa) и *Vitrella brassicaformis* (Chromerida).

Таким образом, кластер А объединил последовательности каналов трех наиболее близких линий альвеолят: Dinoflagellata, Perkinsozoa и Chromerida.

Однако эта группа последовательностей не является однородной. В то время как большая часть последовательностей (18 из 20, подгруппа A1) группируется вместе с последовательностями ЧД ПКК *P. marinus* (Perkinsozoa) (узел, объединяющий эти последовательности, поддержан значениями бутстреп и апостериорной вероятности 63 % и 0,97, соответственно), последовательности ЧД ПКК динофлагеллят St391309 и Ac28973 (виды *Scrippsiella trochoidea* и *Amphidinium carterae*, соответственно; подгруппа A2) отходят от общего ствола до разделения на линии динофлагеллят и перкинсозой. Следует отметить, что подгруппа A1 также содержит последовательности ЧД ПКК этих двух видов динофлагеллят, что свидетельствует о том, что подгруппы A1 и A2 представляют собой две линии паралогов.

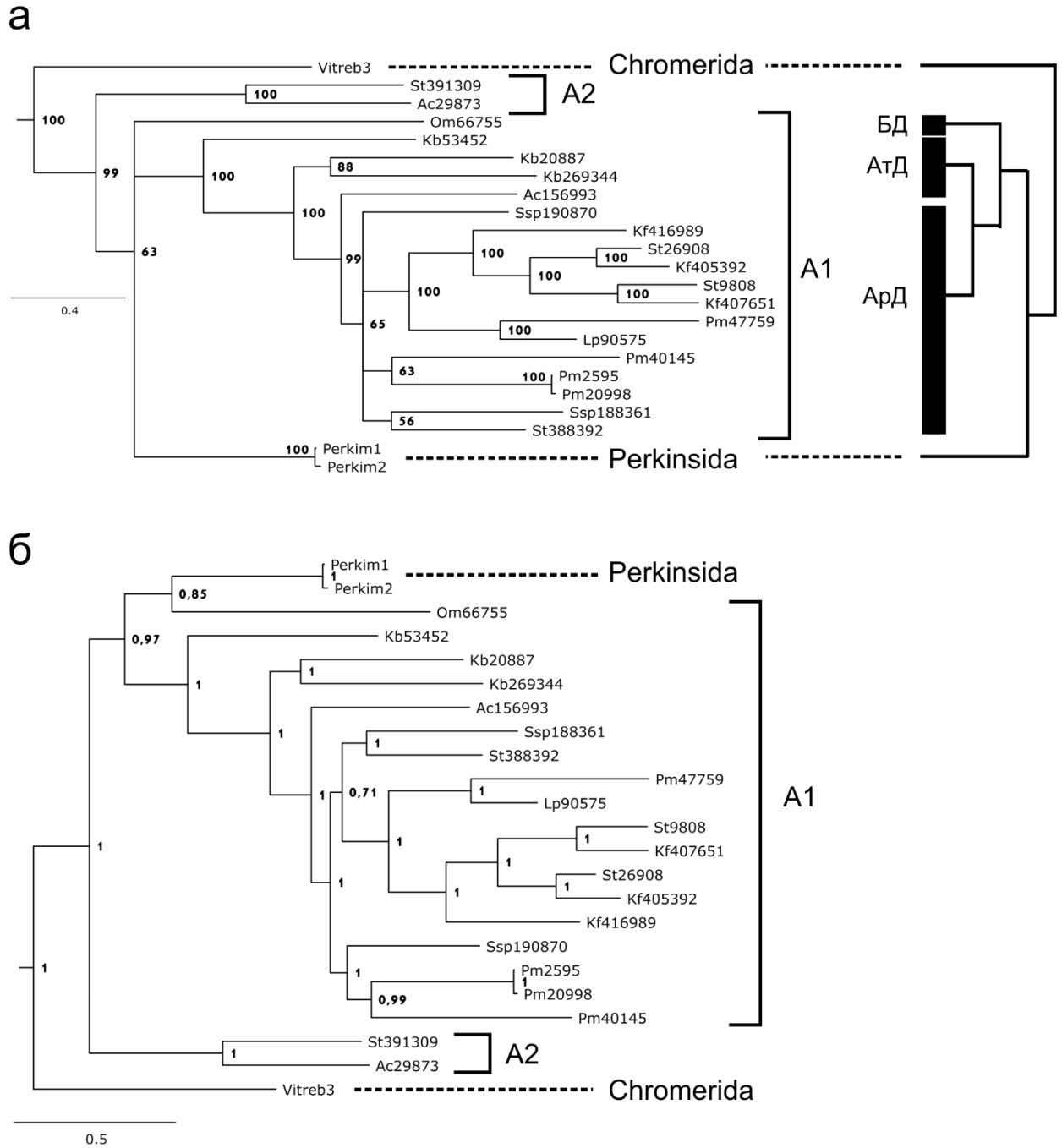


Рисунок 3.10. Кластер А. Фрагменты филограмм семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенных методом максимального правдоподобия (а) и с помощью байесовского анализа (б). A1, A2 – подгруппы в кластере А. Справа показана схема последовательности обособления некоторых групп Alveolata и групп динофлагеллят в эволюции. БД – базальные динофлагелляты, АтД – атекальные динофлагелляты, АрД – армированные динофлагелляты. В узлах

приведены значения бутстреп в процентах (а) и апостериорных вероятностей (б). Масштабная линейка 0,4 и 0,5 замены на сайт, соответственно.

Топология кластера внутри подгруппы A1 в общих чертах соответствует представлениям о филогении динофлагеллят: последовательности ЧД ПКК перкинсоиды *P. marinus* и вида *Oxyrrhis marina* из базальной линии динофлагеллят образуют боковые ветви по отношению к остальным последовательностям; далее отходят ветви с последовательностями четырехдоменных каналов атекальных динофлагеллят, а затем последовательности, принадлежащие «эволюционно молодым» армированным видам (рисунок 3.10).

В целом, подгруппа A1 объединяет паралогичные последовательности ЧД ПКК нескольких видов. Так, четыре последовательности ЧД ПКК *P. minimum*, представленные в анализе, представляют собой две группы паралогов. Первая группа включает последовательности Pm40145, Pm2595 и Pm20998 (значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 63 % и 0,99, соответственно), причем внутри этой группы последовательность Pm40145 наиболее дивергентна. Вторая группа, присутствующая во всех вариантах филогенетического анализа, включает последовательность ЧД ПКК *P. minimum* Pm47759 и *Lingulodinium polyedra* Lp90575 (значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 100 % и 1, соответственно).

Кластер В (рисунок 3.11) объединяет 4 последовательности ЧД ПКК: динофлагеллят *Karenia brevis* (Kb269973), хромерид *Vitrella brassicaformis*, инфузорий *Stylonychia lemnae* (Stylol3) и *Oxytricha trifallax* (Oxytrt9) (значения бутстреп и апостериорной вероятности для кластера составляют 100 % и 1, соответственно). Порядок отхождения ветвей соответствует данным о филогении Alveolata: первыми отделяются последовательности Ciliata Stylol3 и Oxytrt9 (принадлежат инфузориям видов *S. lemnae* и *O. trifallax*, соответственно), а затем разделяются последовательности ЧД ПКК более близких друг к другу типов Chromerida и Dinoflagellata: Vitreb1 и Kb269973, соответственно.

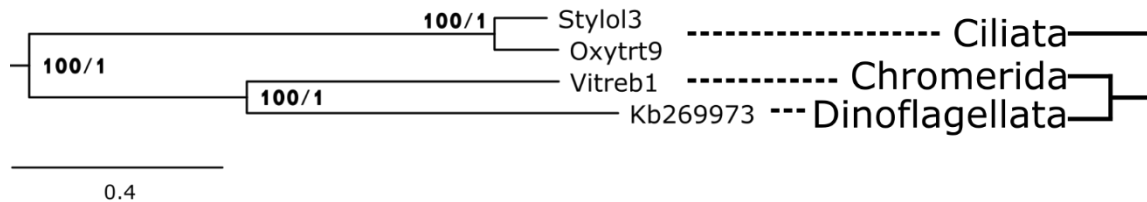


Рисунок 3.11. Кластер В. Фрагмент филограммы семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенной методом максимального правдоподобия. Показана схема предположительной последовательности обособления указанных групп Alveolata в эволюции. В узлах приведены значения бутстреп в процентах и апостериорных вероятностей, полученных в результате байесовского анализа. Масштабная линейка 0,4 замены на сайт.

Кластер С (рисунок 3.12), полученный в результате реконструкции филогении как методом максимального правдоподобия, так и с помощью байесовского анализа, включает две последовательности ЧД ПКК динофлагеллят St17126 и Kb20579 (*S. trochoidea* и *K. brevis*, соответственно), две последовательности споровиков Toxorg1 и Toxorg2 (*T. gondii*) и две последовательности хромерид Vitreb2 и Vitreb4 (*V. brassicaformis*). Однако этот кластер имеет значимую поддержку лишь в случае дерева, построенного методом максимального правдоподобия (значение бутстреп 69 %). Особенностью топологии этого кластера является то, что последовательности ЧД ПКК хромерид отстоят от последовательностей динофлагеллят дальше, чем последовательности споровиков, что не соответствует данным о порядке эволюционного формирования данных групп альвеолят. Кроме того, на филограмме, построенной по результатам байесовского анализа, кластер С является сестринским по отношению к кластеру А, однако узел, объединяющий оба кластера, не имеет значимой поддержки.

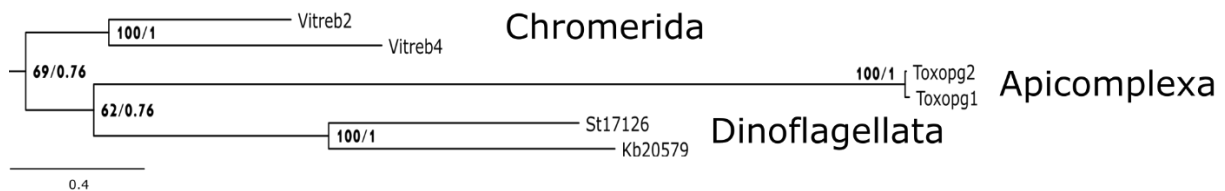


Рисунок 3.12. Кластер С. Фрагмент филограммы семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенной методом максимального правдоподобия. В узлах приведены значения бутстреп в процентах и апостериорных вероятностей, полученных в результате байесовского анализа. Масштабная линейка 0,4 замены на сайт.

На всех филограммах, полученных при анализе филогении последовательностей ЧД ПКК внутри супергруппы SAR, последовательность динофлагеллят из кластера D *Alexandrium tamarense* At406917 формирует устойчивый узел (значения бутстреп и апостериорной вероятности 90 % и 1, соответственно), объединяющий ее с последовательностью ЧД ПКК Ectocs1, принадлежащей бурым водорослям *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyta, одна из групп в составе Stramenopiles) (рисунок 3.13). Положение этого кластера оказывается базальным по отношению к кластерам А, В и С как в случае применения метода максимального правдоподобия, так и в случае байесовского анализа.

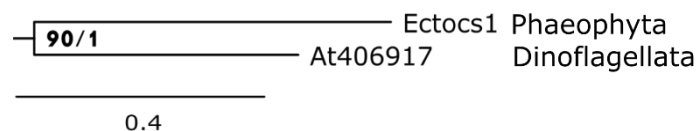


Рисунок 3.13. Кластер D. Фрагмент филограммы семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенной методом максимального правдоподобия. В узлах приведены значения бутстреп в процентах и апостериорных вероятностей, полученных в результате байесовского анализа. Масштабная линейка 0,4 замены на сайт.

При описании особенностей филограмм, полученных в результате применения метода максимального правдоподобия и байесовского анализа, важно отметить, что последовательности ЧД ПКК других организмов из супергруппы SAR (Stramenopiles: диатомовые и рафидофитовые водоросли, оомицеты; Alveolata: цилиаты; Rhizaria: cercozoa) также формируют ряд независимых клад, что указывает на существенное разнообразие четырехдоменных каналов в этих линиях SAR. Так, только последовательности инфузорий образуют четыре независимые клады.

3.2.2 Филогенетическое разнообразие четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят в пределах домена Eukaryota

Для того, чтобы определить филогенетические отношения между ЧД ПКК динофлагеллят и уже известными подсемействами ЧД ПКК (Na_v , HVA Ca_v , LVA Ca_v , NALCN и Cch), а также филогенетические отношения между ЧД ПКК в пределах домена Eukaryota, нами был проведен анализ 277 аминокислотных последовательностей каналов из семейства ЧД ПКК различных групп эукариот, включая 24 последовательности динофлагеллят (Приложение, таблица 1) (Pozdnyakov, Skarlato, 2015; Pozdnyakov et al., 2016). Реконструкция филогении ЧД ПКК как с помощью метода максимального правдоподобия, так и с помощью байесовского анализа дала схожие результаты (рисунки 3.14–3.15; Приложение, рисунки 3–4). Наиболее дивергентными последовательностями ЧД ПКК в обоих случаях оказались некоторые последовательности зеленых водорослей. Большая же часть последовательностей четырехдоменных каналов сгруппировалась в кластеры, порядок ветвления между которыми не разрешен.

Последовательности ЧД ПКК динофлагеллят распределились в те же четыре группы A, B, C и D. Ни одна из этих групп не сформировала единой клады ни с одним из пяти известных подсемейств ЧД ПКК: Na_v , HVA Ca_v , LVA Ca_v , NALCN или Cch.

Кластер А на филограммах, построенных обоими методами, имеет высокую статистическую поддержку: значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 99 % и 1, соответственно. Состав данного кластера остался неизменным: он объединяет последовательности трех групп альвеолят: *Dinoflagellata*, *Perkinsozoa* и *Chromerida*.

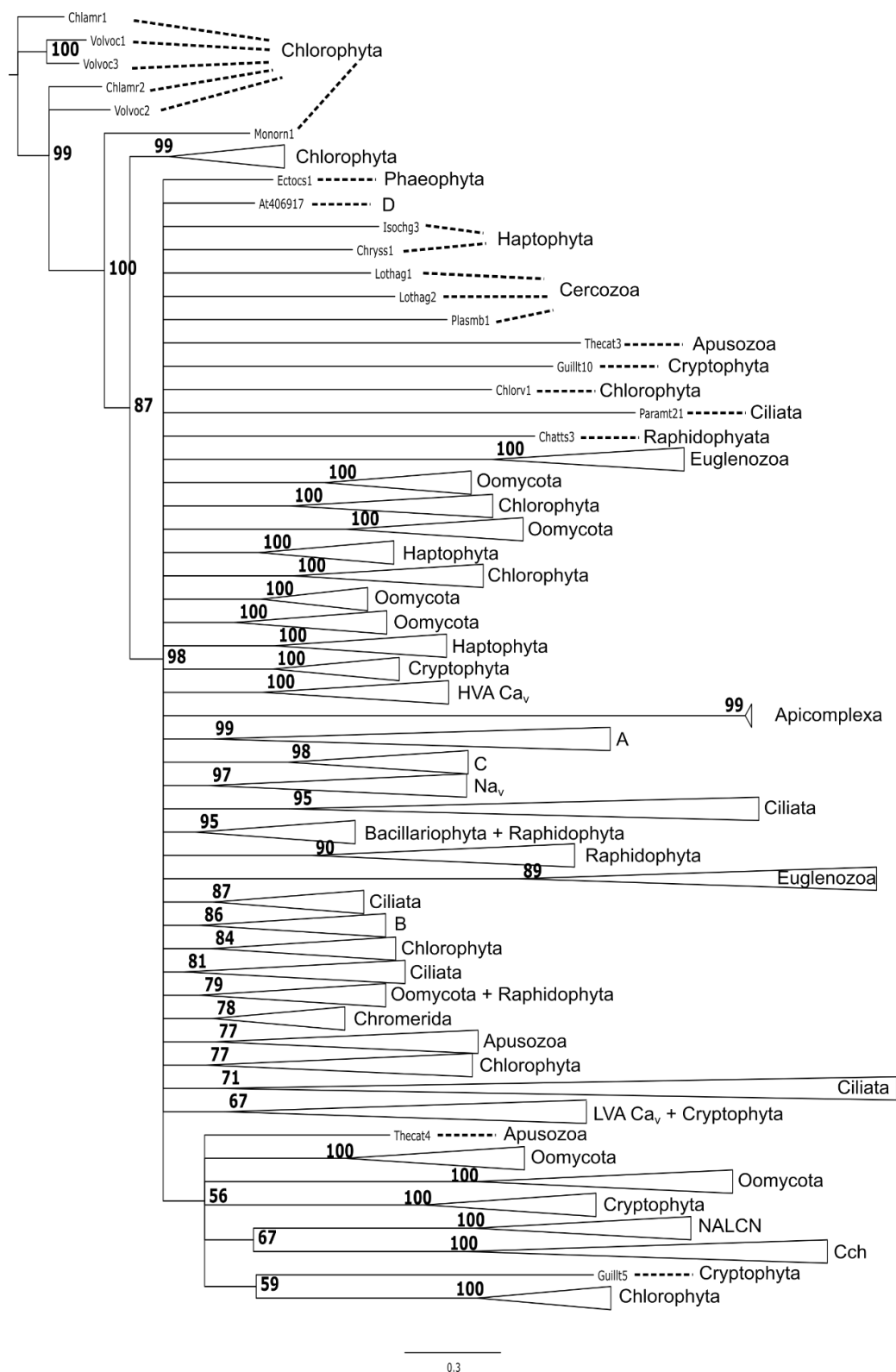


Рисунок 3.14. Сжатая филограмма семейства ЧД ПКК различных групп эукариот, построенная методом максимального правдоподобия (LG + F + G). А, В, С, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах приведены значения бутстреп в процентах. Масштабная линейка 0,3 замены на сайт.

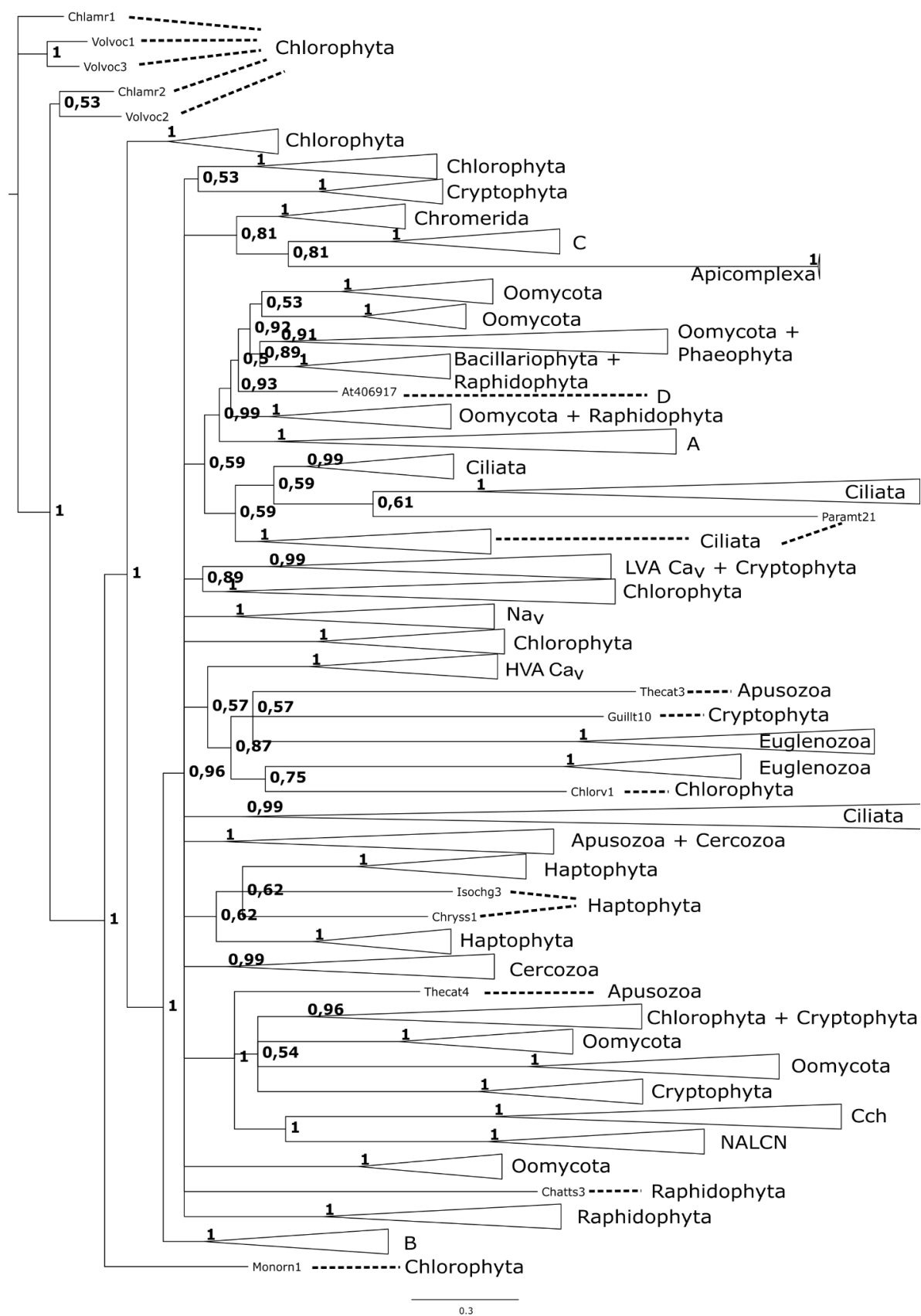


Рисунок 3.15. Сжатая филограмма семейства ЧД ПКК, построенная с помощью байесовского анализа (LG + F + G). А, В, С, D – кластеры, содержащие

аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах приведены значения апостериорных вероятностей. Масштабная линейка 0,3 замены на сайт.

Кластер В на обоих деревьях также имеет высокую поддержку: значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 86 % и 1, соответственно. Этот кластер имеет тот же состав, что и соответствующий кластер, полученный при анализе 162 последовательностей ЧД ПКК в пределах супергруппы SAR.

Кластер С (значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 98 % и 1, соответственно) объединяет лишь две последовательности четырехдоменных каналов. Это последовательности ЧД ПКК динофлагеллят *S. trochoidea* (St17126) и *K. brevis* (Kb20579). При этом, на филограмме, построенной методом байесовского анализа, эти последовательности сближаются с двумя последовательностями *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa) и *V. brassicaformis* (Chromerida), однако данный кластер не имеет статистической поддержки (значение апостериорной вероятности $<0,95$) и, кроме того, не выявляется в дендрограмме, построенной методом максимального правдоподобия.

Последовательность ЧД ПКК динофлагеллят *A. tamarense* (At406917) (кластер D) не группируется ни с одной другой последовательностью с достаточной статистической поддержкой (значения бутстреп и апостериорной вероятности <62 % и $<0,95$, соответственно).

Порядок разделения четырех кластеров, содержащих последовательности ЧД ПКК динофлагеллят, различен на двух представленных деревьях. На дереве, полученном методом максимального правдоподобия, порядок ветвления между кластерами не разрешен. В то же время на дереве, полученном в результате проведения байесовского анализа, кластер В является базальным по отношению к остальным трем группам (значение апостериорной вероятности 1).

Следует отметить, что результаты, полученные нами относительно пяти ранее известных подсемейств ЧД ПКК, подтверждают данные других авторов (Liebeskind et al., 2011; Cai, 2012; Liebeskind et al., 2012): на обоих деревьях

подсемейства NALCN животных и Csch грибов формируют единую кладу с хорошей статистической поддержкой (значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 67 % и 1, соответственно); некоторые последовательности апусомонад *Thecamonas trahens*, а также последовательности хоанофлагеллят *Monosiga brevicollis* группируются с подсемейством Na_v животных (значения бутстреп и апостериорной вероятности для общего узла составляют 97 % и 1, соответственно); последовательность хоанофлагеллят *Salpingoeca rosetta* составляет единую кладу с подсемейством HVA Ca_v животных (значения бутстреп и апостериорной вероятности равно 100 % и 1, соответственно). Общий узел между кладой с подсемействами NALCN и Csch и одной из последовательностей апусомонад *T. trahens*, который появляется в работах других авторов (Liebeskind et al., 2012), с достаточной поддержкой образовался лишь на дендрограмме, построенной по результатам байесовского анализа (значение апостериорной вероятности составляет 1).

Интересно отметить, что подсемейство LVA Ca_v животных по результатам анализа и тем, и другим методом образует единую кладу с некоторыми последовательностями криптомонад *Guillardia theta* (значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют 67 % и 0,98, соответственно).

3.3 Анализ структуры функционально значимых участков аминокислотных последовательностей четырехдоменных потенциал- управляемых катионных каналов динофлагеллят

Филогенетическое разнообразие ЧД ПКК как динофлагеллят, так и эукариот в целом может свидетельствовать об их функциональном разнообразии. Для того чтобы получить представления о возможных функциональных особенностях ЧД ПКК динофлагеллят, нами был предпринят биоинформатический анализ

первичной и вторичной структуры нескольких функционально значимых участков этих каналов, а именно: селективного фильтра, сегмента S4 и участка инактивационных ворот (Поздняков, 2016; Pozdnyakov, 2016; Pozdnyakov et al., 2016; Pozdnyakov, Skarlato, 2016;).

3.3.1 Структура селективного фильтра

С помощью множественных выравниваний идентифицированных аминокислотных последовательностей ЧД ПКК девяти видов динофлагеллят с аминокислотными последовательностями уже охарактеризованных четырехдоменных каналов животных в каждом из четырех доменов 24 ЧД ПКК динофлагеллят были выявлены аминокислотные остатки, входящие в состав селективного фильтра (рисунок 3.16, таблица 3.2).

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 одна из проанализированных последовательностей – St17126 (*S. trochoidea*) – имеет селективный фильтр с заменой заряженного глутамата на незаряженный глутамин во втором домене: E/Q/E/E.

	DI				DII				DIII				DIV																											
HomoCavL	F	Q	C	I	T	M	E	G	W	T	D	V	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	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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
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	F	I	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	A	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	
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	F	L	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	V	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	F	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	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	F	E	I	S	T	T	E	G	W	I	D	V	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	F	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	V	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	F	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	V	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	F	E	I	A	T	T	E	G	W	V	D	V	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	F	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	V	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	F	E	I	S	T	T	E	G	W	A	D	V	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	F	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	V	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	F	E	I	M	S	T	E	G	W	V	D	V	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	F	I	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	A	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	F	T	E	I	S	T	T	E	G	W	V	D	V	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	F	E	I	C	T	T	E	G	W	V	D	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	F	H	I	S	T	G	E	G	W	L	D	T	L

Рисунок 3.16. Первичная структура участков поровых петель четырех доменов (DI–IV) ЧД ПКК динофлагеллят и опистоконт. Прямоугольниками выделены остатки аспартата (E) и глутамина (Q), формирующие селективный фильтр канала.

