

*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**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург**

**2016**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук  
**Скарлато Сергей Орестович**  
главный научный сотрудник  
Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор  
**Крутецкая Зоя Иринарховна**  
заведующая кафедрой биофизики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

доктор биологических наук  
**Фролов Александр Олегович**  
главный научный сотрудник Лаборатории по изучению паразитических червей и протистов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологического института Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «23» декабря 2016 г. в 12 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Адрес электронной почты института: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru)

Факс института: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте <http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Ионные каналы – это трансмембранные белковые комплексы, опосредующие пассивный транспорт ионов через мембрану. Они вовлечены во все важнейшие процессы жизнедеятельности клетки: передачу сигналов, раздражимость, 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 (Sembella, 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 (Neil 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.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов, их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы (156 источников, из них 144 на иностранном языке) и приложения. Работа изложена на 197 страницах, иллюстрирована 72 рисунками и 5 таблицами. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 12-04-31952-мол\_а и № 13-04-00703-а) и Российского научного фонда (грант № 16-14-10116).

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы его цель и задачи, приводятся основные положения, выносимые на защиту, научная новизна работы, теоретическая и практическая значимость, сведения о личном вкладе автора, апробации работы и количестве публикаций по теме диссертации.

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе изложены особенности морфологии и физиологии динофлагеллят. Особое внимание уделено критическому анализу литературных данных о строении покровов динофлагеллят и их смене в ходе жизненного цикла. Также в настоящей главе приведены современные сведения о потенциал-управляемых катионных каналах эукариот, эволюции четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов и об ионных каналах динофлагеллят.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы культура динофлагеллят *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller и базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей эукариот.

**Экспериментальная работа** выполнена на культуре *P. minimum*, изолированной из Черного моря. Клетки культивировали в среде f/2 (Guillard, Ryther, 1962) с соленостью 17 ‰ при комнатной температуре и режиме освещения 12 ч день : 12 ч ночь, интенсивность освещения составляла 50 мкмоль фотонов  $\times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ .

**Для биоинформатического анализа использовали следующие базы данных (БД):** 1) БД аннотированных нуклеотидных последовательностей и их аминокислотных продуктов «GenBank» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 2) избыточная БД нуклеотидных последовательностей и их аминокислотных продуктов «RefSeq» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), 3) БД секвенированных геномов и белковых продуктов протистов «Origins of Multicellularity» ([https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/multicellularity\\_project/MultiHome.html](https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/multicellularity_project/MultiHome.html)), 4) избыточная аннотированная белковая БД «UniProtKB/SwissProt» (<http://www.uniprot.org/>), 5) БД геномов и белковых продуктов нематод «WormBase» (<http://www.wormbase.org/#01-23-6>), 6) транскрипированные транскриптомы БД проекта «Marine Microbial Eukaryotic Transcriptome Sequencing Project» (MMETSP; <http://data.imicrobe.us/project/view/104>, Combined Assemblies): транскриптомы *Alexandrium-tamarensis*-CCMP1771, *Amphidinium-carterae*-CCMP1314, *Chattonella-subsula*-CCMP2191, *Cryptocodinium-cohnii*-Seligo, *Gephyrocapsa-oceanica*-RCC1303, *Isochrysis-glabana*-CCMP1323, *Karinia-brevis*-CCMP2229, *Kryptoperidinium-foleaceum*-CCMP1326, *Lingulodinium-polyedra*-CCMP1738, *Lotharella-globosa*-CCCM811, *Oxyrrhis-marina*-LB1974, *Prorocentrum-minimum*-CCMP1329, *Prorocentrum-minimum*-CCMP2233, *Scrippsiella-trochoidea*-CCMP3099, *Symbiodinium*-sp.-Mr.

**Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей** потенциал-управляемых катионных каналов (ПКК) производили с помощью алгоритма BLASTP. В качестве последовательностей запроса использовали аминокислотные последовательности ПКК человека из БД белковых последовательностей NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). В случае поиска гомологов четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов (ЧД ПКК) в различных группах эукариот результаты первичного поиска были использованы в качестве повторного запроса. Параметр E-value для всех выбранных результатов запроса  $\leq 10^{-10}$ .