Таблица 3.2. Обобщенные данные о структуре функционально значимых участков (селективных фильтров, сегментов S4, участков, гомологичных участку инактивационных ворот каналов Na_v и обрамляющих их вторичных структур) ЧД ПКК динофлагеллят в соответствии с их филогенетической кластеризацией. Серым цветом выделены последовательности ЧД ПКК *P. minimum*. В колонке «Сегменты S4»: v – лизин/аргинин-богатый сегмент, x – лизин/аргинин-обедненный сегмент; положение x и v отражает номер домена, в котором находится данный сегмент. В колонке «Мотив инакт. ворот»: голубой цвет – остатки полярных незаряженных аминокислот, зеленый цвет – остатки гидрофобных аминокислот, желтый цвет – остатки неполярных негидрофобных аминокислот, красный цвет – остатки полярных заряженных аминокислот; полужирным шрифтом выделены последовательности с каноническим мотивом инактивационных ворот. В колонке «Вторич. структуры»: **** – положение мотива инактивационных ворот; α – альфа-спираль β – бета-структура; н/о – вторичная структура не определена.

Кластер		Последоват-ть	Селективный фильтр	Сегменты S4	Мотив инакт. ворот	Вторич. структуры
A	A1	Ac156993	E/E/E/E	v/v/v/v	TCLT	н/о
		Kb20887	E/E/E/E	v/v/v/v	VMLT	****α
		Kb269344	E/E/E/E	v/v/v/v	FLLT	н/о
		Kb53452	E/E/E/E	v/v/v/v	SLLT	н/о
		Kf405392	E/E/E/E	v/v/v/v	YLLT	α****α
		Kf407651	E/E/E/E	v/v/v/v	DIIS	****α
		Kf416989	E/E/E/E	v/v/v/v	FMLT	****α
		Lp90575	E/E/E/E	v/v/v/v	QTVS	****α
		Om66755	E/E/E/E	v/v/v/v	IWAT	****α
		Pm40145	E/E/E/E	v/v/v/v	LKLT	****α
		Pm47759	E/E/E/E	x/v/v/x	GMLT	****α
		Pm20998	E/E/E/E	-/v/v/v	IMST	вставка, ****α
		Pm2595	E/E/E/E	v/v/v/v	IMST	вставка, ****α
		St9808	E/E/E/E	v/v/v/v	DIIS	****β
		St26908	E/E/E/E	v/v/v/v	VLLS	α****
		St388392	E/E/E/E	v/v/v/v	LMLT	****α
		Ssp188361	E/E/E/E	v/v/v/v	ILLT	н/о

	A2	Ssp190870	E/E/E/E	v/v/v/v	VMLT	 α
		Ac29873	E/E/E/E	x/v/v/v	YLMT	 β
		St391309	E/E/E/E	v/v/v/v	LMIT	 α
B		Kb269973	E/E/E/E	v/v/v/v	LVL T	 α
C		Kb20579	E/E/E/E	v/v/v/v	EMSS	 α
		St17126	E/Q/E/E	v/v/v/v	DLID	 α
D		At406917	E/E/E/E	-/v/v/v	VLLT	 α

3.3.2 Структура сегментов S4

Из литературных данных известно, что сегмент S4 принимает непосредственное участие в потенциал-управляемой активации большинства четырехдоменных каналов, выполняя роль сенсора напряжения. Эта функция сегмента S4 обусловлена наличием большого числа положительно заряженных аминокислотных остатков лизина и аргинина (Hille, 2001). Считается, что каналы подсемейств NALCN и Csch не способны активироваться при изменениях мембранного потенциала по причине обедненности их сегментов S4, в особенности сегмента S4 домена IV, остатками лизина и аргинина (Liu et al., 2006; Lu et al., 2007; Liebeskind et al., 2012). Таким образом, характеристика первичной структуры этих сегментов может дать представления об их функциональной роли.

С помощью множественных выравниваний идентифицированных аминокислотных последовательностей ЧД ПКК девяти видов динофлагеллят с аминокислотными последовательностями уже охарактеризованных четырехдоменных каналов животных в каждом из четырех доменов 24 ЧД ПКК динофлагеллят были выявлены сегменты S4 (таблица 3.2; рисунок 3.17).

Анализ показал, что некоторые последовательности сегментов S4 ЧД ПКК динофлагеллят имеют лизин/аргинин-обедненную структуру. К таким последовательностям относятся последовательность *P. minimum* Pm47759 и последовательность *A. carterae* Ac29873. Pm47759 имеет сегменты S4, обедненные положительными зарядами, в доменах I и IV. Ac29873 имеет такой сегмент S4 только в домене I.

Информации о первичной структуре сегмента S4 домена I последовательностей *P. minimum* Pm20998 и *A. tamarense* At406971 получено не было, так как домены I этих последовательностей представлены в транскриптах частично, начиная с внеклеточных петель между сегментами S4–S5.

Остальные 20 последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят имеют лизин/аргинин-богатые сегменты S4 во всех четырех доменах.

	DI	DII	DIII	DIV
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	H I S R F Y R V I - - - I	R I F K G L T A L R A L R	W F H 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 F 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 I 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	H 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 H	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 H
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

Рисунок 3.17. Первичная структура сегментов S4. DI–IV – домены. Прямоугольниками выделены остатки положительно заряженных лизина (K) и аргинина (R). Овалами выделены остатки гистидина (H).

3.3.3 Первичная и вторичная структура области инактивационных ворот

Способность ионных каналов к инактивации при продолжающемся стимулировании имеет важнейшее физиологическое значение. У различных подгрупп каналов семейства ЧД ПКК животных существуют различные и не во всех случаях известные механизмы инактивации, однако по своей кинетике все процессы разделяют на быструю и медленную инактивацию (Hille, 2001).

Для каналов подсемейства Na_v была предложена модель быстрой инактивации, известная как «шарик на цепочке». Согласно этой модели, в области участка канала, соединяющего домены III и IV, существуют так называемые инактивационные ворота («шарик»), способные блокировать пору канала уже через несколько миллисекунд после его активации. Такие инактивационные ворота образованы четырьмя аминокислотными остатками, первые три из которых – неполярные гидрофобные (IFM у каналов Na_v1), а четвертый – остаток полярной незаряженной аминокислоты треонина (Т). Показано, что триплет гидрофобных аминокислот («инактивационная частица») играет роль в докинге инактивационных ворот в области поры канала (рисунок 3.18) (Goldin, 2003). Кроме того, в ряде работ было показано, что последовательность инактивационных ворот из четырех аминокислотных остатков обрамлена двумя консервативными альфа-спиралями (рисунок 3.19). Предполагается, что наличие этих альфа-спиралей способствует стабилизации инактивационной частицы в сайте докинга (Sirota et al., 2002; Liebeskind et al., 2011).

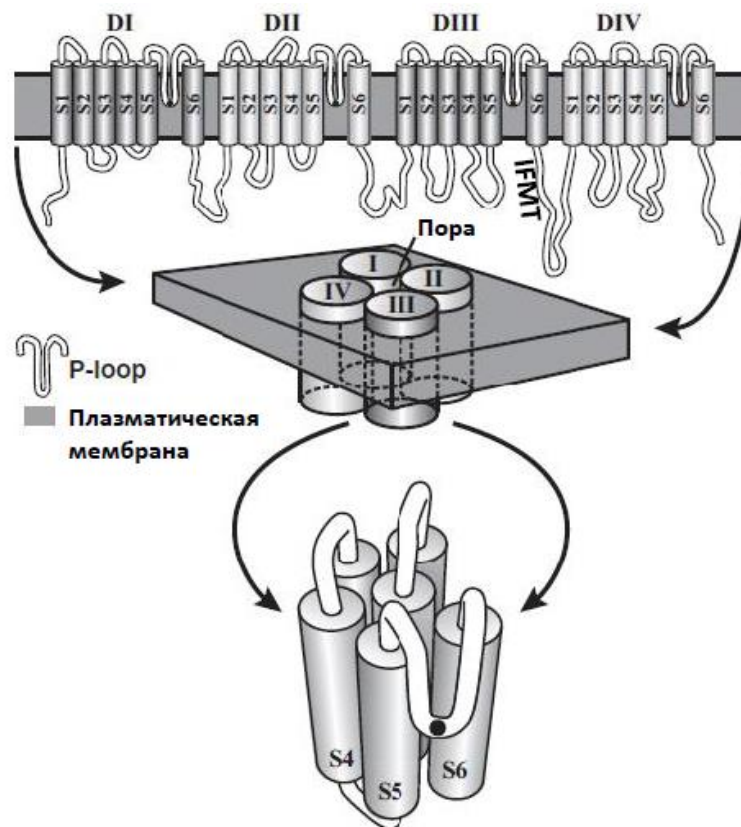


Рисунок 3.18. Вторичная структура канала Na_v . Сверху: четыре домена DI–DIV, каждый из которых состоит из шести трансмембранных сегментов S1–S6; IFMT – мотив инактивационных ворот. В центре: план трехмерной организации четырех доменов канала. Внизу: вторичная структура одного из четырех доменов; черной точкой отмечена позиция в структуре поровой петли, принимающая участие в формировании селективного фильтра канала. P-loop – поровая петля. Из: Liebeskind et al., 2011, с изменениями.

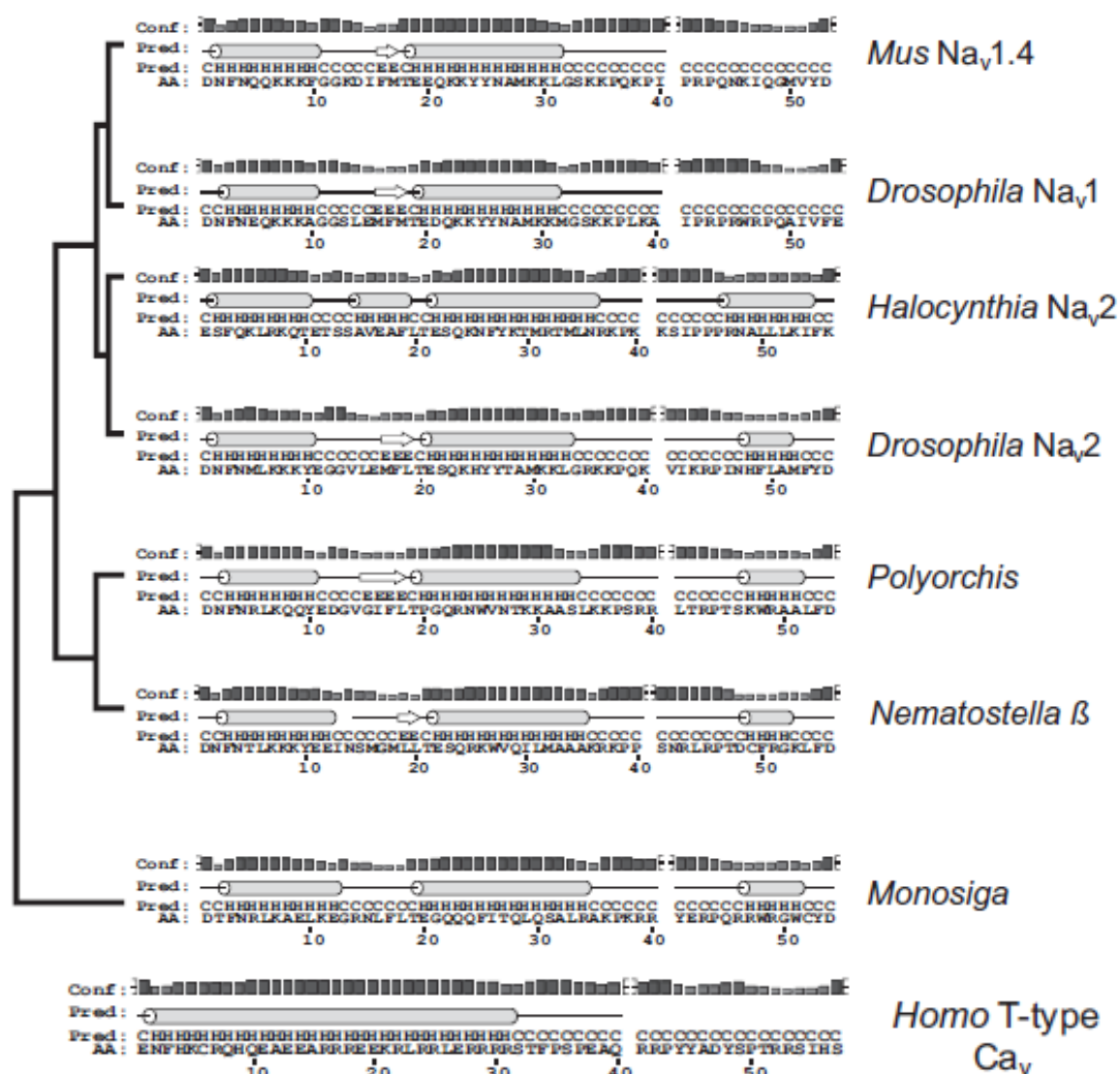


Рисунок 3.19. Вторичная структура аминокислотных последовательностей каналов Na_v и LVA Ca_v , принадлежащих различным представителям супергруппы Opisthokonta, в области цитозольной петли между доменами DIII и DIV. Цилиндрами показаны альфа-спиральные структуры. Из: Liebeskind et al., 2001.

В то же время потенциал-управляемые кальциевые каналы не обладают таким механизмом быстрой инактивации и последовательностью инактивационных ворот, а вторичная структура участка, гомологичного инактивационным воротам, имеет вид единственной и более протяженной альфа-спирали (Liebeskind et al., 2001).

Для того чтобы дать характеристику этого функционально важного участка и таким образом определить вероятную способность ЧД ПКК динофлагеллят к быстрой инактивации по типу каналов Na_v , нами был предпринят анализ первичной (таблица 3.2) и вторичной структуры их последовательностей в области, гомологичной области инактивационных ворот каналов Na_v . На основании проведенного анализа все последовательности были разбиты на шесть групп в соответствии с первичной структурой участка, гомологичного инактивационным воротам.

1. 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 Pm47759 (*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, обычно гидрофобной аминокислоты, что соответствует данным о структуре инактивационных ворот каналов Na_v .

2. Пять из 24 аминокислотных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят несут в составе триплета «инактивационной частицы» только два 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.

3. Кроме того, еще две последовательности имеют только один остаток гидрофобной аминокислоты, тогда как две другие позиции занимают остатки

полярных незаряженных аминокислот (треонин, цистеин и глутамин). Четвертое положение в составе инактивационных ворот занимает остаток треонина или серина.

4. Три из 24 аминокислотных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят несут в составе триплета два остатка гидрофобных аминокислот, тогда как оставшаяся позиция занята остатком полярной заряженной аминокислоты (аспартата или лизина). Четвертое положение в составе инактивационных ворот занимает остаток треонина или серина.

5. Одна 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.

6. Самая дивергентная последовательность имеет вид DLLD, то есть несет один заряженный аминокислотный остаток в составе инактивационной частицы, а один остаток заряженной аминокислоты замещает консервативный для инактивационных ворот тирозин/серин в четвертом положении. Это сближает данную последовательность с каналами подсемейства HVA Ca_v . Так, канал $Ca_v1.2$ человека имеет в этом участке последовательность вида CELD с той же характеристикой состава аминокислотных остатков.

При моделировании вторичной структуры цитозольного линкера между доменами III и IV, содержащего инактивационные ворота, все 24 последовательности ЧД ПКК динофлагеллят были разбиты на пять групп в соответствии с предсказанными вторичными структурами.

1. Для четырех последовательностей (Ac156993 (*A. carterae*), Kb269344, Kb53452 (*K. brevis*), Ssp188361 (*Simbiodinium* sp.)) в рассматриваемом участке не удалось определить вид вторичных структур с высокой степенью значимости (PsiPred score <9) (Приложение, рисунки 5–8).

2. Большинство (16 из 24) проанализированных последовательностей имеют одну консервативную альфа-спираль (рисунки 3.20–3.22; здесь и далее в тексте приведены рисунки по данным для модельного объекта *P. minimum*; Приложение,

рисунки 9–20), расположенную за инактивационными воротами, с высокой степенью значимости (PsiPred score = 9) (Приложение, рисунок). Среди этих последовательностей выделяются две последовательности ЧД ПКК *P. minimum*: Pm2595 и Pm20998 с идентичной первичной структурой в этой области (рисунок 3.19). Также у этих последовательностей имеется одна предсказанная бета-структура позади консервативной альфа-спирали. Кроме того, они имеют характерную только для них вставку в 82 а.о. перед участком, гомологичным инактивационным воротам Na_v . Эта вставка на большем протяжении имеет неопределенную вторичную структуру и одну предсказанную бета-структуру.

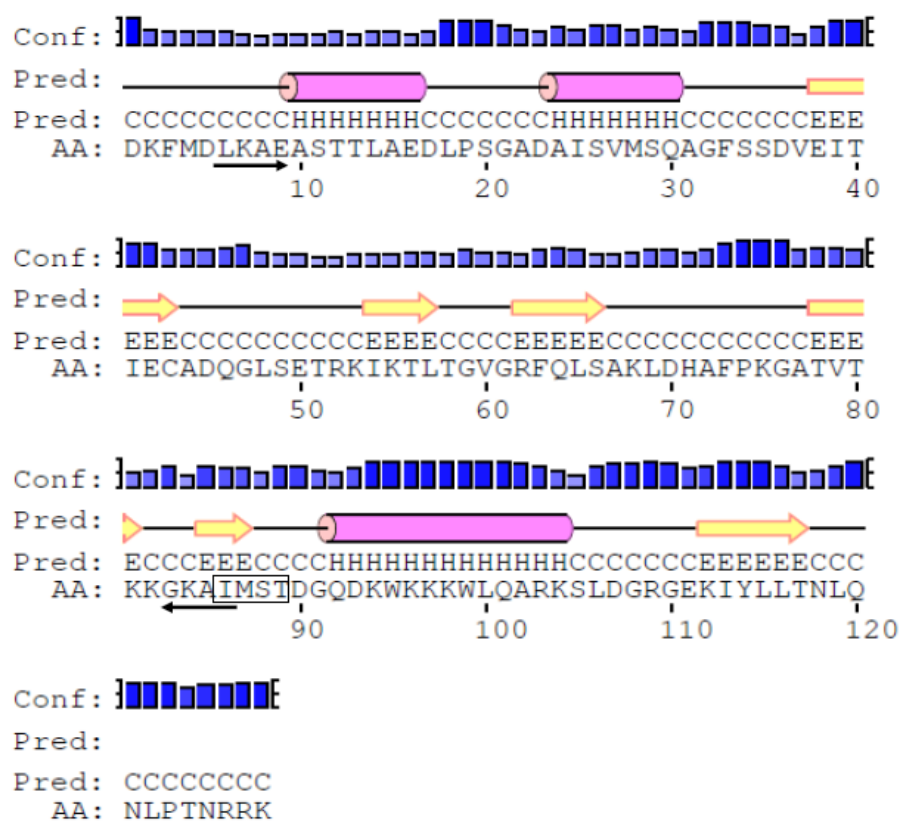


Рисунок 3.20. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотных последовательностей цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов *P. minimum* Pm2595 и Pm20998. Стрелками обозначена вставка в 82 а.о. Здесь и далее: Conf – уровень значимости, Pred – предсказанная вторичная структура, AA – анализируемая последовательность.



Рисунок 3.22. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *P. minimum* Pm40145.

3. Последовательность Kf405392 (*Kryptoperidinium foliaceum*) имеет две предсказанные альфа-спирали, которые с двух сторон обрамляют участок, гомологичный инактивационным воротам, что характерно для каналов Na_v (Приложение, рисунок 21).

4. Еще одна последовательность St26908 (*S. trochoidea*) имеет одну предсказанную альфа-спираль перед участком инактивационных ворот (Приложение, рисунок 22).

5. У двух последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят Ac29873 (*A. carterae*) и St9808 (*S. trochoidea*) с высокой статистической поддержкой присутствуют лишь бета-структуры позади участка, гомологичного инактивационным воротам (Приложение, рисунки 23–24).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о существовании разнообразия в отношении первичной и вторичной структуры участка, гомологичного участкам инактивационных ворот, и обрамляющих его последовательностей у ЧД ПКК динофлагеллят в целом и *P. minimum* в частности.

3.4 Регистрация активности ионных каналов динофлагеллят

Анализ транскриптомов динофлагеллят выявил высокое разнообразие катионных каналов у этих организмов, в том числе у модельного вида *P. minimum*. Кроме того, анализ аминокислотных последовательностей каналов семейства ЧД ПКК динофлагеллят показал существование филогенетического и, вероятно, функционального разнообразия внутри этой группы катионных каналов. Тем не менее, для того чтобы с уверенностью говорить о функциональном разнообразии катионных каналов у динофлагеллят, необходимо исследовать его на электрофизиологическом уровне с помощью одного из методов регистрации трансмембранных ионных токов. Для этого нами был выбран метод локальной фиксации потенциала на мембране – наиболее эффективный подход для функциональной характеристики ионных каналов. До сих пор данный метод не был успешно применен для изучения ионных токов у динофлагеллят, поскольку подвижность их клеток и сложное строение покровов препятствуют его применению к нативным клеткам организмов из этой группы протистов (Поздняков, 2012). Таким образом, перед нами встала задача разработать подход, который позволил бы использовать метод локальной фиксации потенциала на мембране для изучения ионных каналов динофлагеллят на примере модельного вида *P. minimum*.

3.4.1 Разработка подхода к применению метода локальной фиксации потенциала на мембране для изучения ионных каналов динофлагеллят

Нативные клетки динофлагеллят *P. minimum* не могут быть использованы в электрофизиологических исследованиях с помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране, так как их мембрана не способна формировать плотный контакт со стеклянной поверхностью регистрирующей микропипетки. По-видимому, это связано с наличием жестких целлюлозных текальных пластин,

содержащихся в амфиесмальных пузырьках этих клеток. Важно отметить, что текальные пластины *P. minimum* формируют множество выступов (шипиков) на поверхности клетки. Таким образом, несмотря на то что плазматическая мембрана расположена над содержащими целлюлозу амфиесмальными пузырьками, стеклянная микропипетка не может сформировать с ней плотный контакт, то есть не соблюдается важнейшее условие для осуществления регистрации ионных токов методом пэтч-кламп (Поздняков, 2014а). Для решения проблемы применения метода локальной фиксации потенциала на мембране для изучения ионных каналов динофлагеллят *in situ* нами были предложены три подхода.

Первый подход был основан на литературных данных о том, что динофлагелляты *P. minimum* делятся по принципу десмошизиса, при котором каждая дочерняя клетка наследует половину родительской теки. Таким образом, мы предположили, что сразу после деления половина плазматической мембраны клетки может быть доступна для образования плотного контакта с регистрирующей микропипеткой. Однако окраска делящихся клеток *P. minimum* с помощью флуоресцентного красителя целлюлозы Calcofluor White M2R (CFW) показала, что, хотя эти динофлагелляты действительно делятся путем десмошизиса, формирование новой половины теки происходит еще во время цитокинеза (рисунок 3.23). Таким образом, и до, и после деления вся поверхность клетки остается недоступной для образования плотного контакта с микропипеткой.

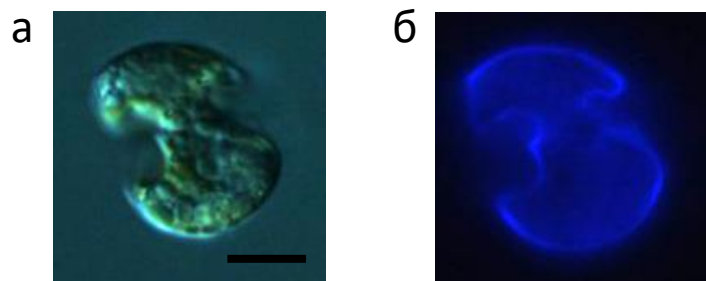


Рисунок 3.23. Десмошизис *P. minimum*. Фотография делящейся клетки, окрашенной красителем целлюлозы Calcofluor White M2R, полученная с помощью метода ДИК (а) и в ультрафиолетовом свете (б). Масштабная линейка 10 мкм.

Второй подход был основан на том, что клетки динофлагеллят под действием различных стрессорных факторов претерпевают экдизис – сбрасывание внешней части уже существующих покровов (а именно: ПМ, ВМАП и ТП) и формирование новой плазмалеммы из ВнМАП. В связи с этим ожидалось, что покровы только что экдизировавших клеток будут содержать целлюлозу в гораздо меньшем количестве, делая возможным формирование плотного контакта мембраны со стеклянной микропипеткой. Мы использовали центрифугирование в качестве стрессового фактора, инициирующего экдизис у *P. minimum*. Окрашивание клеток *P. minimum* с помощью CFW показало значительное снижение содержания целлюлозы в покровах экдизировавших клеток по сравнению с необработанными клетками (рисунок 3.24, а–б). Тем не менее, при соприкосновении стеклянного микроэлектрода с поверхностью экдизировавших клеток не наблюдалось увеличения электрического сопротивления, которое свидетельствовало бы о процессе образования плотного контакта между стеклом и плазматической мембраной.

Третий подход был основан на получении сферопластов из клеток *P. minimum* с помощью ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрилла (ДХБ) (Поздняков, 2014а,б; Pozdnyakov, Matantseva, 2013; Pozdnyakov et al., 2014; Pozdnyakov, Skarlato, 2014). Сферопласты образовывались при обработке клеточной культуры ДХБ в концентрациях 50–300 мкМ в течение 1–5 суток. Сферопласты диаметром 7–20 мкм имели сферическую форму, тем самым отличаясь от нативных уплощенных клеток. Окраска клеток *P. minimum* красителем CFW показала пониженный уровень содержания целлюлозы в покровах ДХБ-индуцированных сферопластов по сравнению с необработанными клетками и клетками, обработанными 5–30 мМ ДМСО, использовавшимся для приготовления раствора ДХБ в качестве растворителя (рисунок 3.24, а, в, г).

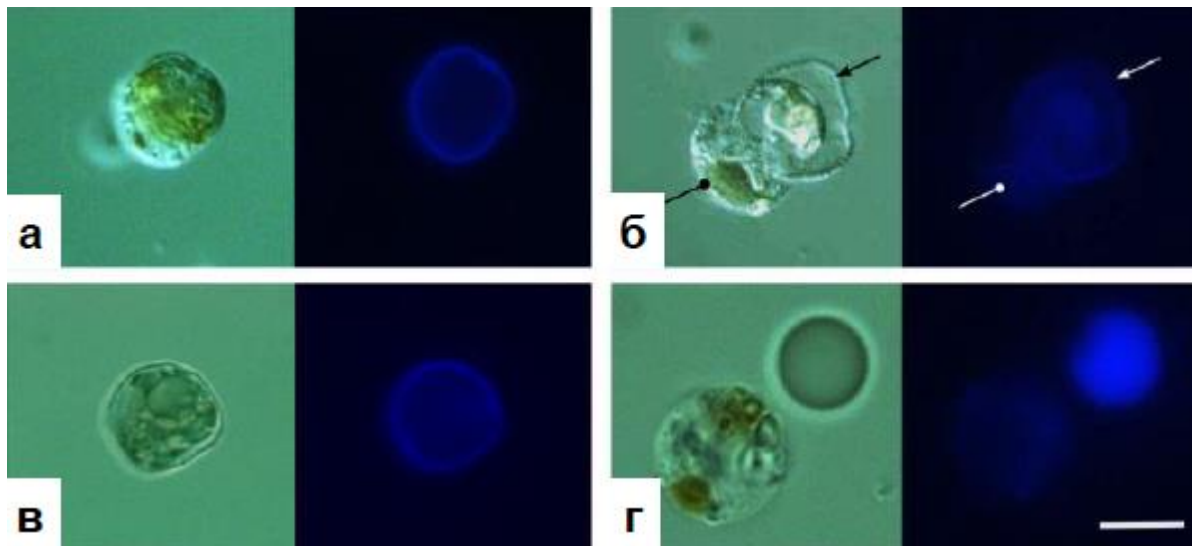


Рисунок 3.24. Микрофотографии клеток *P. minimum*, окрашенных CFW. а – нативная клетка, б – клетка, проходящая экдизис (стрелка с круглым концом) и сбрасываемая тека (стрелка с треугольным концом), в – клетка, обработанная 10 mM ДМСО, г – клетка, обработанная 100 мкм ДХБ. Слева – изображения, полученные с помощью метода ДИК, справа – в ультрафиолетовом свете. Масштабная линейка 10 мкм. Из: Pozdnyakov et al., 2014, с изменениями.