**Для филогенетического анализа ЧД ПКК** были отобраны аминокислотные последовательности, содержащие четыре домена, индексируемых БД консервативных белковых доменов Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) как домены pfam00520, 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. Были сформированы два массива данных: 1) массив, включающий 277 последовательностей ЧД ПКК различных групп эукариот и 2) массив, включающий 162 последовательности ЧД ПКК организмов из супергруппы SAR (Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria). Оба массива данных использовали при множественном выравнивании в программе MAFFT 7 (Katoh, Standley, 2013). Наименее консервативные

участки удаляли с помощью алгоритма GUIDANCE 2 (Sela et al., 2015). Филогенетический анализ проводили методами максимального правдоподобия (ML) с помощью GARLI 2.1 (Bazin et al., 2014) и байесовского анализа (BA) в программе MrBayes 3.2.5 (Ronquist et al., 2012) с использованием эволюционной модели LG+F+G. Бутстреп анализ проводили путем построения 1000 альтернативных деревьев. Полученные деревья визуализировали с помощью программы FigTree 1.4.2. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

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

**Экдизис** клеток *P. minimum* индуцировали центрифугированием при 10000 g в течение 5 мин.

**Сферопласты** *P. minimum* получали с помощью обработки клеток 2,6-дихлорбензонитрилом (ДХБ), растворенным в ДМСО, в концентрации 50–300 мкМ.

**Подсчет нативных 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.

**Микрофотографии** клеток и сферопластов получали с помощью методов дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) и флуоресцентной микроскопии. Для окраски целлюлозы использовали флуоресцентный краситель Calcofluor White M2R (CFW, Sigma, USA). Окрашенные клетки изучали с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) в ультрафиолетовом свете (длина волны возбуждения – 365 нм, эмиссия – 445–450 нм). В микроскопических исследованиях в качестве стандартов использовали флуоресцентные шарики Flow-Check™ fluorospheres (Beckman Coulter, USA). Полученные изображения анализировали в программе ImageJ (Rasband, 2013). Уровень флуоресценции окрашенных клеток и флуоресцентных шариков рассчитывали по формуле:  $F = ID - (A \times MFB)$ , где  $F$  – уровень флуоресценции клеток или шариков,  $ID$  – интегрированная плотность,  $A$  – площадь клетки или шарика,  $MFB$  – средняя флуоресценция фона. Относительную флуоресценцию рассчитывали как отношение среднего уровня флуоресценции клеток к среднему уровню флуоресценции шариков в данном образце.

**Электрофизиологические исследования.** Трансмембранные токи регистрировали с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments/Molecular Devices, USA) с фильтром нижних частот (2 кГц). Сигнал оцифровывали на 5 кГц с помощью аналого-цифрового преобразователя. Данные обрабатывали в пакете программ pClamp10 (Axon Instruments/Molecular Devices, USA) и Origin 6.1 (OriginLab Corp., USA). 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. Регистрацию активности одиночных ионных каналов проводили в конфигурациях «cell-

attached» (клетка прикреплена) и «inside-out» (наружная сторона мембраны внутри пипетки). В зависимости от эксперимента использовали следующие растворы камеры: «240KCl»<sub>к</sub> (240 мМ KCl, 5 мМ Hepes/Tris, pH 7,2), «240KAsp»<sub>к</sub> (240 мМ KAsp, 5 мМ Hepes/Tris, pH 7,2), «120K/120NaAsp»<sub>к</sub> (120 мМ KAsp, 120 мМ NaAsp, 5 мМ Hepes/Tris, pH 7,2), «60K/180NaAsp»<sub>к</sub> (60 мМ KAsp, 180 мМ NaAsp, 5 мМ Hepes/Tris, pH 7,2). В зависимости от эксперимента раствор микропипетки имел следующий состав: «240NaCl»<sub>п</sub>: (240 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ Hepes/Tris, pH 7,2), «240KAsp»<sub>п</sub>: (240 мМ KAsp, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ 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.

## ГЛАВЫ 3 и 4. РЕЗУЛЬТАТЫ и ОБСУЖДЕНИЕ

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

Анализ транслированных транскриптомов десяти видов динофлагеллят выявил аминокислотные последовательности, гомологичные большинству известных к настоящему времени типов ионных каналов из суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов (табл. 1) (Поздняков, Скарлато, 2015; Pozdnyakov et al. 2015). К их числу относятся: 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).