ДХБ-индуцированные сферопласты оказались способны к формированию плотного контакта со стеклянной микропипеткой, впервые делая возможной регистрацию мембранных ионных токов с помощью метода локальной фиксации потенциала на мембране. Сразу после касания микропипеткой поверхности сферопласта в пипетке создавали отрицательное давление, которое поддерживалось до достижения сопротивления 500–600 МОм. Во многих случаях после достижения этих значений сопротивления формировался плотный контакт с сопротивлением 1–10 ГОм, достаточным для регистрации ионных токов через одиночные ионные каналы. Важно отметить, что ДХБ-индуцированные сферопласты способны возобновлять свою подвижность, что свидетельствует об их жизнеспособности и физиологической активности.

3.4.2 Максимальный выход ДХБ-индуцированных сферопластов

С целью определения условий максимального выхода сферопластов и, следовательно, повышения эффективности работы нами были протестированы различные концентрации ДХБ (50–300 мкМ) и время инкубации (1–5 суток), используемые при получении сферопластов. Средний максимальный выход сферопластов имел значение $9,5 \% \pm 1,5 \%$ (среднее $\pm$ стандартное отклонение). Это значение достигалось при действии 100–250 мкМ ДХБ, независимо от времени инкубации в пределах исследованного диапазона 1–5 суток (рисунок 3.25). Кроме того, выход сферопластов не зависел от стадии роста культуры на момент воздействия ДХБ.

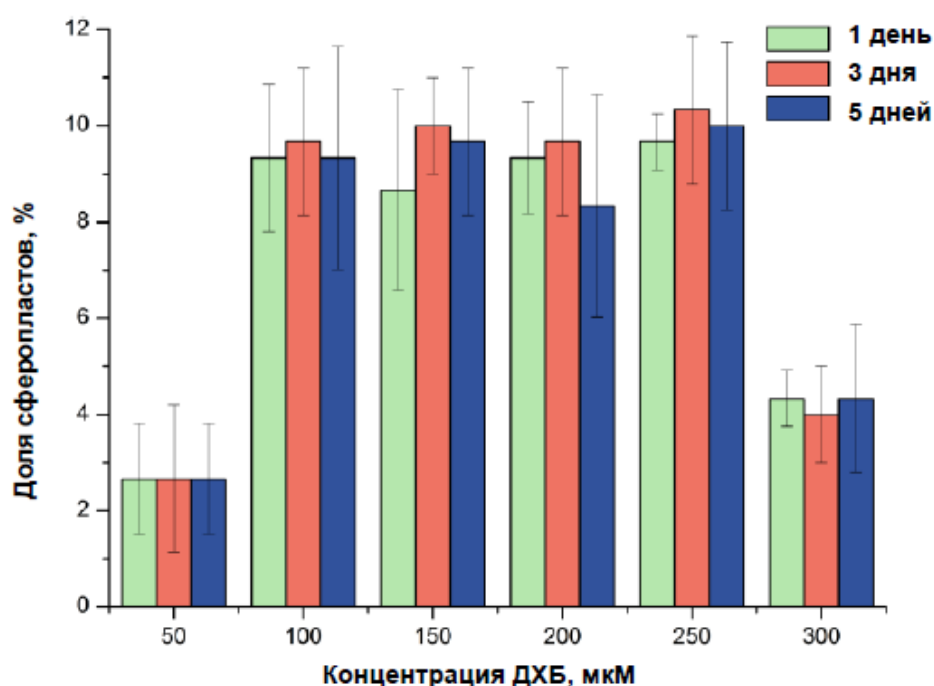


Рисунок 3.25. Зависимость доли полученных сферопластов от концентрации ДХБ и времени инкубации. Показаны стандартные отклонения. Из: Pozdnyakov et al., 2014, с изменениями.

3.4.3 ДХБ-индуцированный экдизис клеток *P. minimum*

Уровень экдизиса в культуре клеток *P. minimum*, обработанных 100 мкМ ДХБ, существенно выше, чем в культуре, обработанной лишь 10 мМ ДМСО или необработанной ничем (t-тест, $p < 0,05$) (рисунок 3.26, а). Экдизис, индуцированный ДХБ, начинается по прошествии 4 ч инкубации и достигает постоянного максимального уровня через 20 ч. Таким образом, ДХБ может рассматриваться как стрессорный агент, вызывающий экдизис у динофлагеллят, а процесс образования сферопластов связан не только с ингибированием синтеза новой целлюлозы, но и со сбрасыванием уже имеющихся целлюлозных пластин.

Так как экдизис *P. minimum* может быть вызван центрифугированием, мы ожидали увеличения выхода сферопластов после дополнительного центрифугирования. Клетки обрабатывали 100 мкМ ДХБ в течение 24 ч, а затем центрифугировали 5 мин при 10000 g за 2,5 ч до проведения подсчета. Непосредственно перед подсчетом клетки вновь центрифугировали с целью их обездвиживания. Однако выход сферопластов в подготовленных таким образом культурах оставался на уровне контроля (t-тест, $p > 0,2$) (рисунок 3.26, б).

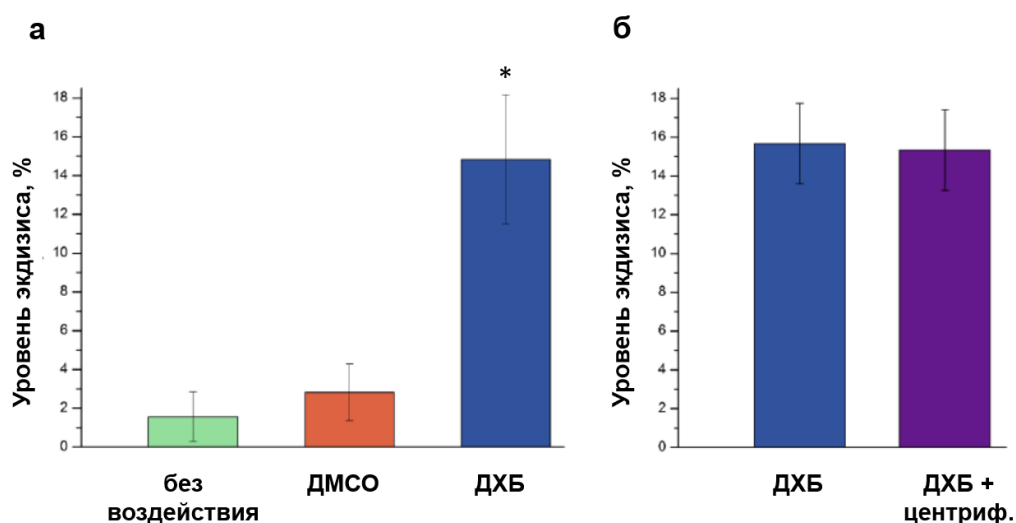


Рисунок 3.26. Уровень экдизиса в культуре *P. minimum* в зависимости от вида воздействия. Показаны стандартные отклонения. Звездочкой показаны типы

воздействия, при которых уровень экдизиса статистически значимо отличался от уровня экдизиса в контроле («без воздействия») ($p < 0,05$). Из: Pozdnyakov et al., 2014, с изменениями.

3.4.4 Сравнение экдизировавших клеток и ДХБ-индуцированных сферопластов

В отличие от ДХБ-индуцированных сферопластов, только что экдизировавшие клетки не способны образовывать плотный контакт со стеклянной микропипеткой. Для того чтобы объяснить эти различия, было проведено сравнение содержания целлюлозы в обоих типах клеток с помощью окраски CFW. Анализ полученных изображений показал, что содержание целлюлозы в экдизировавших клетках и сферопластах не отличается и находится на одинаково низком уровне (рисунок 3.27). Таким образом, разница между сферопластами и экдизировавшими клетками является следствием еще не известных дополнительных эффектов ДХБ. Возможно, ДХБ не только ингибирует синтез целлюлозы, но и влияет на организацию ее фибрилл. В результате при одинаковом содержании целлюлозы ДХБ-индуцированные сферопласты принимают сферическую форму, в то время как экдизировавшие клетки, не подвергнутые действию ДХБ, сохраняют нативную форму и ригидность.

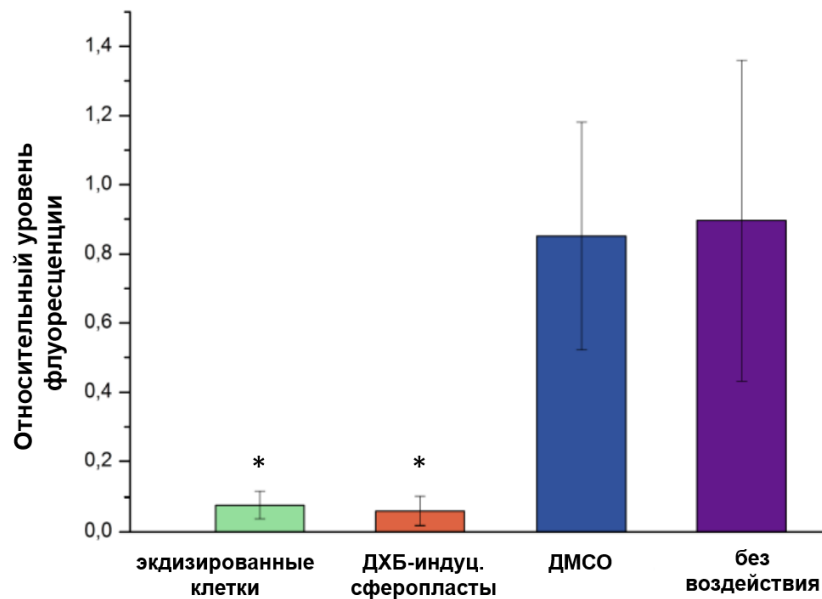


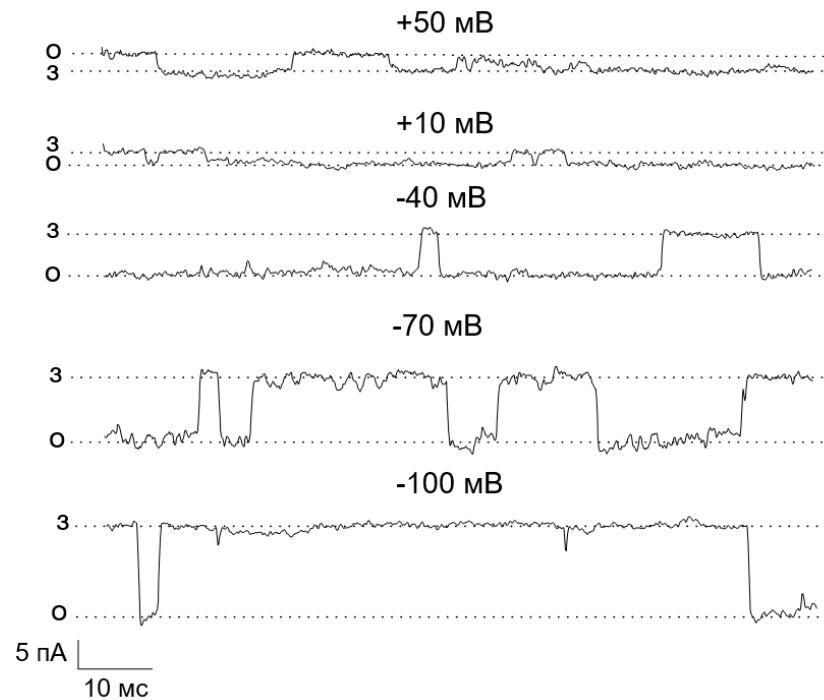
Рисунок 3.27. Относительная флуоресценция клеток *P. minimum*, подвергшихся различным воздействиям. Показаны стандартные отклонения. Звездочкой показаны типы воздействия, при которых относительный уровень флуоресценции статистически значимо отличался от уровня флуоресценции в контроле («без воздействия») ($p < 0,05$). Из: Pozdnyakov et al., 2014, с изменениями.

3.4.5 Регистрация активности ионных каналов плазматической мембраны ДХБ-индуцированных сферопластов *P. minimum*

Исходной конфигурацией для всех вариантов метода локальной фиксации потенциала на мембране является конфигурация «cell-attached» («клетка прикреплена»). Эта конфигурация предполагает образование плотного контакта между клеточной мембраной и стеклянной микропипеткой и позволяет регистрировать трансмембранные токи неповрежденной клетки на уровне одиночных каналов.

На рисунке 3.28 представлены результаты регистрации активности ионного канала плазматической мембраны сферопласта *P. minimum*, полученные в конфигурации «cell-attached» с использованием ступенчатого протокола и растворов «240 NaCl»_п (в пипетке) и «240 KCl»_к (в камере). Рассчитанная

величина проводимости зарегистрированного канала составила 117 пСм. Потенциал реверсии (E_{rev}) такого канала находится в области положительных значений потенциала (+25 мВ).



б

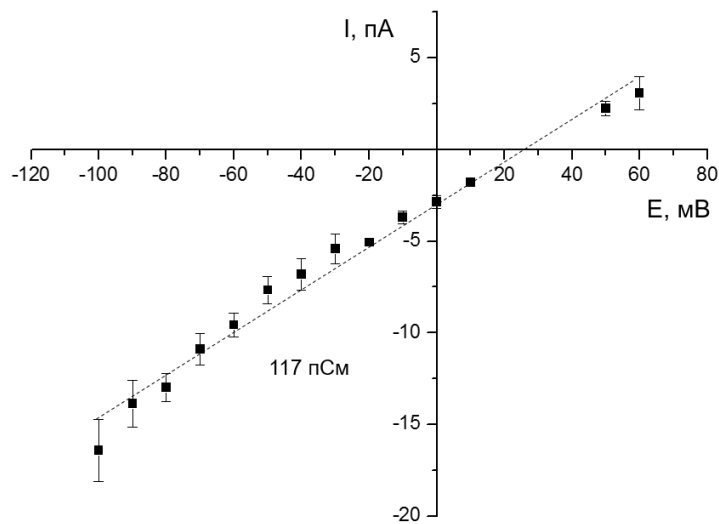


Рисунок 3.28. Фрагмент записи (а) и вольт-амперная характеристика (б) ионного канала *P. minimum*, полученная в конфигурации «cell-attached» с использованием ступенчатого протокола и растворов «240 NaCl»_п (в микропипетке) и «240 KCl»_к (в камере). о – уровень, соответствующий

открытому состоянию канала, 3 – уровень, соответствующий закрытому состоянию канала (здесь и на рисунках 3.29–3.31).

Важно отметить, что для интерпретации данных, полученных в конфигурации «cell-attached», необходима информация о: 1) величине потенциала покоя клетки и формирующих его АТФазах и 2) ионном составе цитозоля клетки. Поскольку на настоящий момент в литературе отсутствует данная информация в отношении динофлагеллят, интерпретация данных, полученных в конфигурации «cell-attached», затруднена. Таким образом, реальная величина E_{rev} для зарегистрированного канала (рисунок 3.28) неизвестна.

Для того чтобы решить эту проблему, контролируя ионный состав растворов по обе стороны мембраны, нами была применена конфигурация регистрации ионных токов на изолированном участке мембраны – «inside-out» («внутренняя сторона мембраны обращена в наружный раствор»). Для удобства в большинстве экспериментов нами были выбраны симметричные ионные условия, позволяющие предсказывать потенциал реверсии (0 пА ток ожидается при потенциале 0 мВ) и определять направление трансмембранного тока. Кроме того, с целью минимизировать активность анионных каналов вместо растворов на основе хлорида калия нами были использованы растворы, приготовленные на основе аспартата калия, так как мы исходили из допущения, что анионные каналы непроницаемы для аспартата.

Было показано, что конфигурация «inside-out» может быть эффективно применена при регистрации активности одиночных ионных каналов в изолированном фрагменте плазматической мембраны ДХБ-индуцированных сферопластов *P. minimum* (Pozdnyakov, Skarlato, 2015; Pozdnyakov et al., 2016). Всего было предпринято 411 попыток регистрации трансмембранных ионных токов в данной конфигурации. Из них к успешному образованию плотного контакта с сопротивлением 1 гОм и более между плазматической мембраной сферопласта и стеклянной микропипеткой привели 29 попыток (7,1 % от общего числа попыток). В 20 из 29 случаев успешного образования плотного контакта

были получены записи, что составляет 5 % от общего числа попыток получить плотный контакт. Активность ионных каналов была зарегистрирована в 16 из этих 20 записей.

Примечательно, что уже по этим записям можно судить о некотором разнообразии активности ионных каналов в мембранах сферопластов, проявляющемся в виде величины проводимости канала, характера вольт-амперной кривой и продолжительности пребывания канала в открытом состоянии. Далее мы приводим четыре примера записей, полученных в ходе регистрации активности ионных каналов плазматической мембраны сферопластов *P. minimum* в конфигурации «inside-out».

На рисунке 3.29 представлены фрагменты записи активности канала и его вольт-амперная характеристика при различных значениях мембранного потенциала (протокол постоянной записи). Характерной особенностью данного канала является выпрямляющий характер вольт-амперной кривой. Так как регистрация тока производилась в симметричных растворах («240 KAsp»_к в камере и «240 KAsp»_п в микропипетке), в данном случае зарегистрированный канал не может быть охарактеризован с точки зрения его селективности. Таким образом, его можно охарактеризовать только как катион-проницаемый (калий-проницаемый) канал. Проводимость зарегистрированного канала, рассчитанная для участка -60—+10 мВ, составила 134 пСм.

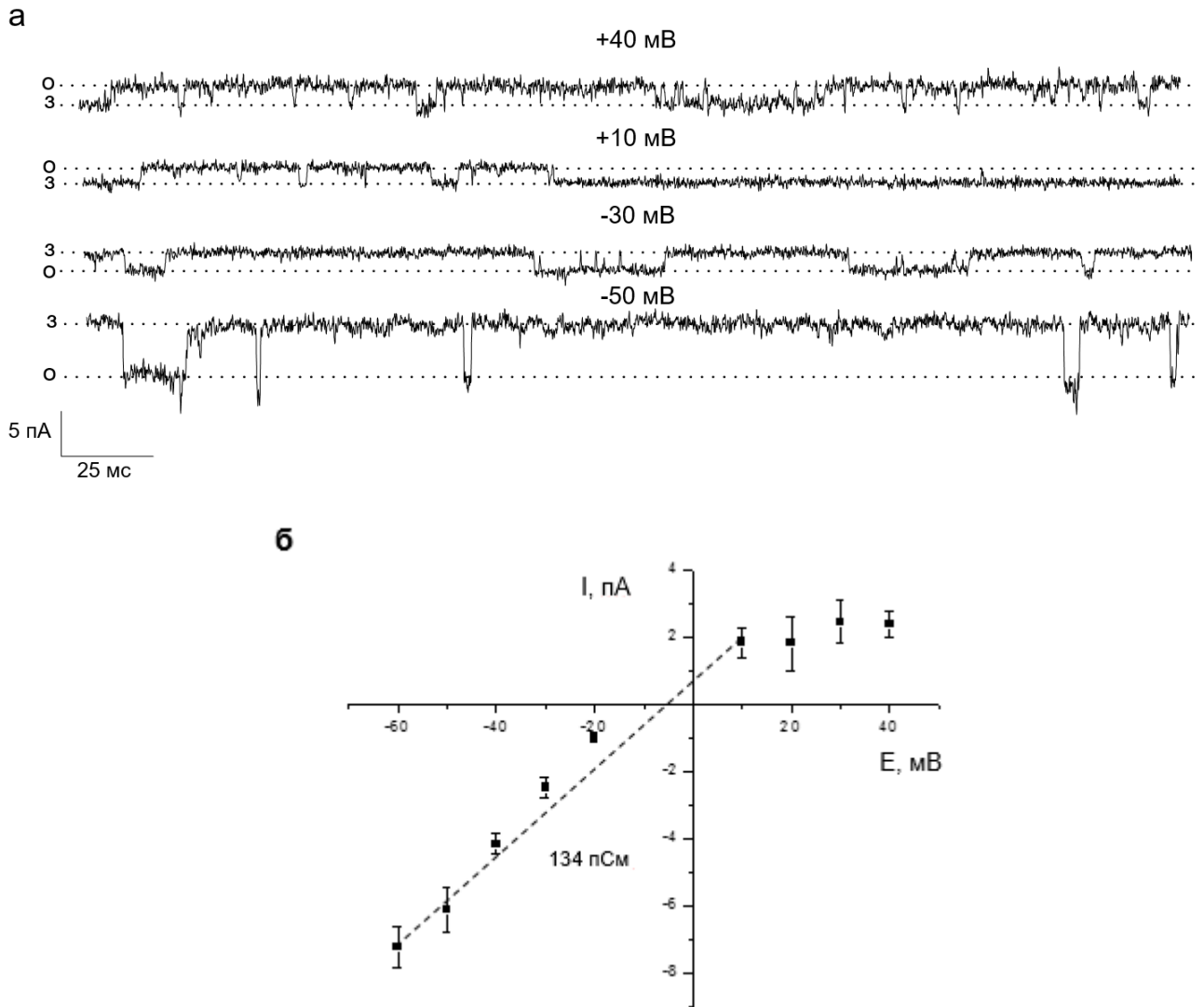


Рисунок 3.29. Фрагмент записи (а) и вольт-амперная характеристика (б) катионного канала *P. minimum*, полученная в конфигурации «inside-out» с использованием протокола постоянной записи и растворов «240 KAsp»_к (в камере) и «240 KAsp»_п (в микропипетке).

На рисунке 3.30 представлены фрагменты записи активности и вольт-амперные характеристики канала, зарегистрированного в симметричных растворах «240 KAsp» («240 KAsp»_к в камере и «240 KAsp»_п в микропипетке) при различных значениях мембранного потенциала (протокол постоянной записи). На данном примере хорошо различимы два типа каналов (А и В). Для канала типа А характерна пачечная активность и относительно высокая проводимость (212 пСм, $n=2$), в то время как для канала типа В характерны более низкая проводимость (60 пСм) и отсутствие пачечной активности. Вольт-амперные характеристики

обоих типов каналов имеют вид прямой и ожидаемо пересекают ось абсцисс около 0 мВ. Таким образом, оба типа каналов также могут быть охарактеризованы как катион-проводящие каналы с неопределенной селективностью.

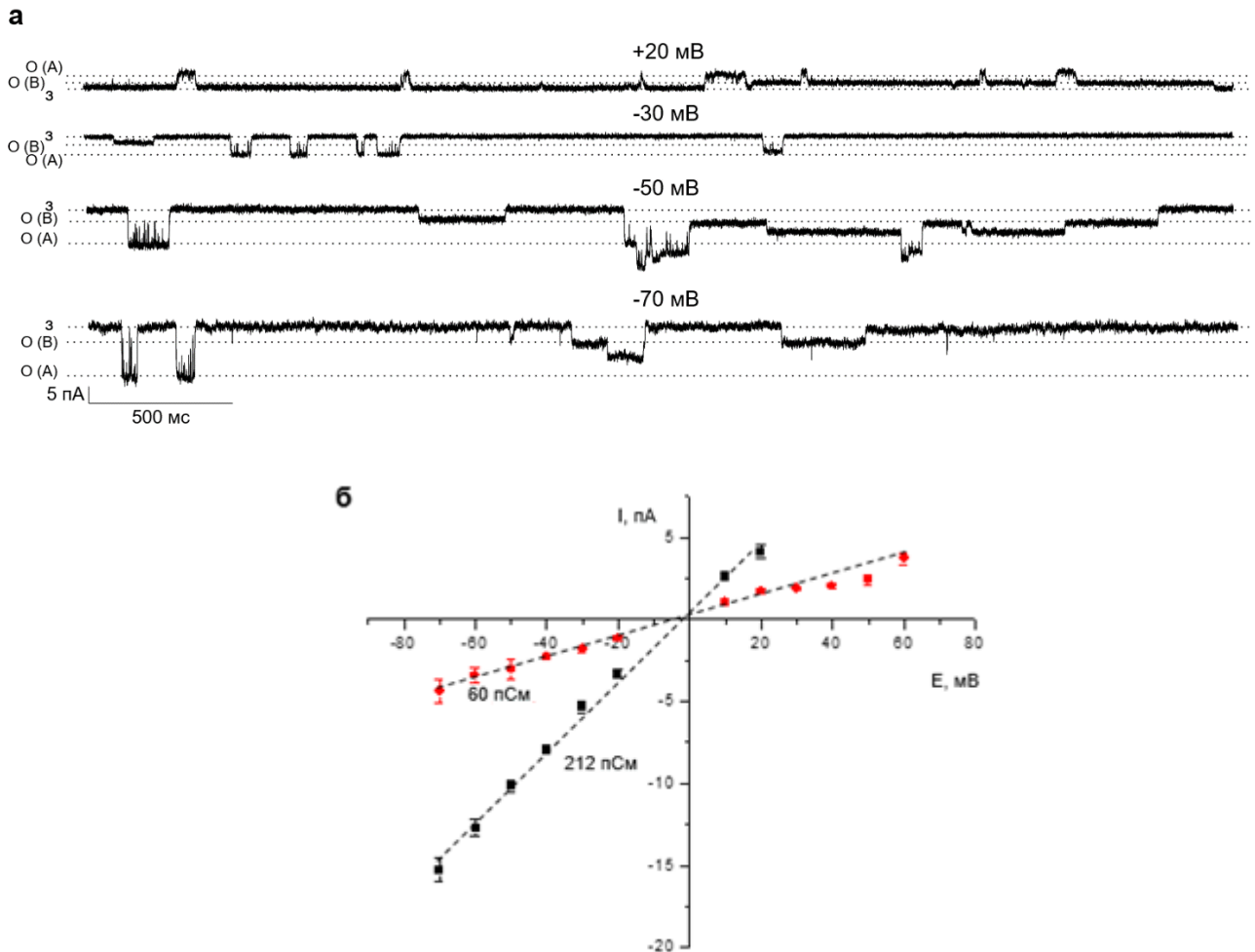
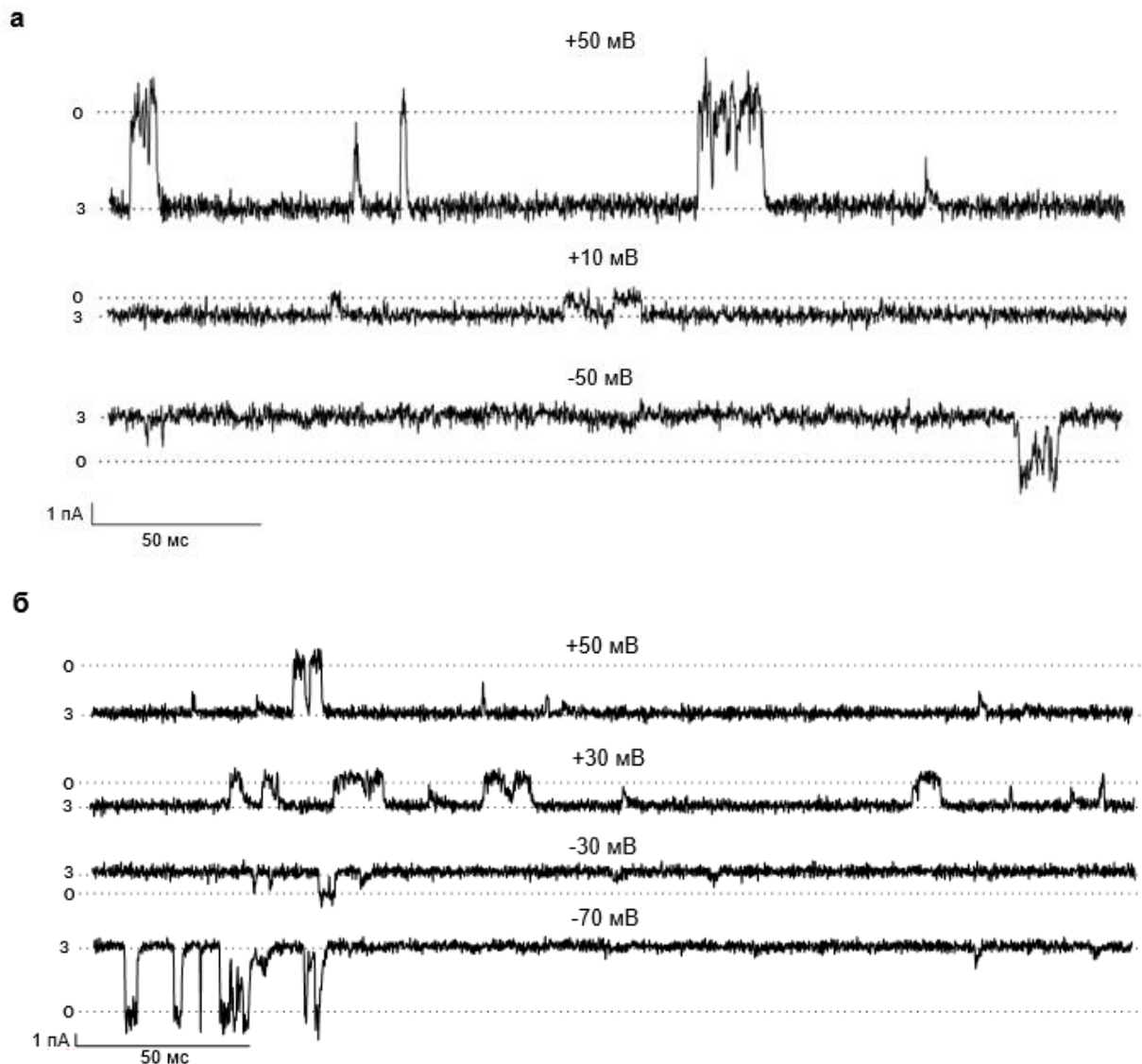


Рисунок 3.30. Фрагмент записи (а) и вольт-амперная характеристика (б) катионных каналов *P. minimum*, полученная в конфигурации «inside-out» с использованием протокола постоянной записи и растворов «240 KAsp»_к (в камере) и «240 KAsp»_п (в микропипетке). Квадраты – значения амплитуды тока для канала типа А. Круги – значения амплитуды тока для канала типа В.