Среди представителей семейств  $K_v$  и HCN/CNG обнаружены необычные удвоенные последовательности (Поздняков, Скарлато, 2015). Наличие таких последовательностей в транскриптоме может быть как следствием ошибки сборки транскриптома, так и результатом действительно произошедшей дубликации предкового гена. Однако ошибка сборки транскриптома маловероятна, поскольку удвоенные последовательности каналов  $K_v$  и HCN/CNG были выявлены в девяти и пяти независимо собранных транскриптомах, соответственно.

Таблица 1. Результаты идентификации гомологов различных семейств суперсемейства потенциал-управляемых катионных каналов в транскриптомах десяти видов динофлагеллят.

Семейство ионных каналов	Gonyaulacales		Peridini- ales	Dinotrichales		Suessiales	Prorocen- trales	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 <sub>ir</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K <sub>2P</sub>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
K <sub>v</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K <sub>v</sub> (2)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
K <sub>Ca</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HCN/CNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HCN/CNG (2)	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
TRPV	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
TRPP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TPC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ЧД ПКК	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>v</sub>	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-

Кроме того, BLAST анализ белковой и нуклеотидной базы NCBI выявил гомологичные удвоенные последовательности каналов HCN/CNG у нескольких видов оомицет.

Представители всех перечисленных выше семейств ПКК были выявлены не в каждом из проанализированных транскриптомов. Так, среди последовательностей двух транскриптомов модельного объекта *P. minimum* не было обнаружено последовательностей каналов семейства K<sub>2P</sub>, однако такие последовательности были идентифицированы в транскриптомах девяти других видов динофлагеллят (Поздняков, Скарлато, 2015). 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.

### Филогенетический анализ четырехдоменных потенциал-управляемых катионных каналов динофлагеллят

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 эукариот SAR, включая 24 последовательности динофлагеллят (Pozdnyakov, Skarlato, 2015; Pozdnyakov et al., 2016;). Реконструкция филогении ЧД ПКК внутри SAR с помощью метода максимального правдоподобия (ML) и байесовского анализа (BA) дала схожие топологии деревьев, различающиеся лишь в узлах с низкой статистической поддержкой, где значения бутстреп и апостериорной вероятности составляют <62 % и <0,95, соответственно (рис. 1, 2). Последовательности

ЧД ПКК динофлагеллят распределились в четыре группы, которые были обозначены как А, В, С и D (рис. 3, 4).

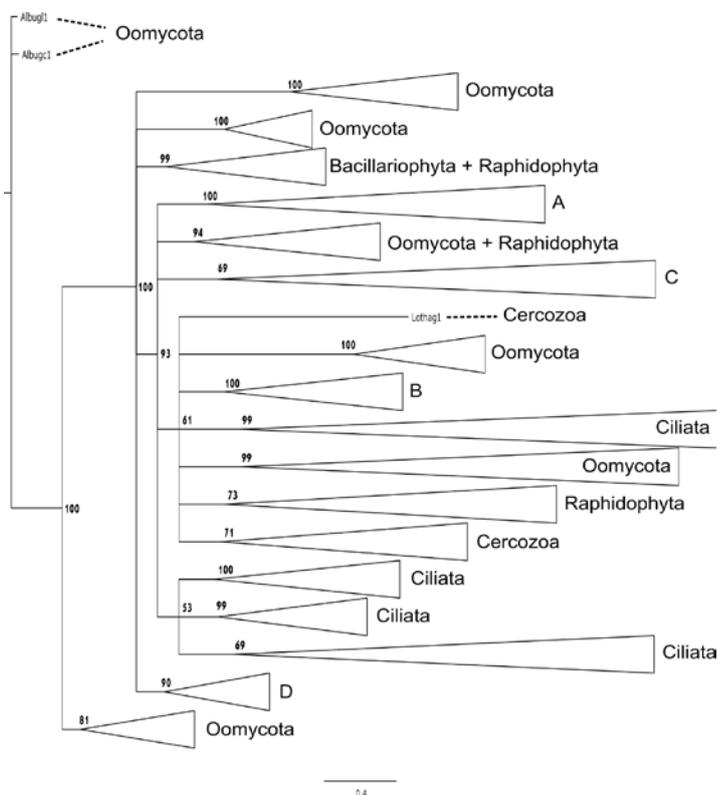


Рисунок 1. Сжатая филограмма ЧД ПКК супергруппы SAR, построенная методом максимального правдоподобия (LG + F + G). А, В, С, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения бутстреп в процентах. Масштабная линейка: 0,4 замены на сайт.