В одном из экспериментов удалось произвести регистрацию трансмембранного тока с последовательной заменой растворов камеры, омывающих внутреннюю сторону мембранного фрагмента: 1) «240KAsp»_к, начальные симметричные условия, 2) «120K/120NaAsp»_к, 3) «60K/180NaAsp»_к

(рисунок 3.31). Таким образом, раствор, омывающий внутреннюю сторону фрагмента мембраны, всегда содержал одинаковую концентрацию катионов, но различную концентрацию ионов калия. Раствор же стеклянной микропипетки оставался неизменным («240KAsp»_п). Если бы ток был опосредован активностью калий-селективных каналов, то изменения концентрации ионов калия в наружном растворе отразились бы на форме вольт-амперной характеристики. Однако этого не происходило: при использовании всех трех вариантов наружного раствора E_{rev} был близок к 0 мВ. Проводимость канала также практически не менялась: 64 пСм («240KAsp»_к), 76 пСм («120K/120NaAsp»_к) и 74 («60K/180NaAsp»_к). Отсутствие изменений в вольт-амперной характеристике говорит о том, что зарегистрированный канал является катион-проводящим неселективным каналом.



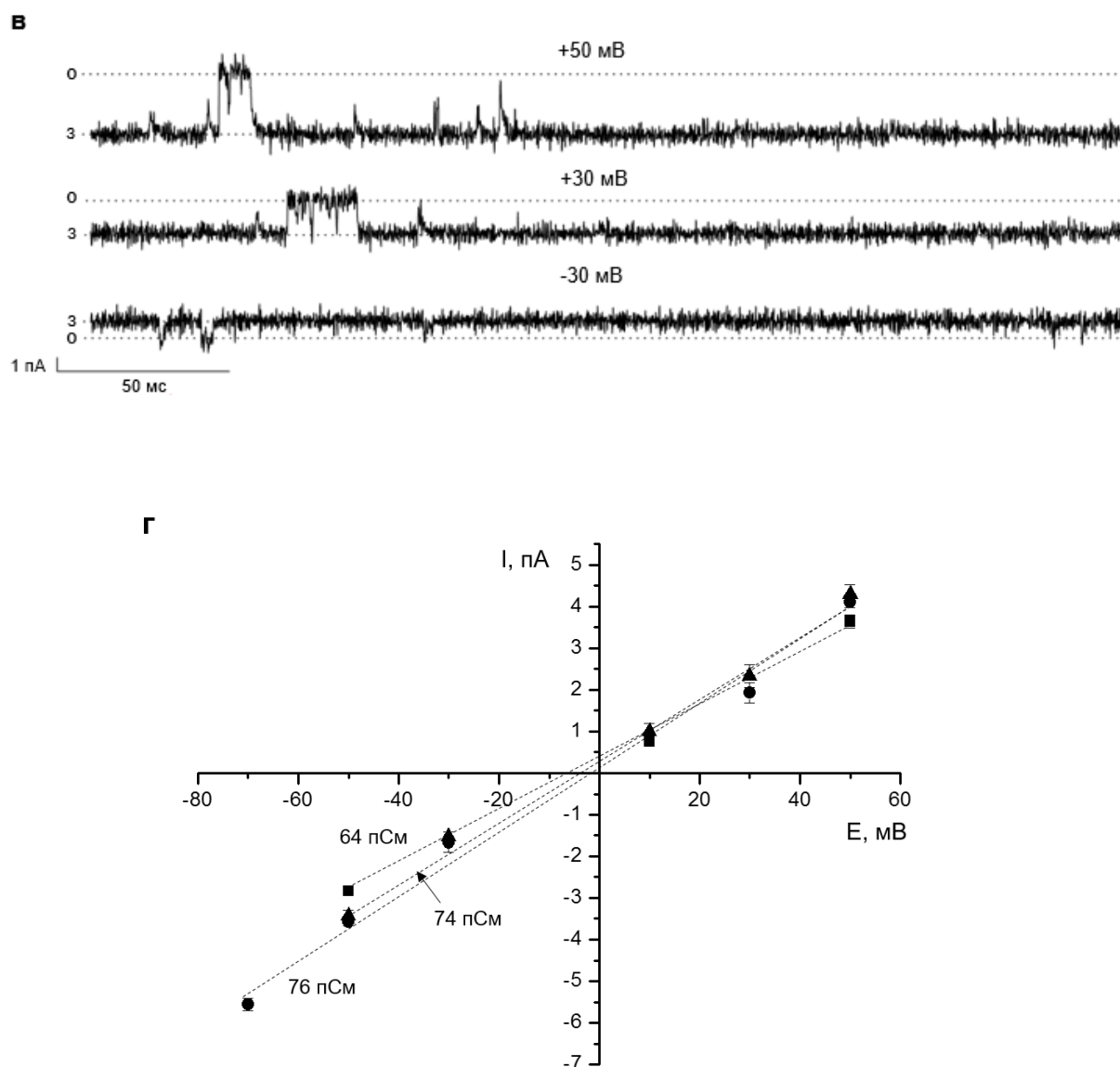


Рисунок 3.31 Фрагменты записи (а–в) и вольт-амперные характеристики (г) катионных каналов *P. minimum*, полученные в конфигурации inside-out с использованием протокола постоянной записи. Раствор в микропипетке: «240KAsp»_п. Растворы в камере: «240KAsp»_к (а), «120K/120NaAsp»_к (б), «60K/180NaAsp»_к (в). На вольт-амперной характеристике: квадраты – значения амплитуды тока, соответствующие записи (а), круги – значения амплитуды тока, соответствующие записи (б), треугольники – значения амплитуды тока, соответствующие записи (в).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Суперсемейство потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят

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 одними из самых больших геномов среди эукариот, размер которых часто значительно превышает размер генома человека (Hackett et al., 2004), к настоящему времени геномы представителей рода *Prorocentrum* и других свободноживущий динофлагеллят не были секвенированы. В связи с этим для поиска соответствующих генов у динофлагеллят исследователи обращаются к транскриптомным базам данных. Проведенный в настоящей работе анализ транскриптомов динофлагеллят выявил наличие большинства семейств ионных каналов, объединяемых в суперсемейство потенциал-управляемых катионных каналов (таблица 3.1).

Несмотря на то что найденные 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. Также важно отметить, что значение статистического показателя E-value, характеризующего вероятность того, что найденные сходства случайны, во всех случаях меньше 10^{-10} , что является достаточным основанием для того, чтобы считать обнаруженные нами последовательности членами соответствующих семейств ионных каналов (Pearson, 2013).

В настоящее время в литературе имеются лишь отрывочные сведения об ионных каналах динофлагеллят, полученные в результате электрофизиологических исследований. В нескольких работах было показано наличие потенциал-управляемых токов ионов Na^+ , H^+ и Cl^- у ночесветки *Noctiluca*

miliaris (Eckert, Sibaoka, 1968; Oami et al., 1990; Oami et al., 1995a; Oami et al., 1995b), а также каналов H_v у *Karlodinium veneficum* (Smith et al., 2011). В свою очередь, анализ 11 транскриптомов десяти видов динофлагеллят, проведенный в настоящей работе, выявил представителей по крайней мере десяти семейств ионных каналов, среди которых: 1) потенциал-управляемые калиевые каналы (K_v), 2) калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}), 3) двухпоровые калиевые каналы (K_{2p}) 3) кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}), 5) калиевые каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (EAG), 6) катионные каналы активируемые циклическими нуклеотидами (HCN/CNG), 7) каналы TRP (TRPV и TRPP), 8) двухпоровые кальциевые каналы (TPC), 9) потенциал-управляемые протонные каналы (H_v) и 10) четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКК).

4.1.1 Калиевые каналы K_{ir} , K_v , K_{Ca} и K_{2p}

Калиевые каналы K_{ir} , K_v , K_{Ca} и K_{2p} являются компонентами системы регуляции мембранного потенциала клетки (Hille, 2001; Зефилов, Ситдикова, 2010). Присутствие всех этих типов калиевых каналов в транскриптомах динофлагеллят позволяет предполагать наличие подобной системы контроля над мембранным потенциалом и у динофлагеллят. Следует отметить, что отсутствие в рассмотренных транскриптомах последовательностей каких-либо семейств ПКК само по себе не является свидетельством отсутствия соответствующих последовательностей в геномах конкретных видов динофлагеллят. Кроме того, гомологи, отсутствующие в транскриптоме одного вида динофлагеллят, могут быть идентифицированы в транскриптомах других видов. Так, последовательности, гомологичные K_{2p} , которые не были идентифицированы нами у *P. minimum*, были обнаружены при анализе транскриптомов девяти других видов динофлагеллят (Приложение, таблица 2).

4.1.2 Каналы TRP, EAG и HCN/CNG

В настоящей работе показано, что у многих рассмотренных видов динофлагеллят экспрессируются гены каналов TRP, EAG и HCN/CNG. Кроме того, TRP-каналы представлены по крайней мере двумя подсемействами, а именно 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 протистов. Например, в геноме инфузории *Paramecium tetraurelia*, обладающей комплексными поведенческими реакциями (ускорение в направлении движения клетки, реакция избегания опасности), большинство идентифицированных генов катионных каналов кодирует различные каналы, управляемые циклическими нуклеотидами (Martinac et al., 2008). В то же время представитель зеленых 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-Darraz et al., 2015). У динофлагеллят описаны разнообразные поведенческие реакции: гео-, хемо- и фототаксисы, суточная миграция в водном столбе, стресс-индуцированный 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.

4.1.3 Удвоенные последовательности K_v и HCN/CNG

Наличие в транскриптомах динофлагеллят удвоенных последовательностей каналов K_v и HCN/CNG, которые ранее не были описаны в литературе, может объясняться либо ошибкой сборки транскриптомов, либо реально произошедшей дупликацией исходных генов. Первый вариант наименее вероятен, так как такие удвоенные последовательности были обнаружены нами в девяти (K_v) и пяти (HCN/CNG) независимо собранных транскриптомах различных видов динофлагеллят. Кроме того, удвоенные последовательности HCN/CNG были обнаружены нами у оомицет.

Из литературных данных известно, что многие гены динофлагеллят имеют от нескольких штук до нескольких тысяч копий генов, организованных в кластеры (Bachvaroff, Place, 2008; Wisecaver, Hackett, 2011). Копии в таких кластерах характеризуются высокой степенью консервативности (Reichman et al., 2003; Beauchemin et al., 2012). Несмотря на то что на сегодняшний день данные о подобной многокопийности генов ионных каналов у динофлагеллят отсутствуют, данное свойство организации генома могло бы объяснить наличие удвоенных последовательностей в транскриптомах этих организмов. По одной из гипотез транскрипция генных кластеров динофлагеллят происходит с образованием полицистронной пре-мРНК, которая затем в результате 5'-транс-сплайсинга расщепляется на зрелые моноцистронные мРНК, подобно тому как это происходит у трипаносом (Wisecaver, Hackett, 2011). Однако в работе с транскриптомом динофлагеллят *Lingulodinium poliedrum* было косвенно показано, что транскрипция у данного вида проходит без образования полицистронных интермедиатов (Beauchemin et al., 2012). Следует отметить, что проведенный нами поиск гомологов удвоенных последовательностей каналов в транскриптоме именно этого вида динофлагеллят не дал положительных результатов. В случае, если механизмы транскрипции *L. poliedrum* видоспецифичны, нельзя полностью

исключать, что удвоенные последовательности других динофлагеллят представляют собой полицистронные транскрипты.

Свидетельством в пользу того, что обнаруженные в настоящей работе удвоенные последовательности каналов не являются производными кластеров тандемных повторов, может быть низкая идентичность двух предполагаемых доменов удвоенных последовательностей как каналов K_v , так и каналов HCN/CNG, что нехарактерно для копий генов, организованных в кластеры. Если консервативность является облигатной чертой кластеров генов динофлагеллят, то высокая вариабильность, обнаруженная нами, может указывать на то, что удвоенные последовательности K_v и HCN/CNG – это результат произошедшей дупликации исходных генов, при которой образовались гены, кодирующие двухдоменные каналы. Считается, что подобные процессы лежали в основе эволюции семейств каналов TPC, K_{2P} и ЧД ПКК (Jegla et al., 2009). Таким образом, наличие удвоенных последовательностей каналов K_v и HCN/CNG может свидетельствовать и о существовании двухдоменных порообразующих субъединиц этих каналов. Важно подчеркнуть, что на данном этапе исследований невозможно определить, какая из гипотез (образование полицистронных РНК с последующим процессингом или реальное существование двухдоменных каналов в семействах K_v и HCN/CNG) является верной.

4.1.4 Каналы TPC

Ряд представителей семейства каналов TPC экспериментально описан у животных и растений. Кроме того, их гомологи обнаружены в геномах некоторых протистов. Считается, что это семейство каналов появилось в результате дупликации гена, кодировавшего канал с одним доменом [S1–S6]. Полученные в настоящей работе данные о TPC-каналах в транскриптах различных видов динофлагеллят согласуются с предположением о том, что дупликация исходного гена произошла на самых ранних этапах эволюции эукариот (Cai, 2012), поскольку многоклеточные животные, растения и динофлагелляты имеют общего

предка лишь в самом основании современного глобального древа эукариот (Adl et al., 2012). Функции представителей семейства TRP еще мало изучены. Известно, что эти каналы являются кальциевыми каналами мембран внутриклеточных вакуолей клеток животных и растений. Предположительно именно каналы TRP ответственны за NAAD-зависимое опустошение внутриклеточных депо кальция в клетках животных. Кроме того, считается, что некоторые представители этого семейства, для которого не характерна способность активироваться при изменениях мембранного потенциала, независимо восстановили эту способность и являются резидентами плазматической мембраны клеток высших растений. Такие каналы рассматриваются как вероятные посредники потенциал-управляемого тока в растительной клетке.

4.1.5 Каналы H_v

Предположение о наличии у динофлагеллят каналов H_v впервые было сделано при изучении биоэлектрического контроля люминесценции ночесветки *N. miliaris* (Eckert, Sibaoka, 1968). Авторы предположили, что люминесценция инициируется потенциал-зависимым 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 и гаптофитовых водорослей (Eckert, Sibaoka, 1968; Taylor et al., 2011).

4.2 Четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКК) динофлагеллят

4.2.1 Филогенетическое разнообразие ЧД ПКК

Наличие гомологов ЧД ПКК у филогенетически отдаленных друг от друга групп эукариот говорит о возникновении этого семейства ПКК на самых ранних этапах эволюции Eukaryota. Полученные в настоящей работе данные не только свидетельствуют о присутствии ЧД ПКК у динофлагеллят, но и подтверждают наличие их гомологов у представителей других групп протистов: Chlorophyta, Oomycota, Bacillariophyta, Ciliata, Phaeophyta и Haptophyta.

Характерной чертой деревьев ЧД ПКК, полученных в ходе проведения филогенетического анализа, является соответствие многих клад современным данным о филогении соответствующих групп организмов. Так, получено множество кластеров, состоящих из последовательностей ЧД ПКК исключительно Chlorophyta, Oomycota, Ciliata, Haptophyta и др. Более того, такие кластеры как A, B, и D включают последовательности динофлагеллят и других представителей Alveolata (кластеры A и B) или родственной им группы Stramenopiles (кластер D). Также в общие кластеры попали некоторые последовательности ЧД ПКК нескольких линий Stramenopiles, например, Oomycota и Raphidophyta, Bacillariophyta и Raphidophyta. Соответствие между филогенией ЧД ПКК, реконструированной в настоящей работе, и филогенией эукариот, реконструированной другими авторами на основании консервативных генов, свидетельствует об адекватности полученных нами результатов. Полученные в настоящей работе филогенетические деревья ЧД ПКК демонстрируют неопределенность в порядке ветвления между отдельными кластерами каналов. Данное обстоятельство объясняется тем, что даже филогенетические отношения между большинством групп эукариот, строящиеся на основании сравнения последовательностей ряда наиболее консервативных

генов и белков, в настоящее время остаются не разрешенными (Adl et al., 2012). Аминокислотные последовательности ионных каналов и, в частности, каналов семейства ЧД ПКК демонстрируют сильную вариабельность, что еще больше затрудняет получение хорошо разрешенных деревьев. Еще одной причиной неполного разрешения филограмм является ограниченное число доступных последовательностей ЧД ПКК различных групп эукариот, не относящихся к опистоконтам.

В связи с вышесказанным следует отметить присутствие на филограммах устойчивого кластера, объединяющего последовательности подсемейства LVA Ca_v Metazoa и некоторые последовательности четырехдоменных каналов криптомонады *Guillardia theta*. По современным представлениям эти группы эукариот рассматриваются как две отдаленные филетические линии с неизвестным порядком отхождения от единого ствола. В то же время другие последовательности ЧД ПКК этого вида криптофитовых водорослей группируются еще в 4 отдельных кластера, не связанных ни с одним другим подсемейством ЧД ПКК многоклеточных животных. Возможным объяснением полученному результату может быть горизонтальный перенос одного из генов ЧД ПКК, произошедший на уровне одноклеточных предков Metazoa и Cryptophyta.

В свете настоящей работы важно отметить, что 24 использованные в анализе аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят группируются в четыре независимых кластера (А, В, С и D). Несмотря на то что по результатам использования различных методов анализа филогении состав некоторых из них (С и D) изменчив в отношении последовательностей других протистов, в них всегда входит один и тот же набор ЧД ПКК динофлагеллят. Таким образом, в случае динофлагеллят существование данных кластеров подтверждено с помощью различных методов с высокой степенью статистической значимости, и можно заключить, что они обладают по крайней мере четырьмя обособленными группами четырехдоменных каналов. Подобное явление наблюдается и в отношении ЧД ПКК большинства других линий

эукариот, чьи последовательности ЧД ПКК использовались в филогенетическом анализе.

Хорошо известно, что ЧД ПКК опистоконт формируют пять подсемейств: Na_v , $HVA Ca_v$, $LVA Ca_v$, $NALCN$ и Sch , причем представители первых четырех экспрессируются у многоклеточных животных (Liebeskind et al., 2012). Каналы этих подсемейств значительно различаются между собой как по аминокислотной последовательности (идентичность <35 %), так и функционально. Полученные в настоящей работе данные о филогенетическом разнообразии ЧД ПКК как динофлагеллят, так и других эукариот, не относящихся к опистоконтам, свидетельствуют о присутствии у этих организмов нескольких групп ЧД ПКК, структурно и, вероятно, функционально отличных друг от друга, подобно ЧД ПКК Opisthokonta. Наиболее ярко филогенетическое разнообразие ЧД ПКК динофлагеллят может быть проиллюстрировано на примере видов *Scrippsiella trochoidea* и *Karenia brevis*. Последовательности ЧД ПКК первого из этих видов находятся в кластерах А (А1 и А2) и С, а второго – в кластерах А (А1), В и С. В случае *P. minimum*, все обнаруженные в данной работе последовательности четырехдоменных каналов находятся в одном кластере А (А1), но и среди них могут быть выделены две линии паралогов (Pm47759 и Pm2595-Pm20998-Pm40145), разделение которых, вероятно, произошло еще до появления вида *P. minimum*. Таким образом, динофлагелляты даже в пределах одного вида могут обладать филогенетически отличающимися группами ЧД ПКК.

4.2.2 Структурно-функциональное разнообразие ЧД ПКК

Филогенетическое разнообразие ЧД ПКК динофлагеллят может быть свидетельством их функционального разнообразия, как и в случае ЧД ПКК животных. Для того чтобы дать предварительную функциональную характеристику четырехдоменных каналов динофлагеллят, в настоящей работе были использованы биоинформатические подходы, которые являются эффективным средством на первых этапах исследования новых ионных каналов и

несут ценную информацию, которая может быть использована при дальнейшем планировании экспериментальной работы. Так, в настоящей работе методами биоинформатики были определены и проанализированы последовательности функционально значимых участков ЧД ПКК: селективных фильтров, сегментов S4 и областей инактивационных ворот.

4.2.2.1 Селективный фильтр

Анализ первичной структуры 24 аминокислотных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят выявил, что 23 из них, включая все исследованные последовательности ЧД ПКК модельного объекта *P. minimum*, имеют селективный фильтр вида E/E/E/E и одна – селективный фильтр вида E/Q/E/E.

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). Считается, что ЧД ПКК с таким фильтром обладают селективностью в отношении ионов кальция различной степени выраженности (Verret et al., 2010). Так, каналы из подсемейства HVA Ca_v обладают строгой селективностью к 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). В то же время, было 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 (Berzilai et al., 2012). По-видимому, наличие отрицательно заряженного остатка глутамата (E) в положениях II и III может быть необходимым условием кальциевой селективности. Так, на примере Na_v2 книдарии *Nematostella vectensis* было показано, что замена одного из глутаматов (E) на остаток положительно заряженного лизина (K) приводила к появлению селективности в отношении ионов натрия (Berzilai et al., 2012). Кроме того, известно, что каналы Na_v1, имеющие селективный фильтр D/E/K/A, и каналы

подсемейства NALCN с селективным фильтром E/K/E/E или E/E/K/E являются натрий-селективными каналами. Каналы подсемейства NALCN с селективным фильтром E/K/E/E или E/E/K/E также функционируют в нервной системе животных как натриевые каналы (Liebeskind et al., 2013; Senatore et al., 2013). Каналы же подсемейства Csch, которые функционируют в клетках грибов как депо-управляемые 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). 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.

В настоящее время наиболее обоснованной гипотезой относительно эволюции селективности ЧД ПКК является гипотеза, согласно которой предковые ЧД ПКК имели селективный фильтр вида E/E/E/E и являлись кальциевыми каналами. Подтверждением этой гипотезы является тот факт, что большинство охарактеризованных представителей ЧД ПКК являются кальциевыми каналами (Hille, 2001; Liebeskind et al., 2013). Что касается натриевой селективности, существуют надежные доказательства того, что она несколько раз появлялась независимо в некоторых подгруппах подсемейств Na_v и NALCN (Barzilai et al., 2012; Senatore et al., 2013).

Примечательно, что однодоменные потенциал-управляемые натриевые каналы бактерий NaChBac имеют пору с селективным фильтром E/E/E/E, сформированным остатками глутамата от каждой из четырех однодоменных субъединиц, и при этом являются натрий-селективными каналами (Martinac et al., 2008). Долгое время это обстоятельство рассматривалось как противоречие данным относительно каналов ЧД ПКК у эукариот, несмотря на то что сама структура канала NaChBac считалась моделью для понимания структуры каналов Na_v . Однако 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 (Liebeskind et al., 2013). Видимо, селективность бактериальных натриевых каналов определяется не

только присутствием остатков глутамата, но и аминокислотным составом его окружения. Типичное окружение остатка глутамата у NaChBac имеет вид LESWAS, где E – один из остатков глутамата, формирующих кольцо селективного фильтра канала. В работе Ю с соавторами (Yue et al., 2002) с помощью мутационного анализа было показано, что замены одного из аминокислотных остатков этого мотива на остаток или остатки аспартата (D) приводят к увеличению селективности к кальцию. Так, кальциевая селективность возрастает в ряду LESWAD-LEDWAS-LEDWAD-LDDWAD. Таким образом, натриевая селективность у каналов NaChBac имеет иную природу, чем у каналов ЧД ПКК.

Основываясь на данных о взаимосвязи структуры селективного фильтра и селективности ионных каналов у различных организмов, можно сделать вывод, что исследованные в настоящей работе 24 последовательности ЧД ПКК динофлагеллят, вероятнее всего, кодируют кальциевые каналы. По аналогии с четырехдоменными каналами многоклеточных животных и грибов эти каналы могут обладать как строгой селективностью к ионам кальция, подобно каналам HVA Ca_v, так и очень слабой, подобно каналам NALCN.

4.2.2.2 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 деполяризации 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. Как было сказано ранее, в настоящее время считается, что отсутствие чувствительности к изменениям мембранного потенциала у каналов подсемейств NALCN и Csch связано с обеднением 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).

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что среди 24 проанализированных аминокислотных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят присутствуют последовательности как с лизин/аргинин-богатыми сегментами S4, так и с лизин/аргинин-обедненными S4 в одном или двух доменах. Среди последовательностей ЧД ПКК модельного объекта *P. minimum* выявлены представители обеих групп. Это свидетельствует о том, что каналы семейства ЧД ПКК динофлагеллят могут быть как потенциал-управляемыми, подобно каналам подсемейств HVA Ca_v, LVA Ca_v и Na_v, так и потенциал-неуправляемыми, подобно каналам подсемейств NALCN и Csch.

Следует отметить, что по итогам проведенного нами филогенетического анализа в одной кладе (кластер А) оказались как последовательности с лизин/аргинин-богатыми сегментами S4, так и последовательности с лизин/аргинин-обедненными S4. Более того, последовательности обеих групп присутствуют в двух линиях паралогов ЧД ПКК этого кластера – A1 и A2, следовательно, потеря способности к активации канала при сдвигах мембранного потенциала могла произойти независимо дважды в эволюции ЧД ПКК динофлагеллят. Схожие результаты были получены Либескиндом с соавторами (Liebeskind et al., 2012), которые показали, что одна из последовательностей апусомонад *Thecamonas trahens*, у которой все четыре сегмента S4 богаты остатками лизина и аргинина, образует общий кластер с потенциал-неуправляемыми каналами NALCN и Csch. В настоящей работе кластер, описанный в статье Либескинда и соавторов, был получен при реконструкции филогении ЧД ПКК эукариот с помощью байесовского анализа (рисунок 3.14; Приложение, рисунок 4).

4.2.2.3 Первичная и вторичная структура области инактивационных ворот

Наличие инактивационных ворот вида IFMT, отвечающих за быструю инактивацию, характерно для каналов Na_v . Долгое время считалось, что быстрая инактивация по типу «шарик на цепочке» характерна только для этих каналов. 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), AAMT (Haptophyta) (Liebeskind et al., 2012). Таким образом, консенсусный мотив инактивационных ворот может быть описан как XXXT/S, где X – незаряженная гидрофобная аминокислота. Считается, что именно гидрофобные взаимодействия, в которых участвует триплет XXX, играют важную роль в докинге инактивационных ворот при инактивации канала (Goldin, 2003).

Анализ последовательности инактивационных ворот ЧД ПКК динофлагеллят показал значительное разнообразие в структуре данной области канала. Многие последовательности ЧД ПКК динофлагеллят также имеют мотив инактивационных ворот вида XXXT/S. Среди последовательностей четырехдоменных каналов модельного объекта *P. minimum* к ним может быть отнесена последовательность Pm47759 с мотивом GMLT, где в первом положении находится остаток глицина, который не является гидрофобной аминокислотой. Тем не менее, глицин – это неполярная аминокислота, не имеющая бокового радикала, поэтому, вероятнее всего, он 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, и, следовательно, саму способность к быстрой

инактивации по типу «шарик на цепочке» соответствующих ЧД ПКК динофлагеллят. Так, структура гомологичного участка последовательности St17126 (*S. trochoidea*) имеет вид DLLD и несет заряженные аминокислотные остатки в первом и четвертом положениях. Подобный аминокислотный состав имеет гомологичная область каналов HVA Ca_v, неспособных к быстрой инактивации по типу «шарик на цепочке». Таким образом, анализ первичных структур мотивов, гомологичных участкам инактивационных ворот каналов Na_v, выявил существенное разнообразие в их структуре среди последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят.

Сопоставление полученных результатов с реконструированной нами филогенией ЧД ПКК динофлагеллят показало, что последовательности, имеющие наиболее дивергентные мотивы в участках, гомологичных участкам инактивационных ворот, - St17126 (DLLD) и Kb20579 (EMSS) – относятся к кластеру С. В то же время кластеры В и D, в которые входит лишь по одной последовательности ЧД ПКК динофлагеллят, содержат ЧД ПКК с каноническими мотивами XXXT/S. Самый крупный кластер А содержит оба типа последовательностей в обеих подгруппах парологов (таблица 3.2).

Считается, что в стабилизации инактивационных ворот каналов Na_v важную роль играют обрамляющие их альфа-спирали (Sirota et al., 2002). В настоящей работе с помощью биоинформатических методов показано, что большинство исследованных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят, включая последовательности *P. minimum*, имеют по крайней мере одну альфа-спираль в данном участке. При этом часть исследованных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят, в том числе одна последовательность *P. minimum* (Pm47759), имеет и мотив инактивационных ворот XXXT/S, и стабилизирующую альфа-спираль. Вероятно, именно для этих четырехдоменных каналов характерна быстрая инактивация по типу «шарик на цепочке». Кроме того, следует отметить две последовательности *P. minimum*, Pm2595 и Pm20998, с неканоническим мотивом, которые имеют дополнительную вставку в 82 а.о., образующую бета-

структуры, что, возможно, влияет на функциональные особенности данных каналов в отношении процесса инактивации (таблица 3.2).

Для процесса быстрой инактивации четырехдоменных каналов по типу «шарик на цепочке» важны как мотив XXXT/S, так и стабилизирующие его альфа-спирали, поэтому для поддержания данной функции необходимо их совместное присутствие в структуре белка. В связи с этим обращает на себя внимание тот факт, что у динофлагеллят консервативную альфа-спираль имеют как ЧД ПКК с каноническим мотивом инактивационных ворот XXXT/S, так и ЧД ПКК с неканоническими мотивами, вероятно, не способные к быстрой инактивации. Данный факт свидетельствует о том, что утрата способности к быстрой инактивации по типу «шарик на цепочке» ряда ЧД ПКК динофлагеллят может быть вторичной.

Обобщая данные о структуре участка, гомологичного участку инактивационных ворот, у ЧД ПКК динофлагеллят и других групп эукариот, можно выдвинуть предположение о том, что способность каналов семейства ЧД ПКК к быстрой инактивации по типу каналов Na_v («шарик на цепочке») могла появиться еще до обособления самого подсемейства Na_v .

Сравнение же этих данных с полученными нами данными о структуре трансмембранного сегмента S4 свидетельствуют о том, что как среди каналов с вероятной способностью к быстрой инактивации по типу «шарик на цепочке», так и среди каналов без нее присутствуют и потенциал-управляемые, и потенциал-неуправляемые каналы (таблица 3.2).

Результаты проведенного нами анализа структуры наиболее важных функциональных участков ЧД ПКК динофлагеллят свидетельствуют о том, что эти протисты обладают функционально разнообразными ЧД ПКК. Исследованные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят кодируют катионные (вероятно, кальциевые) потенциал-управляемые и потенциал-неуправляемые каналы, для которых в ряде случаев может быть характерна быстрая инактивация по типу «шарик на цепочке». Так, все рассмотренные четырехдоменные каналы *P. minimum* (Pm47759, Pm2595, Pm20998, Pm40145) имеют селективный фильтр вида

Е/Е/Е/Е, обуславливающий кальциевую селективность всех изученных ЧД ПКК. Последовательности Pm2595, Pm20998 и Pm40145 имеют лизин/аргинин-обогащенные сегменты S4, и, по-видимому, кодируют потенциал-управляемые каналы, в то время как последовательность Pm47759 кодирует потенциал-неуправляемый канал, чьи сегменты S4 в доменах I и II обеднены положительными зарядами. Из этих четырех последовательностей только последовательность Pm47759 имеет участок, потенциально способный выполнять роль инактивационных ворот (таблица 3.2).

4.2.3 Возможная функциональная роль ЧД ПКК динофлагеллят

Кальциевые и натриевые каналы семейства ЧД ПКК хорошо известны как каналы, ответственные за инициацию ПД у клеток многоклеточных животных и ряда протистов (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 пейсмейкерной и ритмической активности нейронов; помимо этого, каналы LVA Ca_v опосредуют вход Ca^{2+} при негативных значениях мембранного потенциала (Jegla et al., 2009). Представители еще одного подсемейства ЧД ПКК опистоконт – каналы SCh – являются депо-управляемыми кальциевыми каналами грибов, опосредующими вход Ca^{2+} , важнейшего вторичного посредника, 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 – SCh, 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 филогенетического и биоинформатического анализа показано, что динофлагелляты, как и многоклеточные животные, обладают значительным филогенетическим и структурно-функциональным разнообразием каналов семейства ЧД ПКК.

Известно, что потенциал-управляемые кальциевые каналы инфузорий и зеленых водорослей участвуют в генерации ПД, управляющего биением ресничек и жгутиков этих протистов (Martinac et al., 2008). Мы предполагаем, что четырехдоменные потенциал-управляемые кальциевые каналы также могут быть вовлечены в процессы регуляции подвижности клеток динофлагеллят, которые имеют два жгутика. У модельного объекта *P. minimum* такие каналы могут кодироваться последовательностями Pm2595, Pm20998 и Pm40145 (таблица 3.2).

У многоклеточных животных и ряда протистов потенциал-управляемый ток кальция и/или натрия обычно связан с активностью именно каналов семейства ЧД ПКК (Jegla et al., 2009). У динофлагеллят *Noctiluca miliaris* был описан кальций-зависимый потенциал-управляемый ток натрия, играющий важную роль в регуляции подвижности ловчего щупальца этих клеток (Oami et al., 1995). Однако среди 24 проанализированных последовательностей динофлагеллят мы не выявили ни одной последовательности с селективным фильтром, характерным для натрий-селективных каналов. Вероятно, потенциал-управляемый ток натрия у динофлагеллят обусловлен активностью иного типа ионных каналов. Известно, например, что клетки некоторых тканей высших растений имеют потенциал-управляемые кальциевые каналы. Однако высшие растения представляют собой группу эукариот, полностью лишенную каналов семейства ЧД ПКК, а роль потенциал-управляемых каналов у растений предположительно выполняют каналы семейства TPC (Ward et al., 2009).

4.3 Образование сферопластов армированных динофлагеллят

P. minimum

Поиск гомологов катионных каналов суперсемейства ПКК в транскриптомах, а также биоинформатический анализ филогении и структуры функциональных детерминант каналов семейства ЧД ПКК выявил их высокое разнообразие у динофлагеллят в целом и у *P. minimum* в частности. Тем не менее, с уверенностью говорить о функциональном разнообразии катионных каналов

можно только в том случае, если оно продемонстрировано экспериментально на электрофизиологическом уровне с помощью одного из методов регистрации трансмембранных ионных токов, самым эффективным из которых является метод локальной фиксации потенциала на мембране. Применение данного метода при изучении ионных каналов динофлагеллят затруднено в связи с подвижностью и наличием сложноустроенных покровов у этих организмов. Таким образом, была поставлена задача разработать подход, позволяющий применять метод пэтч-кламп к клеткам динофлагеллят. Разработанный нами метод получения сферопластов из клеток *P. minimum* с помощью ингибитора синтеза целлюлозы ДХБ впервые позволил зарегистрировать активность одиночных ионных каналов в мембранах динофлагеллят.

Ранее был предложен метод получения сферопластов из клеток армированных динофлагеллят с помощью полиэтиленгликоля, который препятствует слиянию амфиесмальных пузырьков (Kwok et al., 2007). Однако полиэтиленгликоль существенно меняет свойства мембраны, что может оказывать влияние на функционирование ионных каналов. Кроме того, обработанные этим веществом клетки приобретают способность к амебоидному движению. Все это делает применение полиэтиленгликоля нежелательным при изучении ионных каналов с помощью электрофизиологических методов.

В настоящей работе нами впервые был предложен метод получения сферопластов, пригодных для регистрации одиночных ионных каналов методом локальной фиксации потенциала на мембране, из клеток армированных динофлагеллят. Ранее для изучения ионных каналов этих протистов использовался метод прокалывающих электродов, а также метод локальной фиксации потенциала в гетерологичной системе экспрессии (Oami et al., 1988; Oami et al., 1990; Smith et al., 2011). Первый метод не позволяет изучать многие биофизические характеристики ионных каналов, так как с его помощью невозможно зарегистрировать ионные токи через одиночные каналы. Второй подход, предполагающий использование гетерологичной системы экспрессии, позволяет изучать ионные каналы как на уровне интегральных, так и на уровне

унитарных токов. Однако при этом сами изучаемые каналы функционируют в неестественных для них условиях.

По нашим наблюдениям ДХБ-индуцированные сферопласты способны возобновлять свою подвижность. Сохранение активности клеток свидетельствует о том, что ДХБ в используемых в настоящей работе концентрациях не оказывает на них губительного влияния. В пользу нетоксичности ДХБ для клеток динофлагеллят говорит и тот факт, что ДХБ-обработанные клетки *Cryptocodinium cohnii* способны к делению, испытывая лишь задержку в G₁ фазе клеточного цикла, которая связана с процессом синтеза целлюлозы в клеточной стенке (Kwok, Wong, 2003). Таким образом, по нашему мнению ДХБ-индуцированные сферопласты могут быть использованы для изучения нативных ионных каналов динофлагеллят.

В связи с тем, что ДХБ увеличивает долю экдизирующих клеток *P. minimum*, мы предполагаем наличие следующих этапов в процессе образования сферопласта (рисунок 4.1). На первой стадии ДХБ действует как стрессорный агент, вызывая тем самым потерю подвижности и стресс-индуцированный экдизис, характерный для этих протистов. Во время экдизиса клетка сбрасывает прежнюю плазматическую мембрану, внешнюю мембрану амфиесмальных пузырьков и целлюлозные текальные пластины; при этом внутренняя мембрана амфиесмальных пузырьков перестраивается в новую плазматическую мембрану клетки. Помимо индуцирования экдизиса, ДХБ действует и как ингибитор синтеза новой целлюлозы, что препятствует образованию текальных пластин в заново формирующейся амфиесме. Поскольку ДХБ-индуцированные сферопласты вновь формируют жгутики и приобретают способность к движению, для дальнейшего использования в электрофизиологических исследованиях их необходимо лишить подвижности, например, с помощью центрифугирования.

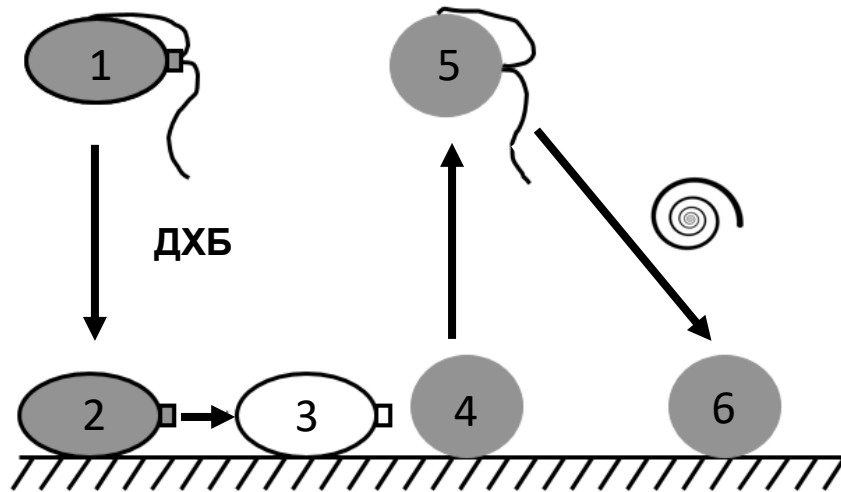


Рисунок 4.1. Схема предположительного пути образования сферопластов. 1 – нативная подвижная клетка, 2 – клетка, потерявшая подвижность, 3 – покровы, сброшенные во время экдизиса, 4 – неподвижный сферопласт, 5 – подвижный сферопласт, 6 – неподвижный сферопласт, подготовленный для электрофизиологических исследований с помощью центрифугирования. ДХБ – действие 2,6-дихлорбензонитрила. Спираль – центрифугирование.

Так как образование сферопластов проходит через стадию экдизиса, мы предположили, что дополнительное центрифугирование за несколько часов до начала электрофизиологических исследований приведет к возрастанию доли сферопластов. Однако эксперименты показали ошибочность этого предположения: в результате дополнительного центрифугирования экдизис претерпевало лишь 10% клеток, как и в случаях с применением ДХБ как единственного фактора индуцирования экдизиса. Тот факт, что выход сферопластов в используемой культуре динофлагеллят не превышает 10 %, может быть связан с тем, что только 10 % клеток в культуре способны к экдизису, независимо от числа последовательных стрессорных факторов.

Возможность образования плотного контакта между микропипеткой и мембраной ДХБ-индуцированных сферопластов при регистрации ионных каналов методом локальной фиксации потенциала не может быть объяснена одним лишь

отсутствием текальных пластин в составе клеточных покровов. Только что экдизировавшие клетки *P. minimum*, не обработанные ДХБ, содержат сопоставимо малое количество целлюлозы по сравнению с ДХБ-индуцированными сферопластами. Тем не менее, плотный контакт между стеклянной микропипеткой и поверхностью таких клеток не образуется. Важным отличием клетки, только что прошедшей экдизис, от сферопласта является ее уплощенная форма, мало отличающаяся от уплощенной формы нативной зрелой клетки *P. minimum*. В то же время для сферопласта характерна сферическая форма. По-видимому, целлюлоза, содержащаяся в ДХБ-индуцированных сферопластах, не способна поддерживать форму клетки. Возможно, ДХБ не только ингибирует синтез новой целлюлозы, но и изменяет ее организацию. Это предположение подтверждается рядом литературных данных. Так, было показано влияние ДХБ на структуру клеточной стенки и организацию целлюлозных фибрилл у высших растений (Shedletzky et al., 1992). Более того, известно, что ДХБ вызывает дезорганизацию терминальных комплексов, в которых происходит синтез целлюлозных фибрилл, у ксантофитовых водорослей *Vaucheria hamate* (Mizuta, Brown, 1992). Мы предполагаем, что, хотя в ДХБ-индуцированных сферопластах содержится такое же количество целлюлозы, как и в только что экдизировавших клетках, ее нативная организация может быть нарушена под действием ДХБ, в результате чего поверхность сферопласта становится пригодной для взаимодействия со стеклянной микропипеткой.

4.4 Трансмембранные ионные токи *P. minimum*

Использование разработанного нами подхода к получению сферопластов армированных динофлагеллят позволило применить метод локальной фиксации потенциала на неповрежденной мембране сферопласта (конфигурация «cell-attached») и на изолированном фрагменте мембраны (конфигурация «inside-out») к модельному объекту *P. minimum* и зарегистрировать активность катион-проводящих каналов этих организмов на уровне одиночных проводимостей. Во

многих случаях условия эксперимента не позволяли сделать вывод о селективности зарегистрированных ионных каналов. Неселективный катионный ток может быть опосредован каналами из семейства неселективных катионных каналов TRP (рисунок 3.5). Высокая проводимость (212 пСм) и пачечная активность катион-проводящих каналов типа А (рисунок 3.30) характерна для некоторых механочувствительных каналов, имеющих различное происхождение: механочувствительные каналы встречаются как в суперсемействе ПКК (среди каналов TRP, включая каналы TRPV, выявленные в транскриптомах *P. minimum*, а также среди каналов K_{2p}), так и за его пределами. Также нами были зарегистрированы катион-проводящие каналы с характеристикой входящего выпрямления (рисунок 3.29), на роль которых могут претендовать калиевые каналы входящего выпрямления K_{ir} (рисунок 3.1, а). Представители катионных каналов K_{ir} и TRP (TRPV и TRPP) были идентифицированы нами при анализе транскриптомов *P. minimum*. Представители семейства K_{2p} , не обнаруженные в ходе исследования транскриптомов *P. minimum*, все же были идентифицированы в транскриптомах девяти других видов динофлагеллят (Приложение, таблица 2).

Важно подчеркнуть, что ни один из зарегистрированных токов не может быть с уверенностью отнесен ни к одному из известных семейств катионных каналов, поскольку для точной идентификации ионных каналов необходимы детальные электрофизиологические и молекулярно-биологические исследования. Вместе с тем, полученные в настоящей работе результаты впервые продемонстрировали возможность успешной *in situ* регистрации одиночных каналов у динофлагеллят, что является важным этапом в развитии данной области науки, поскольку ранее исследователям не удавалось применить метод локальной фиксации потенциала на мембране к клеткам динофлагеллят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ионные каналы играют важную роль в физиологии клетки, принимая участие во множестве процессов клеточной регуляции и передачи сигналов. В данной работе впервые показано, что динофлагелляты обладают существенным разнообразием катионных каналов, сопоставимым с таковым у многоклеточных животных, а также разработан экспериментальный подход для изучения функциональной активности ионных каналов у этих микроорганизмов.

Анализ транскриптомов выявил, что динофлагелляты обладают каналами, которые относятся к различным семействам, входящим в состав суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов – группы, объединяющей большинство известных на сегодняшний день ионных каналов. В транскриптомах десяти видов динофлагеллят были выявлены: 1) потенциал-управляемые калиевые каналы (K_v); 2) калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}); 3) двухпоровые калиевые каналы (K_{2P}); 3) кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}); 5) калиевые каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (EAG); 6) катионные каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (HCN/CNG); 7) каналы TRP (TRPV и TRPP); 8) двухпоровые кальциевые каналы (TPC); 9) потенциал-управляемые протонные каналы (H_v) и 10) четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКК).

Семейство ЧД ПКК представляет особый интерес, поскольку эволюция и разнообразие каналов этого семейства связаны с эволюцией и разнообразием возбудимых мембран эукариот, в том числе мембран нервных клеток многоклеточных животных. Данные о ЧД ПКК динофлагеллят необходимы для понимания эволюции этого семейства ионных каналов у эукариот в целом. С помощью методов молекулярной филогении у динофлагеллят впервые показано существование по крайней мере четырех филогенетически обособленных групп ЧД ПКК.

Для того чтобы проверить, может ли выявленное филогенетическое разнообразие каналов семейства ЧД ПКК динофлагеллят отражать их функциональное разнообразие, с помощью биоинформатических методов был проведен анализ первичной и вторичной структуры функционально значимых участков этих каналов: селективного фильтра, сегментов S4 и участка инактивационных ворот. На основании результатов, полученных в ходе анализа, и их сопоставления с литературными данными сделан вывод о том, что идентифицированные нами аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят формируют: 1) катионные каналы с селективным фильтром, характерным для кальциевых каналов; 2) каналы с сегментами S4, характерными для потенциал-управляемых каналов; 3) каналы с сегментами S4, характерными для потенциал-неуправляемых каналов; 4) каналы, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, свидетельствует о возможности быстрой инактивации; 5) каналы, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, не характерна для каналов с быстрой инактивацией. Модельный объект *P. minimum* обладает ЧД ПКК со всеми перечисленными типами функционально значимых структур. Таким образом, ЧД ПКК этих организмов с большой вероятностью функционально разнообразны.

Применение методов биоинформатики позволило получить важную информацию о филогенетическом и структурно-функциональном разнообразии ионных каналов динофлагеллят, которая необходима для их дальнейшего экспериментального исследования, построения обоснованных гипотез и интерпретации данных. Тем не менее, полную информацию о функциональном разнообразии ионных каналов можно получить лишь с помощью электрофизиологических методов, самым эффективным из которых является метод локальной фиксации потенциала на мембране. Подвижность и наличие сложноустроенных покровов у динофлагеллят в течение десятилетий создавали серьезные препятствия для применения этого метода при изучении их ионных каналов. В настоящей работе был разработан метод получения сферопластов динофлагеллят *P. minimum* с помощью ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-

дихлорбензонитрила (ДХБ), что позволило впервые зарегистрировать разнообразные катион-проводящие каналы этих организмов на уровне унитарных проводимостей. Разработанный подход открывает широкие возможности для изучения клеточной биологии как динофлагеллят в целом, так и чрезвычайно важного в экологическом отношении вида *P. minimum*.

ВЫВОДЫ

1. В транскриптом динофлагеллят выявляются основные типы ионных каналов суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов, а именно катионные каналы следующих семейств: 1) потенциал-управляемые калиевые каналы (K_v); 2) калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}); 3) двухпоровые калиевые каналы (K_{2P}); 3) кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}); 5) калиевые каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (EAG); 6) катионные каналы, активируемые циклическими нуклеотидами (HCN/CNG); 7) каналы TRP (TRPV и TRPP); 8) двухпоровые кальциевые каналы (TPC); 9) потенциал-управляемые протонные каналы (H_v) и 10) четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы (ЧД ПКК).

2. Динофлагелляты обладают по крайней мере четырьмя филогенетически обособленными группами четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов.

3. Четырехдоменные потенциал-управляемые катионные каналы динофлагеллят характеризуются структурно-функциональным разнообразием, выявленным с помощью биоинформатического анализа функционально значимых участков канала: селективного фильтра, сегментов S4 и участка инактивационных ворот.

4. Сферопласты армированных динофлагеллят *Prorocentrum minimum*, полученные с помощью ингибитора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила (ДХБ), могут быть использованы для экспериментальной регистрации одиночных

ионных каналов в участке мембраны неповрежденной клетки и в изолированном мембранном фрагменте методом локальной фиксации потенциала на мембране.

5. Подобно многоклеточным животным, одноклеточные эукариоты из группы *Dinoflagellata* обладают большим филогенетическим, структурным и функциональным разнообразием катионных каналов, которое удалось выявить благодаря комплексному исследованию с использованием методов биоинформатики, клеточной биологии и электрофизиологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зефиров, А. Л. Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология) / А. Л. Зефиров, М. А. Ситдикова. – Казань : Арт-кафе, 2010. – 271 с.
2. Крутецкая, З. И. Биофизика мембран / З. И. Крутецкая, А. В. Лонский. – СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та., 1994. – 288 с.
3. Крутецкая, З. И. Структурно-функциональная организация сигнальных систем в клетках / З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев // Цитология. – 2000. – Т. 42. – № 9. – С. 844–874.
4. Крутецкая, З. И. Механизмы внутриклеточной сигнализации / З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова. – СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та., 2003. – 209 с.
5. Матанцева, О. В. Миксотрофия у микроорганизмов : экологические и цитофизиологические аспекты / О. В. Матанцева, С. О. Скарлато // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2013. – Т. 49. – № 4. – С. 245–254.
6. Околотков, Ю. Б. Dinoflagellata / Ю. Б. Околотков // Протисты : Руководство по зоологии. – СПб. – М. : Товарищество научных изданий КМК, 2011. – Ч. 3. – С. 7–94.
7. Поздняков, И. А. Проблемы регистрации ионных токов через мембраны одноклеточных организмов и пути их решения / И. А. Поздняков // Актуальные проблемы планктонологии : тез. докл. междунар. конф. – Калининград : АтлантНИРО, 2012. – С. 96–97.
8. Поздняков, И. А. Метод получения сферопластов динофлагеллят *Prorocentrum minimum*, пригодных для регистрации ионных каналов / И. А. Поздняков // IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре : тез. докл. – Цитология, 2014а. – Т. 56. – № 5. – С. 375.