Большинство (20 из 24) последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят объединились в кластер А (рис. 3), куда также вошли некоторые последовательности ЧД ПКК представителей других близкородственных динофлагеллятам групп эукариот: Perkinsozoa и Chromerida. Кроме того, кластер А может быть разделен на две подгруппы А1 и А2, которые представляют собой две линии паралогов.

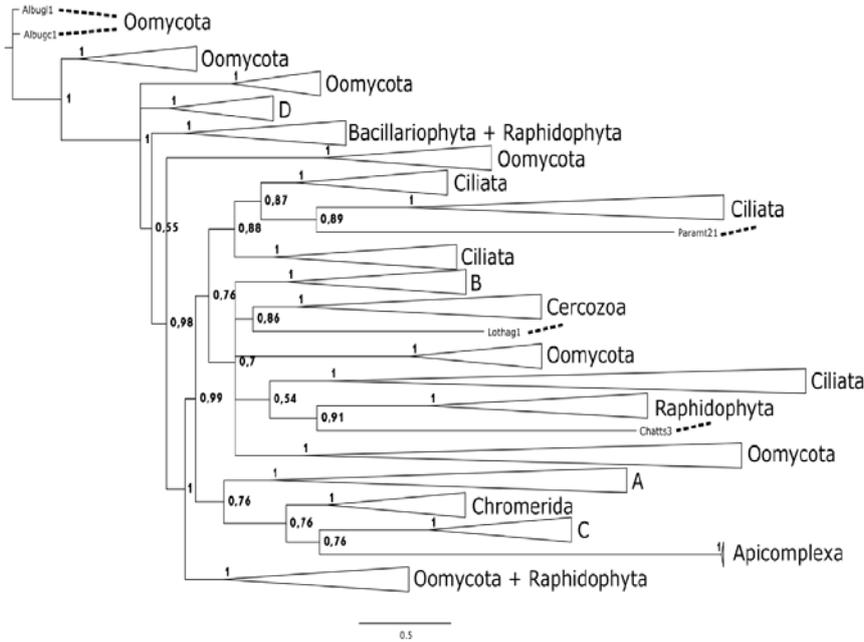


Рисунок 2. Сжатая филограмма ЧД ПКК супергруппы SAR, построенная с помощью байесовского анализа (LG + F + G). A, B, C, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах обозначены значения апостериорных вероятностей. Масштабная линейка: 0,5 замены на сайт.