9. Поздняков, И. А. Электрофизиологические исследования динофлагеллят / И. А. Поздняков // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов : материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. – М. : ООО «МАКС Пресс», 2014б. – С. 185.
10. Поздняков, И. А. Анализ транскриптома динофлагеллят *Prorocentrum minimum* : идентификация представителей суперсемейства потенциалуправляемых катионных каналов / И. А. Поздняков, С. О. Скарлато // Цитология. – 2015. – Т. 57. – № 7. – С. 533–543.
11. Поздняков, И. А. Разнообразие четырехдоменных потенциалуправляемых катионных каналов эукариот / И. А. Поздняков // V Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН : тез. докл. – СПб., 2016. – С. 57–58.
12. Фролов, А. О. Простейшие, протисты и протоктисты в системе эукариот / А. О. Фролов, А. Ю. Костыгов // Труды Зоологического института РАН. – Приложение. – № 2. – С. 191–201.
13. Adl, S. M. The revised classification of eukaryotes / S. M. Adl, A. G. Simpson, C. E. Lane, J. Lukes, D. Bass et al. // J. Euk. Microbiol. – 2012. – V. 59. – N. 5. – P. 429–514.
14. Akiba, T. Hattori Y. Food poisoning caused by eating asari and oyster-toxic substance, venerupin / T. Akiba // Jpn. J. Exp. Med. – 1949. – V. 20. – P. 271–284.
15. Anderson, D. M. Harmful algae bloom and eutrophication : nutrient sources, composition, and consequences / D. M. Anderson, M. P. Glibert, J. M. Burkholder // Estuaries. – 2002. – V. 25. – P. 704–726.
16. Arias-Darraz, L. A transient receptor potential ion channel in *Chlamydomonas* shares key features with sensory transduction-associated TRP channels in mammals / L. Arias-Darraz, D. Cabezas, C. K. Colenso, M. Alegría-Arcos, F. Bravo-Moraga et al. // Plant Cell. – 2015. – V. 27. – N. 1. – P. 177–188.
17. Armstrong, C. M. Voltage-gated ion channels and electrical excitability / C. M. Armstrong, B. Hille // Neuron. – 1998. – Vol. 20. – N. 3. – P. 37–380.

18. Bachvaroff, T. R. From stop to start : tandem gene arrangement, copy number and *trans*-splicing sites in dinoflagellate *Amphidinium carterae* / T. R. Bachvaroff, A. R. Place // PLoS ONE. – 2008. – V. 3. – N. 8. – e2929.
19. Barzilai, M. G. Convergent evolution of sodium ion selectivity in metazoan neuronal signaling / M. G. Barzilai, A. M. Reitzel, J. E. Kraus, D. Gordon, U. Technau, M. Gurevitz, Y. Moran // Cell reports. – 2012. – V. 2. – N. 2. – P. 242–248.
20. Bazinet, A. L. A gateway for phylogenetic analysis powered by grid computing featuring GARLI 2.0 / A. L. Bazinet, D. J. Zwickl, M. P. Cummings // Syst. Biol. – 2014. – V. 63. – N. 5. – P. 812–818.
21. Beauchemin, M. Dinoflagellate tandem array gene transcripts are highly conserved and not polycistronic / M. Beauchemin, S. Roy, P. Daoust, S. Dagenais-Bellefeuille, T. Bertomeu et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – V. 190. – N. 39. – P. 15793–15798.
22. Bricheux, G. Development of the pellicle and thecal plates following ecdysis in the dinoflagellate *Glenodinium foliaceum* / G. Bricheux, D. G. Mahoney, S. P. Gibbs // Protoplasma. – 1992. – V. 168. – N. 3–4. – P. 159–171.
23. Cai, X. Evolutionary genomics reveals the premetazoan origin of opposite gating polarity in animal-type voltage-gated ion channels / X. Cai // Genomics. – 2012. – V. 99. – N. 4. – P. 241–245.
24. Cai, X. Ancestral Ca^{2+} signaling machinery in early animal and fungal evolution / X. Cai, D. E. Clapham // Mol. Biol. Evol. – 2012. – V. 29. – N. 1. – P. 91–100.
25. Camacho, F. G. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates / F. G. Camacho, J. G. Rodriguez, A. S. Miron, M. C. Garcia, E. H. Belarbi, Y. Chisti, E. M. Grima // Biotechnology advances. – 2007. – V. 25. – N. 2. – P. 176–194.
26. Cavalier-Smith, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla / T. Cavalier-Smith // Microbiol. Rev. – 1993. – V. 57. – N. 4. – P. 953–994.
27. Cavalier-Smith, T. Multigene eukaryote phylogeny reveals the likely protozoan ancestors of opisthokonts (animals, fungi, choanozoans) and Amoebozoa / T.

Cavalier-Smith, E. E. Chao, E. A. Snell, C. Berney, A. M. Fiore-Donno, R. Lewis // Mol. Phylogenet. Evol. – 2014. – V. 81. – P. 71–85.

28. Cembella, A. D. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems / A. D. Cembella // Phycologia. – 2003. – V. 42. – N. 4. – P. 420–447.

29. Chang, J. J. Electrophysiological studies of a non-luminescent form of the dinoflagellate *Noctiluca miliaris* / J. J. Chang // J. Cell. Comp. Physiol. – 1960. – V. 56. – N. 1. – P. 33–42.

30. DeCoursey, T. E. Voltage-gated proton channels / T. E. DeCoursey // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – Vol. 65. – N. 16. – P. 2554–2573.

31. Dodge, J. D. Chromosome numbers in some marine dinoflagellates / J. D. Dodge // Botanica marina. – 1963. – V. 5. – N. 4. – P. 121–128.

32. Dodge, J. D. Thecal fine-structure in the dinoflagellate genera *Prorocentrum* and *Exuviaella* / J. D. Dodge // J. Mar. Biol. Ass. UK. – 1965. – V. 45. – N. 3. – P. 607–614.

33. Dodge, J. D. A survey of thecal fine structure in Dinophyceae / J. D. Dodge, R. M. Crawford // Bot. J. Linn. Soc. – 1970. – V. 63. – P. 53–67.

34. Echevarria, M. L. Connecting alveolate cell biology with trophic ecology in the marine plankton using the ciliate *Favella* as a model / M. L. Echevarria, G. V. Wolfe, S. L. Strom, A. R. Taylor // FEMS Microbiol. Ecol. – 2014. – V. 90. – N. 1. – P. 18–38.

35. Echevarria, M. L. Feast or flee : bioelectrical regulation of feeding and predator evasion behaviors in the planktonic alveolate *Favella* sp. (Spirotrichia) / M. L. Echevarria, G. V. Wolfe, A. R. Taylor // J. Exp. Biol. – 2015. – jeb-121871.

36. Eckert, R. Bioelectric control of bioluminescence in the dinoflagellate *Noctiluca* : I. Specific nature of triggering events / R. Eckert // Science. – 1965a. – V. 147. – P. 1140–1142.

37. Eckert, R. Bioelectric control of bioluminescence in the dinoflagellate *Noctiluca* : II. Asynchronous flash initiation by a propagated triggering potential / R. Eckert // Science. – 1965b. – V. 147. – P. 1142–1145.

38. Eckert, R. Subcellular sources of luminescence in *Noctiluca* / R. Eckert // Science. – 1966. – V. 151. – P. 349–352.
39. Eckert, R. Bioelectric regulation of tentacle movement in a dinoflagellate / R. Eckert, T. Sibaoka // J. Exp. Biol. – 1967. – V. 47. – N. 3. – P. 433–446.
40. Eckert, R. The subcellular origin of bioluminescence in *Noctiluca miliaris* / R. Eckert, G. T. Reynolds // J. Gen. Physiol. – 1967. – V. 50. – N. 5. – P. 1429–1458.
41. Eckert, R. The flash-triggering action potential of the luminescent dinoflagellate *Noctiluca* / R. Eckert, T. Sibaoka // J. Gen. Physiol. – 1968. – V. 52. – N. 2. – P. 258–282.
42. Fast, N. M. Re-examing alveolate evolution using protein molecular phylogenies / N. M. Fast, L. Xue, S. Bungham, P. J. Keeling // J. Eukaryot. Microbiol. – 2002. – V. 49. – P. 30–37.
43. Faust, M. A. Identifying harmful marine dinoflagellates / M. A. Faust, R. A. Gulledge // Contributions from the United States national herbarium. – 2002. – V. 42. – P. 1–144.
44. Fensome, R. A. A classification of living and fossil dinoflagellates / R. A. Fensome, F. J. R. Taylor, G. Norris, W. A. S. Sarjeant, D. I. Wharton, G. L. Williams. – Hanover, PA : Scheridan Press, 1993. – 351 p.
45. Fensome, R. A. The early Mesozoic radiation of dinoflagellates / R. A. Fensome, R. A. MacRae, J. M. Moldowan, F. J. R. Taylor, G. L. Williams // Paleobiol. – 1996. – V. 22. – N. 3. – P. 329–338.
46. Figueroa, R. I. The life history and cell cycle of *Kryptoperidinium foliaceum*, a dinoflagellate with two eukaryotic nuclei / R. I. Figueroa, I. Bravo, S. Fraga, E. Garces, G. Llaveria // Protist. – 2009. – V. 160. – N. 2. – P. 285–300.
47. Finn, R. D. The Pfam protein families database : towards a more sustainable future / R. D. Finn, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, J. Mistry et al. // Nucleic Acids Res. – 2016. – V. 44. – Database issue. – P. D279–D285.
48. Fogel, M. Bioluminescence : mechanism and mode of control of scintillon activity / M. Fogel, J. W. Hastings // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1972. – V. 69. – N. 3. – P. 690–693.

49. Fujiu, K. Mechanoreception in motile flagella of *Chlamydomonas* / K. Fujiu, Y. Nakayama, H. Iida, M. Sokabe, K. Yoshimura // Nat. Cell Biol. – 2011. – V. 13. – N. 5. – P. 630–632.
50. Glibert, P. M. Preface to the special issue on *Prorocentrum minimum* / P. M. Glibert, K. G. Sellner // Harmful Algae. – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 447.
51. Glibert, P. M. The role of eutrophication in global proliferation of harmful algal blooms / P. M. Glibert, S. Seitzinger, C. A. Heil, J. M. Burkholder, M. W. Parrow, L. A. Codispoti, V. Kelly // Oceanography. – 2005. – V. 18. – P. 198–209.
52. Godhe, A. Quantification of diatom and dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by real-time PCR / A. Godhe, M. E. Asplund, K. Härnström, V. Saravanan, A. Tyagi, I. Karunasagar // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. – N. 23. – P. 7174–7182.
53. Goldin, A. L. Mechanisms of sodium channel inactivation / A. L. Goldin // Curr. Opin. Neurobiol. – 2003. – V. 13. – N. 3. – P. 284–290.
54. Grzebyk, D. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum* / D. Grzebyk, A. Denardou, B. Berland, Y. F. Pouchus // J. Plankton Res. – 1997. – V. 19. – N. 8. – P. 1111–1124.
55. Guillard, R. R. L. Studies of marine planktonic diatoms : I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran / R. R. L. Guillard, J. H. Ryther // Can. J. Microbiol. – 1962. – V. 8. – N. 2. – P. 229–239.
56. Hackett, J. D. Dinoflagellates : a remarkable evolutionary experiment / J. D. Hackett, D. M. Anderson, D. L. Erdner, D. Bhattacharya // Am. J. Bot. – 2004. – V. 91. – N. 10. – P. 1523–1534.
57. Hajdu, S. *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in Baltic Sea : morphology, occurrence – a review / S. Hajdu, S. Petrola, H. Kuosa // Harmful Algae. – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 471–480.
58. Hall, T. A. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. A. Hall // Nucl. Acids Symp. Ser. – 1999. – V. 41. – P. 95–98.

59. Hamill, O. P. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth // *Pflügers Archiv.* – 1981. – V. 391. – N. 2. – P. 85–100.
60. Hansen, P. J. The role of photosynthesis and food uptake for the growth of marine mixotrophic dinoflagellates / P. J. Hansen // *J. Euk. Microbiol.* – 2011. – V. 58. – N. 3. – P. 203–214.
61. Hausmann, K. Ultrastructural and functional aspects of static and motile systems in two taxa of the Alveolata : Dinoflagellata and Ciliata / K. Hausmann, N. Hülsmann // *Protistology.* – 2010. – V. 6. – N. 3. – P. 139–146.
62. Heil, C. A. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller : a review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance / C. A. Heil, P. M. Glibert, C. Fan // *Harmful Algae.* – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 449–470.
63. Heil, C. A. Nutrient quality drives differential phytoplankton community composition on the southwest Florida shelf / C. A. Heil, M. Revilla, P. M. Glibert, S. Murasko // *Limnol. Oceanogr.* – 2007. – V. 52. – P. 1067–1078.
64. Hille, B. Ion channels of excitable membranes / B. Hille. – Sunderland, MA : Sinauer, 2001. – 814 p.
65. Hisada, M. Membrane resting and action potentials from a protozoan, *Noctiluca scintillans* / M. Hisada // *J. Cell. Comp. Physiol.* – 1957. – V. 50. – N. 1. – P. 57–71.
66. Höhfeld, I. Amphiesmal ultrastructure of dinoflagellates : a reevaluation of pellicle formation / I. Höhfeld, M. Melkonian // *J. Phycol.* – 1992. – V. 28. – N. 1. – P. 82–89.
67. Hong, M. P. Cch1 restores intracellular Ca^{2+} in fungal cells during endoplasmic reticulum stress / M. P. Hong, K. Vu, J. Bautos, A. Gelli // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – N. 14. – P. 10951–10958.
68. Honsell, G. The importance of flagellar arrangement and insertion in the interpretation of the theca of *Prorocentrum* (Dinophyceae) / G. Honsell, L. Talarico // *Botanica marina.* – 1985. – V. 28. – N. 1. – P. 15–22.

69. Hoppenrath, M. Taxonomy and phylogeny of benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae) – A proposal and review / M. Hoppenrath, N. Chomerat, T. Horiguchi, M. Schweikert, Y. Nagahama, S. Murray // Harmful Algae. – 2013. – V. 27. – P. 1–28.
70. Huang, K. Function and dynamics of PKD2 in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella / K. Huang, D. R. Diener, A. Mitchell, G. J. Pazour, G. B. Witman, J. L. Rosenbaum // J. Cell Biol. – 2007. – V. 179. – N. 3. – P. 501–514.
71. Inagaki, Y. Algae or Protozoa : phylogenetic position of euglenophytes and dinoflagellates as inferred from mitochondrial sequences / Y. Inagaki, Y. Hayashi-Ishimaru, M. Ehara, I. Igarashi, T. Ohama // J. Mol. Evol. – 1997. – V. 45. – P. 295–300.
72. Jegla, T. J. Evolution of the human ion channel set / T. J. Jegla, C. M. Zmasek, S. Batalov, S. K. Nayak // Comb. Chem. High Throughput Screen. – 2009. – V. 12. – N. 1. – P. 2–23.
73. Jeong, H. J. Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs / H. J. Jeong, Y. Y. Du, J. S. Kim, K. A. Seong, N. S. Kang, T. H. Kim // Ocean Science Journal. – 2010. – V. 45. – N. 2. – P. 65–91.
74. Kamykowski, D. Relationships between geotaxis/phototaxis and diel vertical migration in autotrophic dinoflagellates / D. Kamykowski, E. J. Milligan, R. E. Reed // J. Plankton Res. – 1998. – V. 20. – N. 9. – P. 1781–1796.
75. Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7 : improvements in performance and usability / K. Katoh, D. M. Standley // Mol. Biol. Evol. – 2013. – V. 30. – N. 4. – P. 772–780.
76. Kester, D. R. Preparation of artificial seawater / D. R. Kester, I. W. Duedall, D. N. Connors, R. M. Pytkowicz // Limnol. Oceanogr. – 1967. – V. 12. – N. 1. – P. 176–179.
77. Khosravani, H. Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies / H. Khosravani, G. W. Zamponi // Physiol. Rev. – 2006. – Vol. 86. – N. 3. – P. 941–966.

78. Kwok, A. C. M. Cellulose synthesis is coupled to cell cycle progression at G1 in the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* / A. C. M. Kwok, J. T. Y. Wong // Plant Physiol. – 2003. – V. 131. – N. 4. – P. 1681–1691.
79. Kwok, A. C. M. Novel method for preparing spheroplasts from cells with an internal cellulosic cell wall / A. C. M. Kwok, C. C. Mak, F. T. Wong, J. T. Wong // Eukaryot. Cell. – 2007. – V. 6. – N. 3. – P. 563–567.
80. Le, S. Q. An improved general amino acid replacement matrix / S. Q. Le, O. Gascuel // Mol. Biol. Evol. – 2008. – V. 25. – N. 7. – P. 1307–1320.
81. Leander, B. S. Early evolution of dinoflagellates and apicomplexans (Alveolata) as inferred from hsp90 and actin phylogenies / B. S. Leander, P. J. Keeling // J. Phycol. – 2004. – V. 40. – N. 2. – P. 341–350.
82. Leblond, J. D. A survey of the sterol composition of the marine dinoflagellates *Karenia brevis*, *Karenia mikimoto*, and *Karlodinium micrum* : distribution of sterols within other members of the class Dinophyceae / J. D. Leblond, P. J. Chapman // J. Phycol. – 2002. – V. 38. – N. 4. P. 670–682.
83. Lebour, M. V. The dinoflagellates of northern seas / M. V. Lebour. – Plymouth : Marine Biological Association of the United Kingdom, 1925. – 250 p.
84. Liebeskind, B. J. Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals / B. J. Liebeskind, D. M. Hillis, H. H. Zakon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108. – N. 22. – P. 9154–9159.
85. Liebeskind, B. J. Phylogeny unites animal sodium leak channels with fungal calcium channels in an ancient, voltage-insensitive clade / B. J. Liebeskind, D. M. Hillis, H. H. Zakon // Mol. Biol. Evol. – 2012. – V. 29. – N. 12. – P. 3613–3616.
86. Liebeskind, B. J. Independent acquisition of sodium selectivity in bacterial and animal sodium channels / B. J. Liebeskind, D. M. Hillis, H. H. Zakon // Curr. Biol. – 2013. – V. 23. – N. 21. – P. R948–R949.
87. Lin, S. Spliced leader-based metatranscriptomic analyses lead to recognition of hidden genomic features in dinoflagellates / S. Lin, H. Zhang, Y. Zhuang, B. Tran, J. Gill // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107. – N. 46. – P. 20033–20038.

88. Liu, L. Novel and rapidly diverging intergenic sequences between tandem repeats of the luciferase genes in seven dinoflagellate species / L. Liu, J. W. Hastings // J. Phycol. – 2005. – V. 42. – P. 96–103.
89. Liu, M. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments / M. Liu, P. Du, G. Heinrich, G. M. Cox, A. Gelli // Eukaryot. Cell. – 2006. – V. 5. – N. 10. – P. 1788–1796.
90. López-García, P. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton / P. López-García, F. Rodriguez-Valera, C. Pedrós-Alió, D. Moreira // Nature. – 2001. – V. 409. – N. 6820. – P. 603–607.
91. Lu, B. The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm / B. Lu, Y. Su, S. Das, J. Liu, J. Xia, D. Ren // Cell. – 2007. – V. 129. – N. 2. – P. 371–383.
92. Martinac, B. Ion channels in microbes / B. Martinac, Y. Saimi, C. Kung // Physiol. Rev. – 2008. – V. 88. – N. 4. – P. 1449–1490.
93. Melkonian, M. Amphiesmal ultrastructure in *Noctiluca miliaris* Suriray (Dinophyceae) / M. Melkonian, I. Höhfeld // Helgoländer Meeresuntersuchungen. – 1988. – V. 42. – N. 3–4. – P. 601–612.
94. Mendez, G. S. Dinoflagellate gene structure and intron splice sites in a genomic tandem array / G. S. Mendez, C. F. Delwiche, K. E. Apt, J. C. Lippmeier // J. Euk. Microbiol. – 2015. – V. 62. – N. 5. – P. 679–687.
95. Michaeli, S. Trans-splicing in trypanosomes : machinery and its impact on the parasite transcriptome / S. Michaeli // Future microbiology. – 2011. – V. 6. – N. 4. – P. 459–474.
96. Mizuta, S. Effects of 2,6-dichlorobenzonitrile and Tinopal LPW on the structure of the cellulose synthesizing complexes of *Vaucheria hamata* / S. Mizuta, R. M. Brown, Jr // Protoplasma. – 1992. – V. 166. – N. 3–4. – P. 200–207.
97. Molleman, A. Patch-clamping : an introductory guide to patch clamp electrophysiology / A. Molleman. – Chichester, West Sussex, UK : John Willey and Sons, Ltd. – 2003. – 209 p.

98. Moon-van der Staay, S. Y. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity / S. Y. Moon-van der Staay, R. De Wachter, D. Vaulot // *Nature*. – 2001. – V. 409. – N. 6820. – P. 607–610.
99. Moore, R. B. A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites / R. B. Moore, M. Oborník, J. Janoušek, T. Chrudimský, M. Vancová, et al. // *Nature*. – 2008. – V. 451. – N. 7181. – P. 959–963.
100. Moran, Y. The evolution of the four subunits of voltage-gated calcium channels : ancient roots, increasing complexity, and multiple losses / Y. Moran, H. H. Zakon // *Genome Biol. Evol.* – 2014. – V. 6. – N. 9. – P. 2210–2217.
101. Moran, Y. Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa / Y. Moran, M. G. Barzilai, B. J. Liebeskind, H. H. Zakon // *J. Exp. Biol.* – 2015. – V. 218. – N. 4. – P. 515–525.
102. Morrill, L. C. Ultrastructure of the dinoflagellate amphiesma / L. C. Morrill, A.R. Loeblich, III. // *Int. Rev. Cytol.* – 1983. – V. 82. – P. 151–180.
103. Morrill, L. C. Ecdysis and the location of the plasma membrane in the dinoflagellate *Heterocapsa niei* / L. C. Morrill // *Protoplasma*. – 1984. – V. 119. – N. 1–2. – P. 8–20.
104. Morrill, L. Cell division and reformation of the amphiesma in the pelliculate dinoflagellate, *Heterocapsa niei* / L. Morrill, A.R. Loeblich, III. // *J. Mar. Biol. Ass. UK*. – 1984. – V. 64. – N. 4. – P. 939–953.
105. Nawata, T. Coupling between action potential and bioluminescence in *Noctiluca* : effects of inorganic ions and pH in vacuolar sap / T. Nawata, T. Sibaoka // *J. Comp. Physiol. A*. – 1979. – V. 134. – N. 2. – P. 137–149.
106. Oami, K. Tentacle regulating potentials in *Noctiluca miliaris* : their generation sites and ionic mechanisms / K. Oami, T. Sibaoka, Y. Naitoh // *J. Comp. Physiol. A*. – 1988. – V. 162. – N. 2. – P. 179–185.
107. Oami, K. Distribution of ion channels in the membrane of the dinoflagellate *Noctiluca miliaris* / K. Oami, Y. Naitoh, T. Sibaoka // *J. Exp. Biol.* – 1990. – V. 150. – P. 473–478.

108. Oami, K. Voltage-gated ion conductances corresponding to regenerative positive and negative spikes in the dinoflagellate *Noctiluca miliaris* / K. Oami, Y. Naitoh, T. Sibaoka // J. Comp. Physiol. A. – 1995a. – V. 176. – N. 5. – P. 625–633.
109. Oami, K. Modification of voltage-sensitive inactivation of Na⁺ current by external Ca²⁺ in the marine dinoflagellate *Noctiluca miliaris* / K. Oami, Y. Naitoh, T. Sibaoka // J. Comp. Physiol. A. – 1995b. – V. 176. – N. 5. – P. 635–640.
110. Okaichi, T. Toxicity of *Prorocentrum minimum* var. *mariae-lebouriae* assumed to be causative agent of short-neck clam poisoning / T. Okaichi, Y. Imatomi // Toxic dinoflagellate blooms. – North-Holland, New York : Elsevier, 1979. – P. 385–388.
111. Okonechnikov, K. Unipro UGENE : a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // Bioinformatics. – 2012. – V. 28. – N. 8. – P. 1166–1167.
112. Pearson, W. R. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching / Pearson W. R. // Curr. Protoc. Bioinform. – 2013. – DOI : 10.1002/0471250953.bi0301s42.
113. Petrola, S. Morphology of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in the Baltic Sea and in Chesapeake Bay : comparison of cell shapes and thecal ornamentation / S. Petrola, M. A. Faust, H. Kuosa, G. Hällfors // Botanica Marina. – 2003. – V. 46. – P. 477–486.
114. Pertola, S. Is the invasion of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) related to the nitrogen enrichment of the Baltic Sea? / S. Pertola, H. Kuosa, R. Olsonen // Harmful Algae. – 2005. – V. 4. – N. 3. – P. 481–492.
115. Pozdnyakov, I. Dinoflagellate amphiesma at different stages of the life cycle / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // Protistology. – 2012. – V. 7. – N. 2. – P. 108–115.
116. Pozdnyakov, I. The first single-channel recordings of voltage-dependent ionic channels in dinoflagellates / I. Pozdnyakov, O. Matantseva // 38th FEBS Congress : abstracts. – The FEBS Journal, 2013. – V. 280. – P. 192.
117. Pozdnyakov, I. Obtaining spheroplasts of armored dinoflagellates and first single-channel recordings of their ion channels using patch-clamping / I. Pozdnyakov,

O. Matantseva, Y. Negulyaev, S. Skarlato // Marine drugs. – 2014. – V. 12. – N. 9. – P. 4743–4755.

118. Pozdnyakov, I. What electrophysiology can do for aquatic ecology? / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // Microbes in the Baltic : Small things, small sea, big questions : abstracts of international workshop. – Gdynia, Poland, 2014. – P. 12.

119. Pozdnyakov, I. Ion channels in dinoflagellates revealed by patch-clamping and analysis of transcriptomes / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // VII European Congress of Protistology : abstracts. – Seville, Spain, 2015. – P. 360.

120. Pozdnyakov, I. Chasing ion channels of dinoflagellates / I. Pozdnyakov, O. Matantseva, S. Skarlato // Moscow Forum «Protist-2016» : abstracts. – Protistology, 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 61.

121. Pozdnyakov, I. Phylogeny of protistan four-domain voltage-gated ion channels / I. Pozdnyakov, S. Skarlato // Moscow Forum «Protist-2016» : abstracts. – Protistology, 2016. – V. 10. – N. 2. – P. 61–62.

122. Pozdnyakov, I. Diversity and evolution of four-domain voltage-gated ion channels revealed by bioinformatics analysis / I. Pozdnyakov // International conference «Biomembranes 2016: mechanisms of aging and age-related diseases» : abstracts. – Dolgoprudny, MIPT, 2016. – P. 139.

123. Raikov, I. B. The dinoflagellate nucleus and chromosomes : mesokaryote concept reconsidered / I. B. Raikov // Acta Protozool. – 1995. – V. 34. – N. 4. – P. 239–247.

124. Reichman, J. R. PCP gene family in *Symbiodinium* from *Hippopus hippopus* : low levels of concerted evolution, isoform diversity, and spectral tuning of chromophores / J. R. Reichman, T. P. Wilcox, P. D. Vize // Mol. Biol. Evol. – 2003. – V. 20. – N. 12. – P. 2143–2154.

125. Ronquist, F. MrBayes 3.2 : efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space / F. Ronquist, M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling et al. // Syst. Biol. – 2012. – V. 61. – N. 3. – P. 539–542.

126. Single-channel recording / eds.: B. Sakmann, E. Neher. – 2nd edition. – New York, Dordrecht, Heidelberg, London : Springer, 2009. – 700 p.