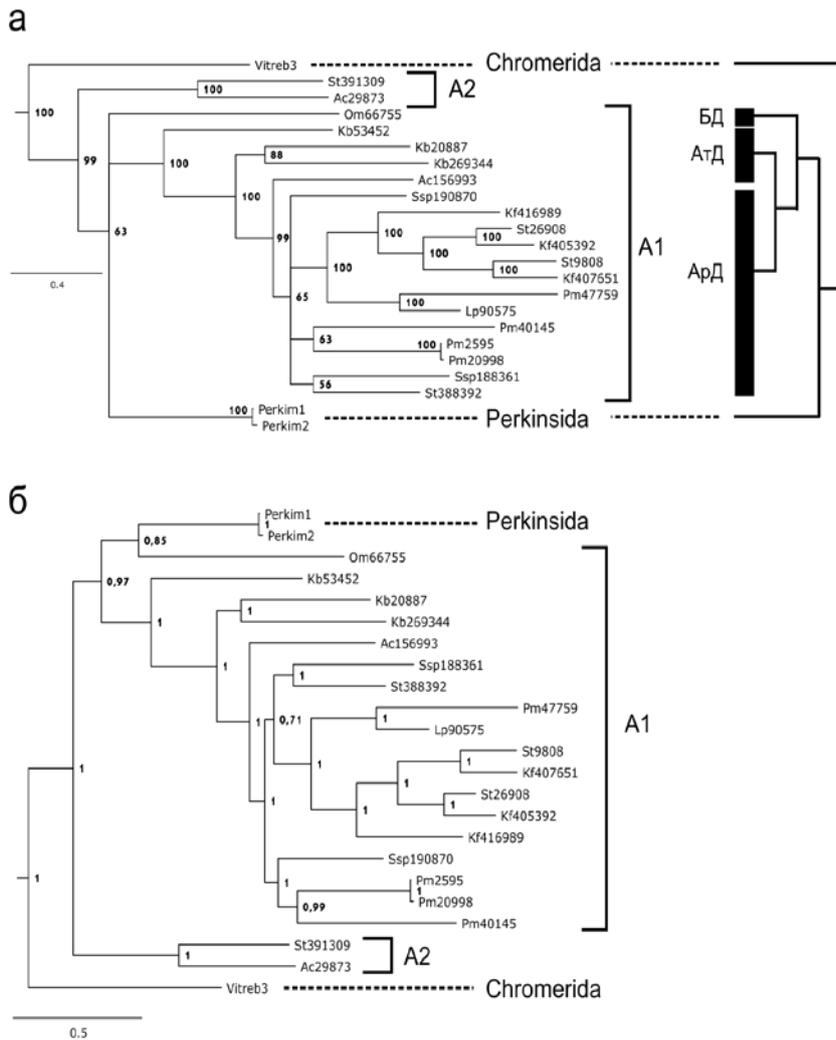


Рисунок 3. Фрагменты филограмм ЧД ПКК супергруппы SAR (кластер A), построенных методом максимального правдоподобия (а) и с помощью байесовского анализа (б). A1, A2 – подгруппы в кластере A. Справа показана схема последовательности обособления некоторых групп Alveolata и групп динофлагеллят в эволюции. 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 *Perkinsus 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 (рис. 3).

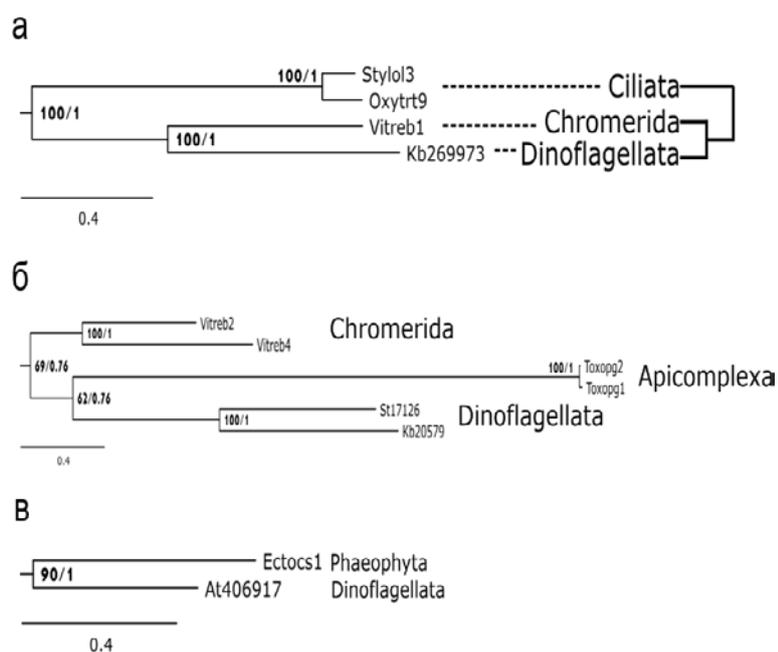


Рисунок 4. Фрагменты филограммы ЧД ПКК супергруппы SAR, построенной методом максимального правдоподобия. а – кластер В, показана схема последовательности обособления указанных групп Alveolata в эволюции; б – кластер С; в – кластер D. В узлах приведены значения бутстреп в процентах и апостериорных вероятностей. Масштабные линейки: 0,4 замены на сайт.

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  $Sch$ ), 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 методами ML (рис. 5) и ВА (рис. 6). Последовательности ЧД ПКК динофлагеллят распределились в те же четыре группы А, В, С 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  $Sch$ . Таким образом, динофлагелляты обладают по крайней мере четырьмя филогенетически обособленными группами ЧД ПКК.