127. Saldarriaga, J. F. Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates / J. F. Saldarriaga, F. J. R. Taylor, T. Cavalier-Smith, S. Menden-Deuer, P. J. Keeling // *Europ. J. Protistol.* – 2004. – V. 40. – P. 85–111.
128. Sekida, S. Development of the cell covering in the dinoflagellate *Scrippsiella hexapraeicingula* (Peridiniales, Dinophyceae) / S. Sekida, T. Horiguchi, K. Okuda // *Phycological Res.* – 2001. – V. 49. – N. 3. – P. 163–176.
129. Sela, I. GUIDANCE2 : accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters / I. Sela, H. Ashkenazy, K. Katoh, T. Pupko // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – N. W1. – P. W7–W14.
130. Senatore, A. NALCN ion channels have alternative selectivity filters resembling calcium channels or sodium channels / A. Senatore, A. Monteil, J. van Minnen, A. B. Smit, J. D. Spafford // *PloS ONE.* – 2013. – V. 8. – N. 1. – e55088.
131. Seo, K. S. Karyology of a marine non-motile dinoflagellate, *Pyrocystis lunula* / K. S. Seo, L. Fritz // *Hydrobiologia.* – 2006. – V. 563. – P. 289–296.
132. Shalchian-Tabrizi, K. Combined heat shock protein 90 and ribosomal RNA sequence phylogeny supports multiple replacements of dinoflagellate plastids / K. Shalchian-Tabrizi, M. A. Minge, T. Cavalier-Smith, L. M. Nedreklepp, D. Klaveness, K. Jakobsen // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2006. – V. 53. – N. 3. – P. 217–224.
133. Shedletzky, E. Cell wall structure in cells adapted to growth on the cellulose-synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile / E. Shedletzky, M. Shmuel, T. Trainin, S. Kalman, D. Delmer // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 100. – N. 1. – P. 120–130.
134. Sibaoka, T. An electrophysiological study of the tentacle-regulating potentials in *Noctiluca* / T. Sibaoka, R. Eckert // *J. Exp. Biol.* – 1967. – V. 47. – N. 3. – P. 447–459.
135. Sirota, F. L. Molecular modeling and dynamics of the sodium channel inactivation gate / F. L. Sirota, P. G. Pascutti, C. Anteneodo // *Biophys. J.* – 2002. – V. 82. – N. 3. – P. 1207–1215.
136. Smayda, T. J. Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates / T. J. Smayda // *J. Oceanogr.* – 2002. – V. 58. – N. 2. – P. 281–294.

137. Smith, S. M. E. Voltage-gated proton channel in a dinoflagellate / S. M. E. Smith, D. Morgan, B. Musset, V. V. Cherny, A. R. Place, J. W. Hastings, T. E. DeCoursey // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108. – N. 44. – P. 18162–18167.
138. Soyer, M. O. Les ultrastructures liées aux fonctions de relation chez *Noctiluca miliaris* S. (Dinoflagellata) / M. O. Soyer // *Z. Zellforsch. Mikrosk Anat.* – 1970. – V. 104. – N. 1. – P. 29–55.
139. Strong, M. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes : on the origins of electrical excitability / M. Strong, K. G. Chandy, G. A. Gutman // *Mol. Biol. Evol.* – 1993. – V. 10. – N. 1. – P. 221–242.
140. Tamura, K. MEGA6 : molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – DOI : 10.1093/molbev/mst197.
141. Taylor, A. R. A novel Cl^- inward-rectifying current in the plasma membrane of the calcifying marine phytoplankton *Coccolithus pelagicus* / A. R. Taylor, C. Brownlee // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 131. – N. 3. – P. 1391–1400.
142. Taylor, A. R. Proton channels in algae : reasons to be excited / A. R. Taylor, C. Brownlee, G. L. Wheeler // *Trends Plant Sci.* – 2012. – V. 17. – N 11. – P. 675–684.
143. Taylor, F. J. R. Dinoflagellate diversity and distribution / F. J. R. Taylor, M. Hoppenrath, J. F. Saldarriaga // *Biodiv. Conserv.* – 2008. – V. 17. – N. 2. – P. 407–418.
144. Verret, F. Calcium channels in photosynthetic eukaryotes : implications for evolution of calcium-based signaling / F. Verret, G. Wheeler, A. R. Taylor, G. Farnham, C. Brownlee // *New Phytol.* – 2010. – V. 187. – N. 1. – P. 23–43.
145. Wakefield, T. S. Revised description of the fine structure of *in situ* "Zooxanthellae" genus *Symbiodinium* / T. S. Wakefield, M. A. Farmer, S. C. Kempf // *Biol. Bull.* – 2000. – V. 199. – N. 1. – P. 76–84.
146. Wang D. Z. Neurotoxins from marine dinoflagellates : a brief review / D. Z. Wang // *Marine Drugs.* – 2008. – V. 6. – N. 2. – P. 349–371.

147. Ward, J. M. Plant ion channels : gene families, physiology, and functional genomics analyses / J. M. Ward, P. Mäser, J. I. Schroeder // *Annu. Rev. Physiol.* – 2009. – V. 71. – P. 59–82.
148. Wedemayer, G. J. The ultrastructure of the freshwater, colorless dinoflagellate *Peridiniopsis berolinense* (Lemm.) Bourrelly (Mastigophora, Dinoflagellida) / G. J. Wedemayer, L. E. E. W. Wilcox // *J. Protozool.* – 1984. – V. 31. – N. 3. – P. 444–453.
149. Wetherbee, R. The fine structure of *Ceratium tripos*, a marine armored dinoflagellate : III. Thecal plate formation / R. Wetherbee // *J. Ultrastruc. Res.* – 1975. – V. 50. – N. 1. – P. 77–88.
150. Wisecaver, J. H. Dinoflagellate genome evolution / J. H. Wisecaver, J. D. Hackett // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2011. – V. 65. – P. 369–387.
151. Woese, C. R. Towards a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya / C. R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis // *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA.* – 1990. – V. 87. – N. 12. – P. 4576–4579.
152. Yoon, H. S. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis / H. S. Yoon, J. D. Hackett, D. Bhattacharya // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – N. 18. – P. 11724–11729.
153. Yu, F. H. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily / F. H. Yu, V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman, W. A. Catterall // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – V. 57. – N. 4. – P. 387–395.
154. Yue, L. The cation selectivity filter of the bacterial sodium channel, NaChBac / L. Yue, B. Navarro, D. Ren, A. Ramos, D. E. Clapham // *J. Gen. Physiol.* – 2002. – V. 120. – N. 6. – P. 845–853.
155. Zhang, H. Spliced leader RNA trans-splicing in dinoflagellates / H. Zhang, Y. Hou, L. Miranda, D. A. Campbell, N. R. Sturm, T. Gaasterland, S. Lin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2007. – V. 104. – N. 11. – P. 4618–4623.
156. Zingmark, R. G. Sexual reproduction in the dinoflagellate *Noctiluca miliaris* Suriray / R. G. Zingmark // *J. Phycol.* – 1970. – V. 6. – N. 2. – P. 122–126.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук Сергею Орестовичу Скарлато, за всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы и написания диссертации. Также автор благодарен доктору биологических наук Юрию Алексеевичу Негуляеву за возможность проведения электрофизиологических исследований.

Автор особо признателен д.б.н. Елене Алексеевне Морачевской и к.б.н. Елене Станиславовне Насоновой за советы и критические замечания при обсуждении результатов работы.

Автор сердечно благодарит Ольгу Валерьевну Матанцеву за помощь при планировании настоящей работы и обсуждении полученных результатов, а также за неоценимую моральную поддержку.

Автор благодарит всех сотрудников лаборатории цитологии одноклеточных организмов и лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации Института цитологии РАН за их ценные советы и доброжелательность.

Автор очень признателен своей семье за поддержку и понимание.

В ходе выполнения работы финансовая помощь была оказана: Российским фондом фундаментальных исследований (проекты №№ 12-04-31952-мол_а и 13-04-00703-а) и Российским научным фондом (проект № 16-14-10116).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Список последовательностей четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов эукариот, использованных при реконструкции их филогении.

№	Название	Вид	Номер	База данных
SAR				
ALVEOLATA				
Dinoflagellata				
1	At406917	<i>Alexandrium tamarense</i> CCMP1771	406917_1	MMETSP
2	Ac156993	<i>Amphidinium carterae</i> CCMP1314	156993_1	MMETSP
3	Ac29873	<i>Amphidinium carterae</i> CCMP1314	29873_1	MMETSP
4	Kb20887	<i>Karinia brevis</i> CCMP2229	20887_1	MMETSP
5	Kb269344	<i>Karinia brevis</i> CCMP2229	269344_1	MMETSP
6	Kb53452	<i>Karinia brevis</i> CCMP2229	53452_1	MMETSP
7	Kb269973	<i>Karinia brevis</i> CCMP2229	269973_1	MMETSP
8	Kb20579	<i>Karinia brevis</i> CCMP2229	20579_1	MMETSP
9	Kf405392	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i> CCMP1326	405392_1	MMETSP
10	Kf407651	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i> CCMP1326	407651_1	MMETSP
11	Kf416989	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i> CCMP1326	416989_1	MMETSP
12	Lp90575	<i>Lingulodinium polyedra</i> CCMP1738	90575_1	MMETSP
13	Om66755	<i>Oxyrrhis marina</i>	66755_1	MMETSP

		LB1974		
14	Pm40145	<i>Prorocentrum minimum</i> CCMP2233	40145_1	MMETSP
15	Pm47759	<i>Prorocentrum minimum</i> CCMP2233	47759_1	MMETSP
16	Pm20998	<i>Prorocentrum minimum</i> CCMP2233	20998_1	MMETSP
17	Pm2595	<i>Prorocentrum minimum</i> CCMP2233	2595_1	MMETSP
18	St17126	<i>Scrippsiella trochoidea</i> CCMP3099	17126_1	MMETSP
19	St9808	<i>Scrippsiella trochoidea</i> CCMP3099	9808_1	MMETSP
20	St26908	<i>Scrippsiella trochoidea</i> CCMP3099	26908_1	MMETSP
21	St388392	<i>Scrippsiella trochoidea</i> CCMP3099	388392_1	MMETSP
22	St391309	<i>Scrippsiella trochoidea</i> CCMP3099	391309_1	MMETSP
23	Ssp188361	<i>Symbiodinium sp</i> Mp	188361_1	MMETSP
24	Ssp190870	<i>Symbiodinium sp</i> Mp	190870_1	MMETSP
Perkinsida				
25	Perkim1	<i>Perkinsus marinus</i>	XP_002776392.1	NCBI RefSeq
26	Perkim2	<i>Perkinsus marinus</i>	XP_002788713.1	NCBI RefSeq
Apicomplexa				
27	Toxopg1	<i>Toxoplasma gondii</i>	EPT29988.1	GenBank
28	Toxopg2	<i>Toxoplasma gondii</i>	ESS33237.1	GenBank
Chromerida				
29	Vitreb1	<i>Vitrella brassicaformis</i>	CEM06448.1	GenBank
30	Vitreb2	<i>Vitrella brassicaformis</i>	CEM24784.1	GenBank
31	Vitreb3	<i>Vitrella brassicaformis</i>	CEM21952.1	GenBank
32	Vitreb4	<i>Vitrella brassicaformis</i>	CEM11618.1	GenBank
Ciliata				
33	Ichthm1	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	XP_004035037.1	NCBI RefSeq

34	Ichthm2	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	XP_004037277.1	NCBI RefSeq
35	Ichthm3	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	XP_004035093.1	NCBI RefSeq
36	Ichthm4	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	XP_004036524.1	NCBI RefSeq
37	Ichthm5	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	XP_004024005.1	NCBI RefSeq
38	Oxytrt1	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY83225.1	GenBank
39	Oxytrt2	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY65938.1	GenBank
40	Oxytrt3	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY81393.1	GenBank
41	Oxytrt4	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY83098.1	GenBank
42	Oxytrt5	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY85379.1	GenBank
43	Oxytrt6	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY78158.1	GenBank
44	Oxytrt7	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY69333.1	GenBank
45	Oxytrt8	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY78389.1	GenBank
46	Oxytrt9	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY84542.1	GenBank
47	Oxytrt10	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY64416.1	GenBank
48	Oxytrt11	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY78675.1	GenBank
49	Oxytrt12	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY66049.1	GenBank
50	Oxytrt13	<i>Oxytricha trifallax</i>	EJY79258.1	GenBank
51	Paramt1	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001445891.1	NCBI RefSeq
52	Paramt2	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001458988.1	NCBI RefSeq
53	Paramt3	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001429788.1	NCBI RefSeq
54	Paramt4	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001432429.1	NCBI RefSeq
55	Paramt5	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001450373.1	NCBI RefSeq
56	Paramt6	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001441486.1	NCBI RefSeq
57	Paramt7	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001441606.1	NCBI RefSeq
58	Paramt8	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001453058.1	NCBI RefSeq
59	Paramt9	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001450374.1	NCBI RefSeq
60	Paramt10	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001452932.1	NCBI RefSeq
61	Paramt11	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001424527.1	NCBI RefSeq

62	Paramt12	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001457036.1	NCBI RefSeq
63	Paramt13	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001424021.1	NCBI RefSeq
64	Paramt14	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001455088.1	NCBI RefSeq
65	Paramt15	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001435951.1	NCBI RefSeq
66	Paramt16	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001455025.1	NCBI RefSeq
67	Paramt17	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001430688.1	NCBI RefSeq
68	Paramt18	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001435671.1	NCBI RefSeq
69	Paramt19	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001445828.1	NCBI RefSeq
70	Paramt20	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001450103.1	NCBI RefSeq
71	Paramt21	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001455210.1	NCBI RefSeq
72	Paramt22	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001445200.1	NCBI RefSeq
73	Paramt23	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001424033.1	NCBI RefSeq
74	Paramt24	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001430317.1	NCBI RefSeq
75	Paramt25	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001455219.1	NCBI RefSeq
76	Paramt26	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001433501.1	NCBI RefSeq
77	Paramt27	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001435405.1	NCBI RefSeq
78	Paramt28	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001438028.1	NCBI RefSeq
79	Paramt29	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001430212.1	NCBI RefSeq
80	Paramt30	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001445201.1	NCBI RefSeq
81	Paramt31	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001450132.1	NCBI RefSeq
82	Paramt32	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001424019.1	NCBI RefSeq
83	Paramt33	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001430323.1	NCBI RefSeq

84	Paramt34	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001438029.1	NCBI RefSeq
85	Stylo1	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW88224.1	GenBank
86	Stylo2	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW78331.1	GenBank
87	Stylo3	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW78622.1	GenBank
88	Stylo4	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW83245.1	GenBank
89	Stylo5	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW86413.1	GenBank
90	Stylo6	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW82972.1	GenBank
91	Stylo7	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW81684.1	GenBank
92	Stylo8	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW88937.1	GenBank
93	Stylo10	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW87516.1	GenBank
94	Stylo111	<i>Stylonychia lemnae</i>	CDW78731.1	GenBank
95	Tetrat1	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001022128.2	NCBI RefSeq
96	Tetrat2	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_012654668.1	NCBI RefSeq
97	Tetrat3	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001015043.2	NCBI RefSeq
98	Tetrat4	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001022123.2	NCBI RefSeq
99	Tetrat6	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001010839.2	NCBI RefSeq
100	Tetrat7	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_976857.2	NCBI RefSeq
101	Tetrat8	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_976859.2	NCBI RefSeq
102	Tetrat9	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001010833.2	NCBI RefSeq
STRAMENOPILES				
Bacillariophyta				
103	Thalap1	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	XP_002289136.1	NCBI RefSeq
Phaeophyta				
104	Ectocs1	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	CBJ26318.1	GenBank
Raphidophyceae				
105	Chatts1	<i>Chattonella subsula</i> CCMP2191	3660_1	MMETSP
106	Chatts2	<i>Chattonella subsula</i> CCMP2191	15938_1	MMETSP
107	Chatts3	<i>Chattonella subsula</i> CCMP2191	21045_1	MMETSP
108	Chatts4	<i>Chattonella subsula</i> CCMP2191	208558_1	MMETSP

109	Chatts5	<i>Chattonella subsula</i> CCMP2191	208266_1	MMETSP
110	Chatts6	<i>Chattonella subsula</i> CCMP2191	208985_1	MMETSP
Oomycota				
111	Albugc1	<i>Albugo candida</i>	CCI44742.1	GenBank
112	Albugc2	<i>Albugo candida</i>	CCI44287.1	GenBank
113	Albugc3	<i>Albugo candida</i>	CCI44953.1	GenBank
114	Albugl1	<i>Albugo laibachii</i>	CCA18882.1	GenBank
115	Albugl2	<i>Albugo laibachii</i>	CCA23261.1	GenBank
116	Albugl3	<i>Albugo laibachii</i>	CCA21894.1	GenBank
117	Aphana1	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009839617.1	NCBI RefSeq
118	Aphana2	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009832906.1	NCBI RefSeq
119	Aphana3	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009839619.1	NCBI RefSeq
120	Aphana4	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009832839.1	NCBI RefSeq
121	Aphana5	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009845434.1	NCBI RefSeq
122	Aphana6	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009823311.1	NCBI RefSeq
123	Aphana7	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009839618.1	NCBI RefSeq
124	Aphana8	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009845430.1	NCBI RefSeq
125	Aphana9	<i>Aphanomyces astaci</i>	XP_009839621.1	NCBI RefSeq
126	Aphani1	<i>Aphanomyces</i> <i>invadans</i>	XP_008874382.1	NCBI RefSeq
127	Aphani2	<i>Aphanomyces</i> <i>invadans</i>	XP_008874434.1	NCBI RefSeq
128	Aphani4	<i>Aphanomyces</i> <i>invadans</i>	XP_008866219.1	NCBI RefSeq
129	Aphani5	<i>Aphanomyces</i> <i>invadans</i>	XP_008861253.1	NCBI RefSeq
130	Aphani6	<i>Aphanomyces</i> <i>invadans</i>	XP_008861246.1	NCBI RefSeq
131	Phytoi1	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	XP_002902845.1	NCBI RefSeq
132	Phytoi2	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	XP_002906745.1	NCBI RefSeq
133	Phytoi3	<i>Phytophthora</i> <i>infestans</i>	XP_002897879.1	NCBI RefSeq
134	Phytop1	<i>Phytophthora</i> <i>parasitica</i>	ETM31623.1	GenBank
135	Phytop2	<i>Phytophthora</i> <i>parasitica</i>	ETI46994.1	GenBank
136	Phytop3	<i>Phytophthora</i> <i>parasitica</i>	XP_008907518.1	NCBI RefSeq
137	Phytop4	<i>Phytophthora</i>	XP_008902841.1	NCBI RefSeq

		<i>parasitica</i>		
138	Phytop5	<i>Phytophthora parasitica</i>	ETO61255.1	GenBank
139	Phytos1	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009533666.1	NCBI RefSeq
140	Phytos2	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009533629.1	NCBI RefSeq
141	Phytos3	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009533651.1	NCBI RefSeq
142	Phytos4	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009515830.1	NCBI RefSeq
143	Phytos5	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009520661.1	NCBI RefSeq
144	Phytos6	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009515784.1	NCBI RefSeq
145	Phytos7	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009533630.1	NCBI RefSeq
146	Phytos8	<i>Phytophthora sojae</i>	XP_009523036.1	NCBI RefSeq
147	Saprod1	<i>Saprolegnia diclina</i>	XP_008617256.1	NCBI RefSeq
148	Saprod2	<i>Saprolegnia diclina</i>	XP_008613137.1	NCBI RefSeq
149	Saprod3	<i>Saprolegnia diclina</i>	XP_008607900.1	NCBI RefSeq
150	Saprod4	<i>Saprolegnia diclina</i>	XP_008603782.1	NCBI RefSeq
151	Saprod5	<i>Saprolegnia diclina</i>	XP_008615211.1	NCBI RefSeq
152	Saprod6	<i>Saprolegnia diclina</i>	XP_008610030.1	NCBI RefSeq
153	Saprod7	<i>Saprolegnia diclina</i>	XP_008615216.1	NCBI RefSeq
154	Saprop1	<i>Saprolegnia parasitica</i>	XP_012205304.1	NCBI RefSeq
155	Saprop2	<i>Saprolegnia parasitica</i>	XP_012198411.1	NCBI RefSeq
156	Saprop4	<i>Saprolegnia parasitica</i>	XP_012196164.1	NCBI RefSeq
157	Saprop5	<i>Saprolegnia parasitica</i>	XP_012199523.1	NCBI RefSeq
158	Saprop6	<i>Saprolegnia parasitica</i>	XP_012194876.1	NCBI RefSeq
159	Saprop7	<i>Saprolegnia parasitica</i>	XP_012196160.1	NCBI RefSeq
RHIZARIA				
Cercozoa				
160	Lothag1	<i>Lotharella globoso</i> CCCM811	120725_1	MMETSP
161	Lothag2	<i>Lotharella globoso</i> CCCM811	121633_1	MMETSP
162	Plasmb1	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	CEP00345.1	GenBank
HACROBIA				
Haptophyta				
163	Chryss1	<i>Chrysochromulina sp.</i>	KOO23505.1	GenBank
164	Chryss2	<i>Chrysochromulina sp.</i>	KOO25755.1	GenBank
165	Gephyo1	<i>Gephyrocapsa</i>	2028_1	MMETSP

		<i>oceanica</i> RCC1303		
166	Gephyo2	<i>Gephyrocapsa oceanica</i> RCC1303	151358_1	MMETSP
167	Isochg1	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323	1047_1	MMETSP
168	Isochg2	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323	26711_1	MMETSP
169	Isochg3	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323	37836_1	MMETSP
170	Isochg4	<i>Isochrysis galbana</i> CCMP1323	107351_1	MMETSP
Cryptophyta				
171	Guillt1	<i>Guillardia theta</i>	XP_005827187.1	NCBI RefSeq
172	Guillt2	<i>Guillardia theta</i>	XP_005831410.1	NCBI RefSeq
173	Guillt3	<i>Guillardia theta</i>	XP_005833047.1	NCBI RefSeq
174	Guillt4	<i>Guillardia theta</i>	XP_005834581.1	NCBI RefSeq
175	Guillt5	<i>Guillardia theta</i>	XP_005828971.1	NCBI RefSeq
176	Guillt6	<i>Guillardia theta</i>	XP_005824876.1	NCBI RefSeq
177	Guillt7	<i>Guillardia theta</i>	XP_005840919.1	NCBI RefSeq
178	Guillt8	<i>Guillardia theta</i>	XP_005829415.1	NCBI RefSeq
179	Guillt9	<i>Guillardia theta</i>	XP_005822036.1	NCBI RefSeq
180	Guillt10	<i>Guillardia theta</i>	XP_005827163.1	NCBI RefSeq
ARHAEPLASTIDA				
Chlorophyta				
181	Bathyp1	<i>Bathycoccus prasinos</i>	XP_007508934.1	NCBI RefSeq
182	Bathyp2	<i>Bathycoccus prasinos</i>	XP_007515549.1	NCBI RefSeq
183	Chlamr1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001701446.1	NCBI RefSeq
184	Chlamr2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	BAH15384.1	GenBank
185	Chlamr3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001690493.1	NCBI RefSeq
186	Chlamr4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001691131.1	NCBI RefSeq
187	Chlamr5	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001692115.1	NCBI RefSeq
188	Chlamr6	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001692912.1	NCBI RefSeq
189	Chlorv1	<i>Chlorella variabilis</i>	XP_005847467.1	NCBI RefSeq
190	Microp1	<i>Micromonas pusilla</i>	XP_003062267.1	NCBI RefSeq
191	Microp2	<i>Micromonas pusilla</i>	XP_003056815.1	NCBI RefSeq
192	Microp3	<i>Micromonas pusilla</i>	XP_003060664.1	NCBI RefSeq
193	Microp4	<i>Micromonas pusilla</i>	XP_003062007.1	NCBI RefSeq

194	Microp5	<i>Micromonas pusilla</i>	XP_003058693.1	NCBI RefSeq
195	Micros1	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002508803.1	NCBI RefSeq
196	Micros2	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002502721.1	NCBI RefSeq
197	Micros3	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002507789.1	NCBI RefSeq
198	Micros4	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002503057.1	NCBI RefSeq
199	Micros5	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002504429.1	NCBI RefSeq
200	Micros6	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002504950.1	NCBI RefSeq
201	Micros7	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002508124.1	NCBI RefSeq
202	Micros8	<i>Micromonas sp.</i> RCC229	XP_002508756.1	NCBI RefSeq
203	Monom1	<i>Monoraphidium neglectum</i>	XP_013905746.1	NCBI RefSeq
204	Ostrel1	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	XP_001418450.1	NCBI RefSeq
205	Ostrel2	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	XP_001415426.1	NCBI RefSeq
206	Ostrel3	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	XP_001422214.1	NCBI RefSeq
207	Ostret1	<i>Ostreococcus tauri</i>	CEF98340.1	GenBank
208	Ostret2	<i>Ostreococcus tauri</i>	CEF97603.1	GenBank
209	Ostret3	<i>Ostreococcus tauri</i>	CEF96560.1	GenBank
210	Ostret4	<i>Ostreococcus tauri</i>	XP_003074718.1	NCBI RefSeq
211	Ostret5	<i>Ostreococcus tauri</i>	XP_003078817.1	NCBI RefSeq
212	Volvoc1	<i>Volvox carteri</i>	XP_002958358.1	NCBI RefSeq
213	Volvoc2	<i>Volvox carteri</i>	XP_002959193.1	NCBI RefSeq
214	Volvoc3	<i>Volvox carteri</i>	XP_002954479.1	NCBI RefSeq
EXCAVATA				
Euglenozoa				
215	Leishb1	<i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001564333.2	NCBI RefSeq
216	Leishi1	<i>Leishmania infantum</i>	XP_001468437.1	NCBI RefSeq
217	Leishm1	<i>Leishmania mexicana</i>	XP_003878633.1	NCBI RefSeq
218	Leptos1	<i>Leptomonas seymouri</i>	KPI83192.1	GenBank
219	Leptos2	<i>Leptomonas seymouri</i>	KPI89096.1	GenBank
220	Phytosp1	<i>Phytomonas sp.</i>	CCW67620.1	GenBank
221	Trypab1	<i>Trypanosoma brycei</i>	XP_822541.1	NCBI RefSeq

223	Trypac1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	EKF32800.1	GenBank
224	Trypac2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_819699.1	NCBI RefSeq
225	Trypag1	<i>Trypanosoma grayi</i>	XP_009306110.1	NCBI RefSeq
226	Trypag2	<i>Trypanosoma grayi</i>	XP_009308995.1	NCBI RefSeq
227	Trypar1	<i>Trypanosoma rangeli</i>	ESL05805.1	GenBank
228	Trypav1	<i>Trypanosoma vivax</i>	CCC51237.1	GenBank
APUSOZOA				
Apusomonadida				
229	Thecat1	<i>Thecamonas trahens</i>	XP_013760129.1	NCBI RefSeq
230	Thecat2	<i>Thecamonas trahens</i>	AMSG_03029.2	Origins of Multicellularity
231	Thecat3	<i>Thecamonas trahens</i>	AMSG_03189.2	Origins of Multicellularity
232	Thecat4	<i>Thecamonas trahens</i>	AMSG_05523.2	Origins of Multicellularity
233	Thecat5	<i>Thecamonas trahens</i>	AMSG_06300.2	Origins of Multicellularity
234	Thecat6	<i>Thecamonas trahens</i>	AMSG_06944.2	Origins of Multicellularity
235	Thecat7	<i>Thecamonas trahens</i>	AMSG_03287.2	Origins of Multicellularity
OPISTHOKONTA				
Metazoa (Na _v 1)				
236	AplyNav1	<i>Aplysia californica</i>	AAC47457.1	GenBank
237	BranNav1	<i>Branchiostoma floridae</i>	AEX00069.1	GenBank
238	DrosNav1	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAB59195.1	GenBank
239	HaloNav1	<i>Halocynthia roretzi</i>	BAA04133.1	GenBank
240	HomoNav1	<i>Homo sapiens</i>	NP_001189364.1	NCBI RefSeq
241	MusmNav1	<i>Mus musculus</i>	NM_133199.2	NCBI RefSeq
Metazoa (Na _v 2)				
242	BranNav2	<i>Branchiostoma floridae</i>	AEX00068.1	GenBank
243	CyanNav	<i>Cyanea capillata</i>	AAA75572.1	GenBank
244	DrosNav2	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9W0Y8.5	UniProtKB/Swiss-Prot
245	ExaiNav	<i>Exaiptasia pallida</i>	AAB96953.1	GenBank
246	HaloNav2	<i>Halocynthia roretzi</i>	BAA95896.1	GenBank
247	MnemNav	<i>Mnemiopsis leidyi alfa</i>	AEF59085.1	GenBank
248	NemaNav2	<i>Nematostella vectensis</i>	AEX00070.1	GenBank

249	PolyNav	<i>Polyorchis penicillatus</i>	AAC38974.1	GenBank
250	StroNav2	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_001189610.1	NCBI RefSeq
251	TricNav2	<i>Trichoplax adhaerens</i>	AEX00065.1	GenBank
Choanoflagellata (Na _v)				
252	MonoNav	<i>Monosiga brevicollis</i>	AEF59076.1	GenBank
Metazoa (HVA Ca _v : Ca _v 1)				
253	CyanCavL	<i>Cyanea capillata</i>	AAC63050.1	GenBank
254	DrosCavL	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAA81883.1	GenBank
255	HaloCavL	<i>Halocynthia roretzi</i>	BAA34927.2	GenBank
256	HomoCavL	<i>Homo sapiens</i>	Q13936.4	UniProtKB/Swiss-Prot
257	StylCavL	<i>Stylophora pistillata</i>	AAD11470.1	GenBank
Metazoa (HVA Ca _v : Ca _v 2)				
258	ApisCav2	<i>Apis mellifera</i>	XP_006558026.1	NCBI RefSeq
259	CaenCav2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	WP:CE31225	WormBase
260	HomoCavN	<i>Homo sapiens</i>	NP_000709.1	NCBI RefSeq
261	HomCavPQ	<i>Homo sapiens</i>	NP_001167551.1	NCBI RefSeq
262	HomoCavR	<i>Homo sapiens</i>	NP_001192222.1	NCBI RefSeq
263	SchiCav2	<i>Schistosoma mansoni</i>	AAK84313.1	GenBank
Choanoflagellata (HVA Ca _v)				
264	SalpCavL	<i>Salpingoeca rosetta</i>	PTSG_09464.1	Origins of Multicellularity
Metazoa (LVA Ca _v)				
265	CaenCavT	<i>Caenorhabditis elegans</i>	WP:CE36117	WormBase
266	DrosCavT	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001096889.1	NCBI RefSeq
267	HomoCavT	<i>Homo sapiens</i>	O95180.4	UniProtKB/Swiss-Prot
268	LymnCavT	<i>Lymnaea stagnalis</i>	AAO83843.2	GenBank
Metazoa (NALCN)				
269	CaeNALCN	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_741413.2	NCBI RefSeq
270	DroNALCN	<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_727772.2	NCBI RefSeq
271	HomNALCN	<i>Homo sapiens</i>	NP_443099.1	NCBI RefSeq
272	NemNALCN	<i>Nematostella vectensis</i>	XP_001637238.1	NCBI RefSeq
Fungi (Cch)				

273	AspeCCh	<i>Aspergillus niger</i>	EHA17962.1	GenBank
274	PeniCCh	<i>Penicillium brasilianum</i>	CEO58800.1	GenBank
275	PseuCCh	<i>Pseudozyma antarctica</i>	XP_014654795.1	NCBI RefSeq
276	SaccCCh	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_011733.3	NCBI RefSeq
277	TrichCCh	<i>Trichosporon oleaginosus</i>	KLT42032.1	GenBank

Таблица 2. Идентификация гомологов различных семейств суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов в транскриптомах десяти видов динофлагеллят. При поиске гомологов использовались транскрипты из базы данных MMETSP.

Семейство ионных каналов	Gonyaulacales		Peridini- ales	Dinotrichales		Suessiales	Prorocent- rales	Gymnodiniales		Oxyrrhi- ales
	<i>Alexand- rium tamarense</i>	<i>Lingulodi- nium polyedra</i>	<i>Scrippsi- ella trochoid- dea</i>	<i>Kryptope- ridinium foliaceum</i>	<i>Crypthe- codiniu m cohnii</i>	<i>Symbiodi- nium sp.</i>	<i>Prorocen- trum minimum</i>	<i>Amphidi- nium carterae</i>	<i>Kare- nia brevis</i>	<i>Oxyrrhis marina</i>
K _{ir}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K _{2p}	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
K _v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K _v (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
K _{Ca}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HCN/CNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HCN/CNG (2)	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
TRPV	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
TRPP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TPC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ЧД ПКК	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H _v	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-

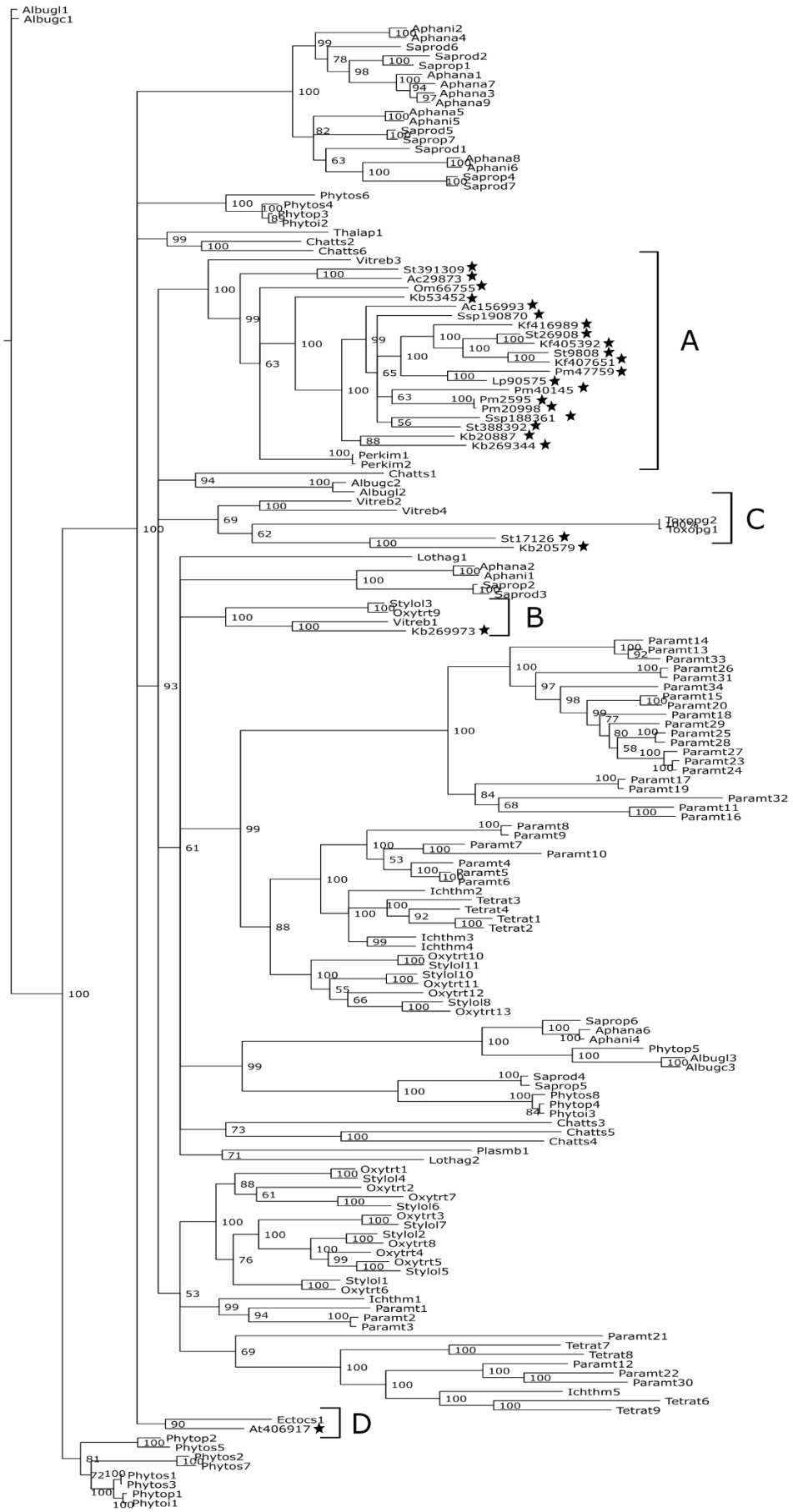


Рисунок 1. Филограмма семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенная методом максимального правдоподобия (LG + F + G). А, В, С, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения бутстреп в процентах. Масштабная линейка 0,4 замены на сайт.

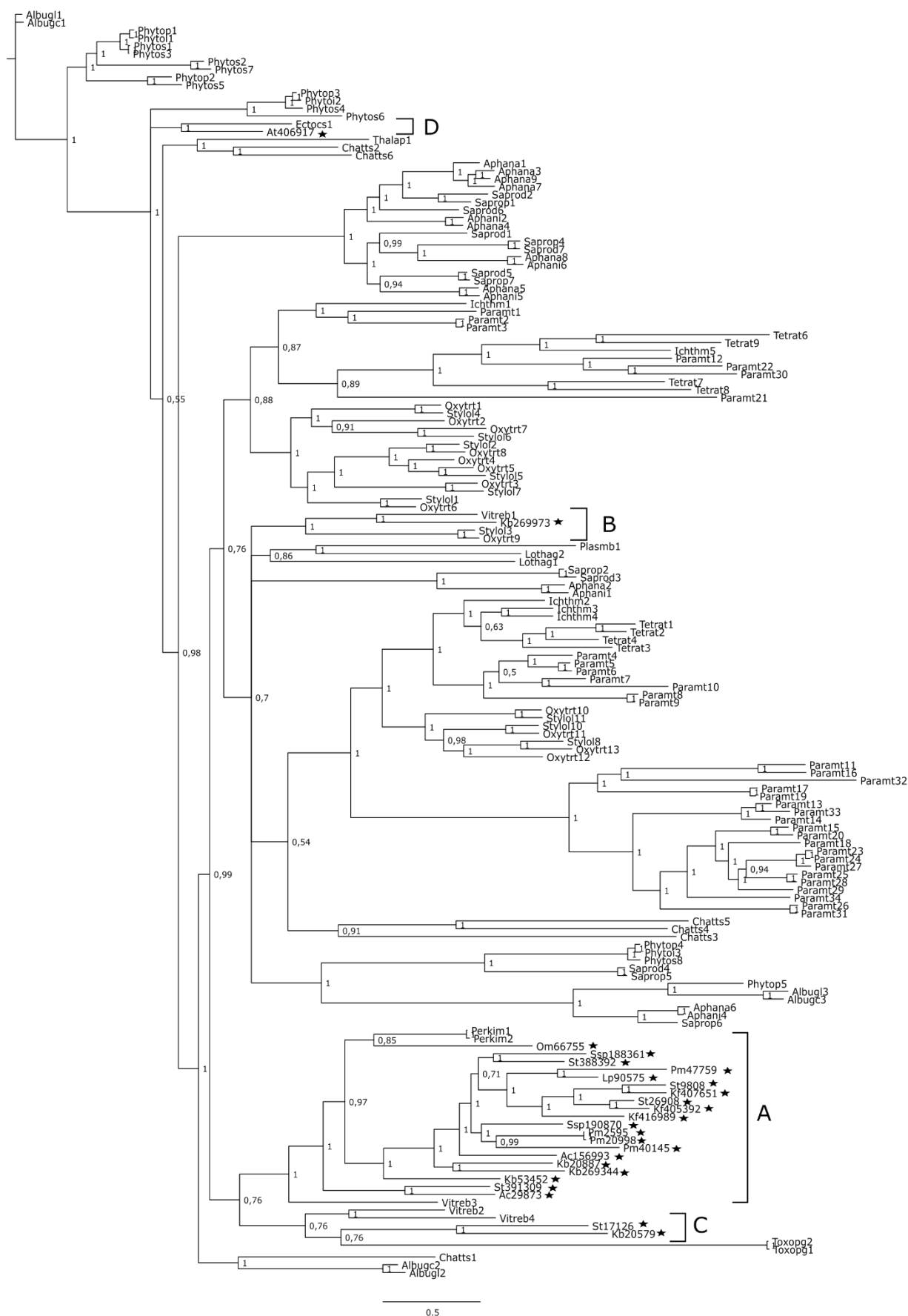


Рисунок 2. Филограмма семейства ЧД ПКК супергруппы SAR, построенная с помощью байесовского анализа (LG + F + G). A, B, C, D – кластеры,

содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения апостериорных вероятностей. Масштабная линейка 0,5 замены на сайт.



Рисунок 3. Филогенетическая диаграмма семейства ЧД ПКК различных групп эукариот,

построенная методом максимального правдоподобия (LG + F + G). A, B, C, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения бутстреп в процентах. Масштабная линейка 0,3 замены на сайт.

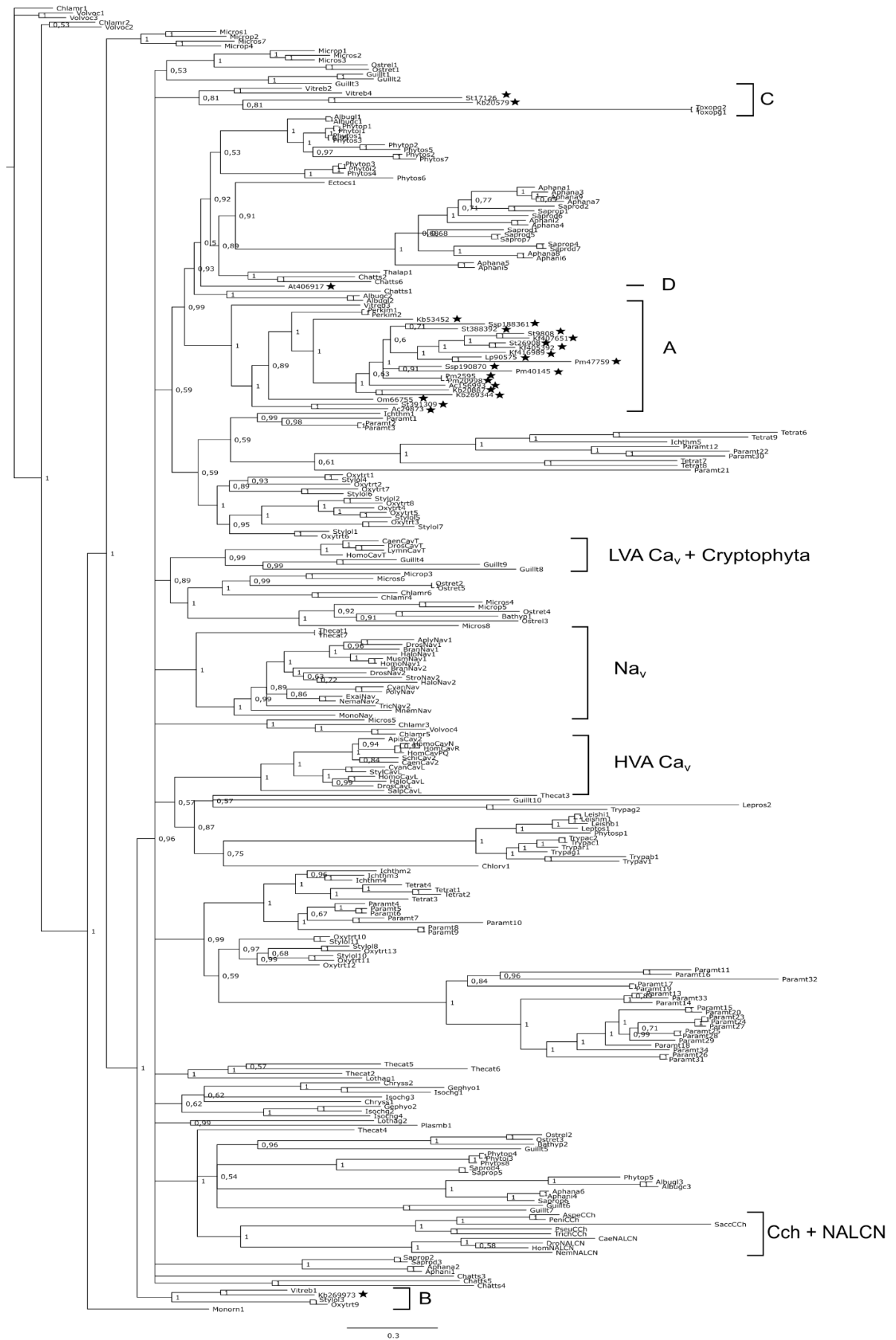


Рисунок 4. Филограмма семейства ЧД ПКК, построенная с помощью байесовского анализа (LG + F + G). А, В, С, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения апостериорных вероятностей. Масштабная линейка 0,3 замены на сайт.

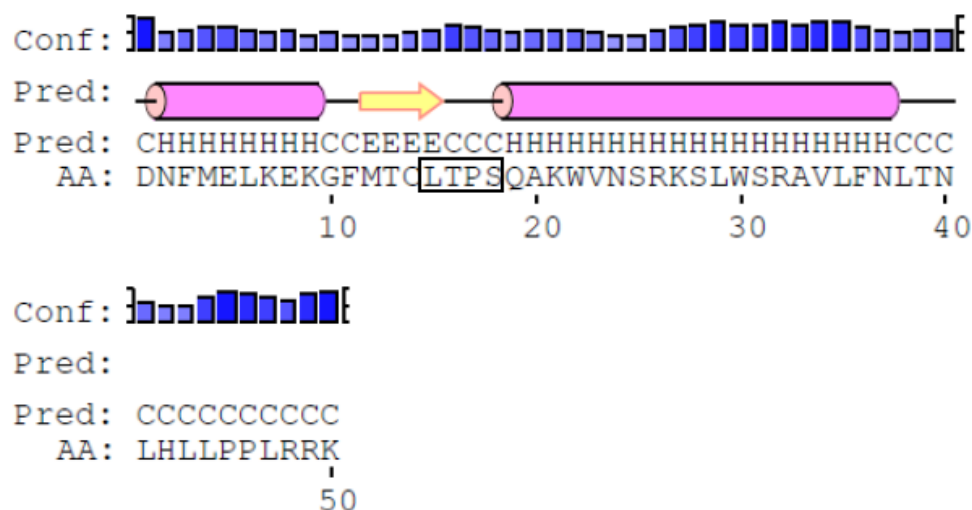


Рисунок 5. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Amphidinium carterae* Ac156993.



Рисунок 6. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Karenia brevis* Kb269344.

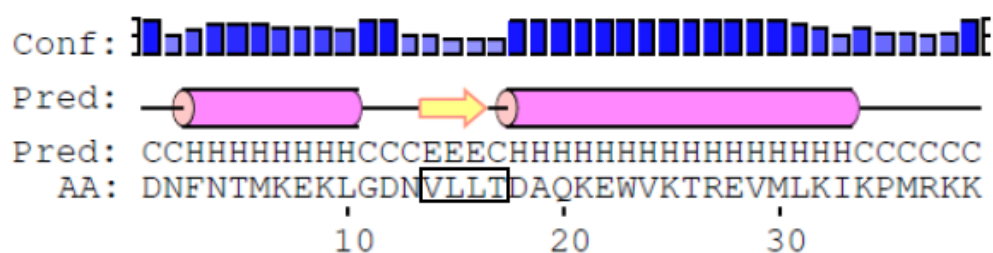


Рисунок 9. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Alexandrium tamarense* At406917.



Рисунок 10. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Karenia brevis* Kb20887.



Рисунок 11. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Karenia brevis* Kb269973.



Рисунок 12. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Karenia brevis* Kb20579.

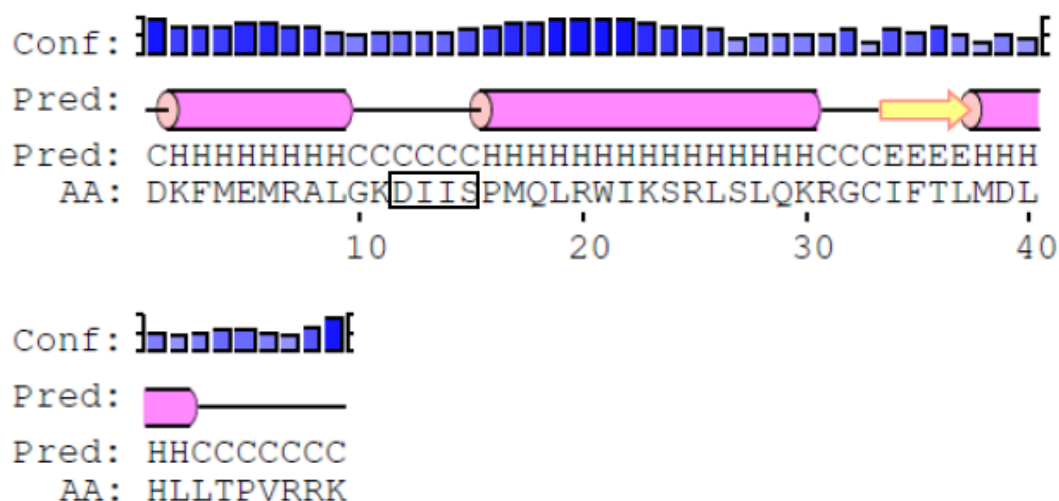


Рисунок 13. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Kryptoperidinium foliaceum* Kf407651.

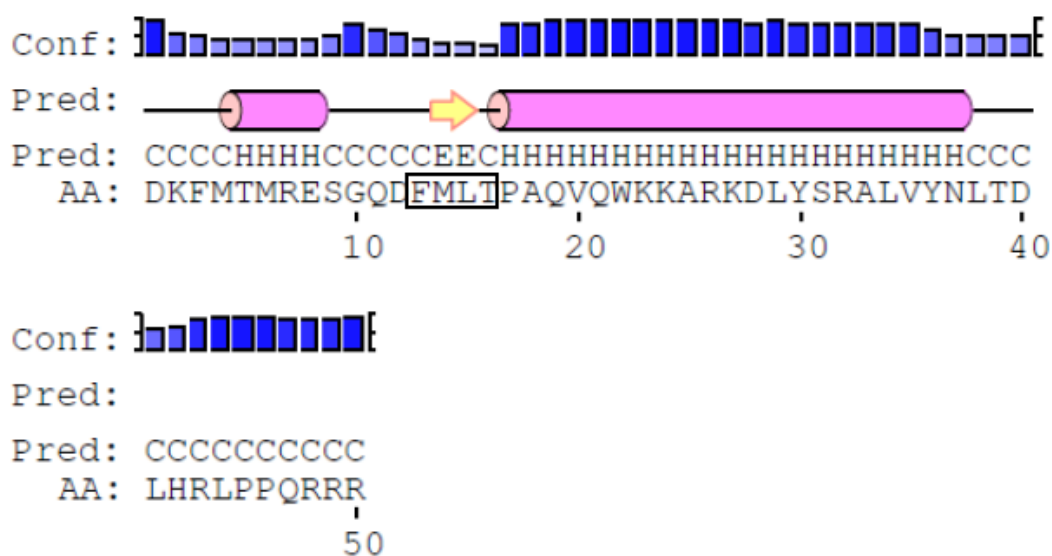


Рисунок 14. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Kryptoperidinium foliaceum* Kf416989.

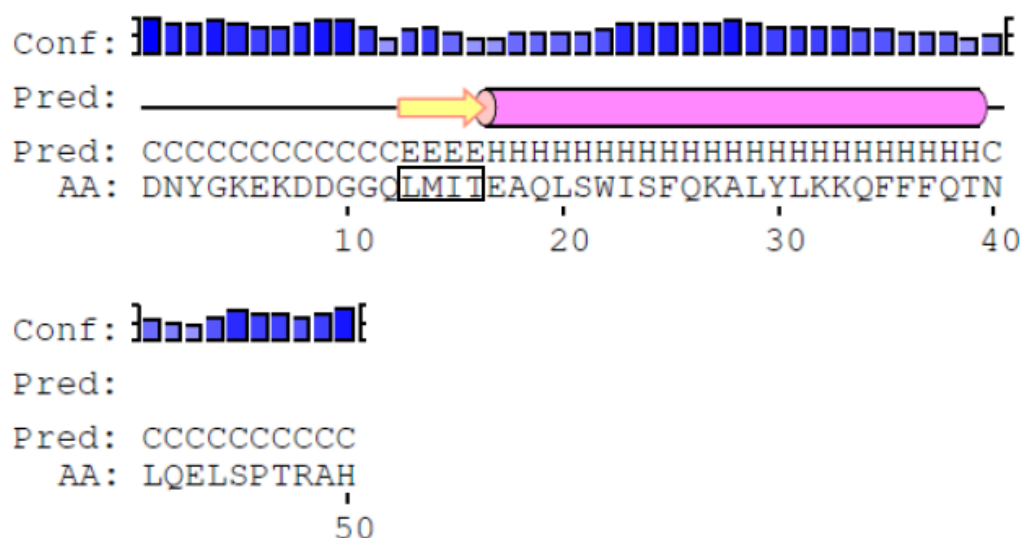


Рисунок 19. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Scrippsiella trochoidea* St391309.



Рисунок 20. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Scrippsiella trochoidea* St17126.

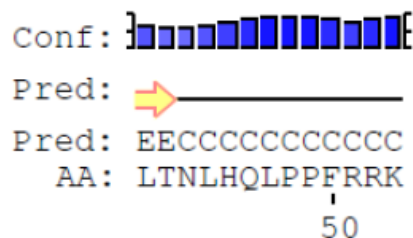


Рисунок 21. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Kryptoperidinium foliaceum* Kf405392.

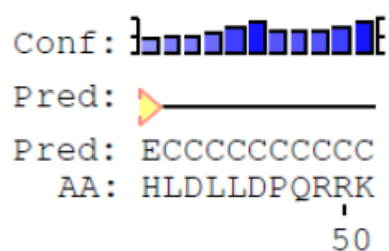


Рисунок 22. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Scrippsiella trochoidea* St26908.



Рисунок 23. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Amphidinium carterae* Ac29873.



Рисунок 24. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у четырехдоменного потенциал-управляемого катионного канала *Scrippsiella trochoidea* St9808.