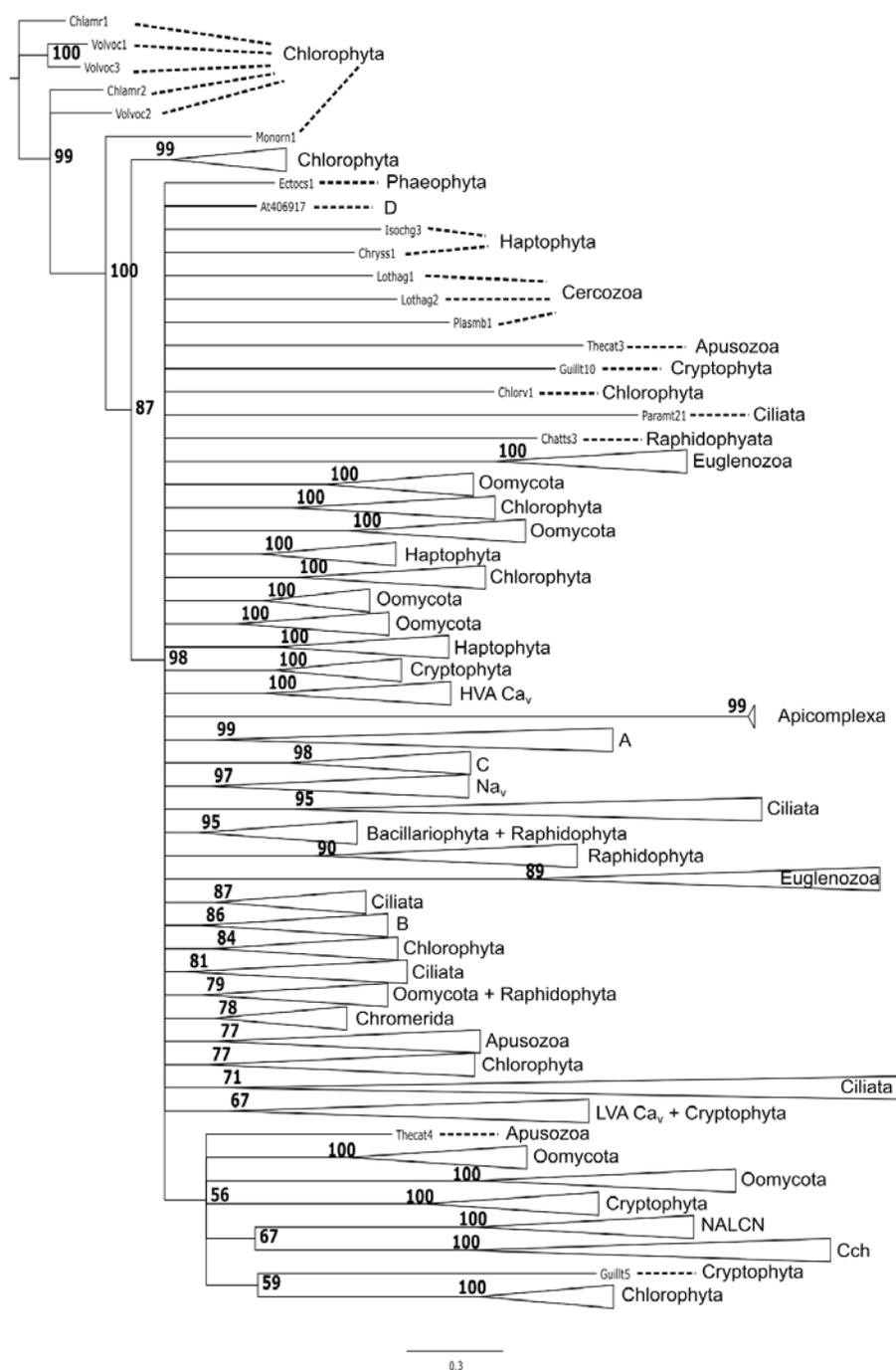


Рисунок 5. Сжатая филограмма ЧД ПКК различных групп эукариот, построенная методом максимального правдоподобия (LG + F + G). А, В, С, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах приведены значения бутстреп в процентах. Масштабная линейка: 0,3 замены на сайт.

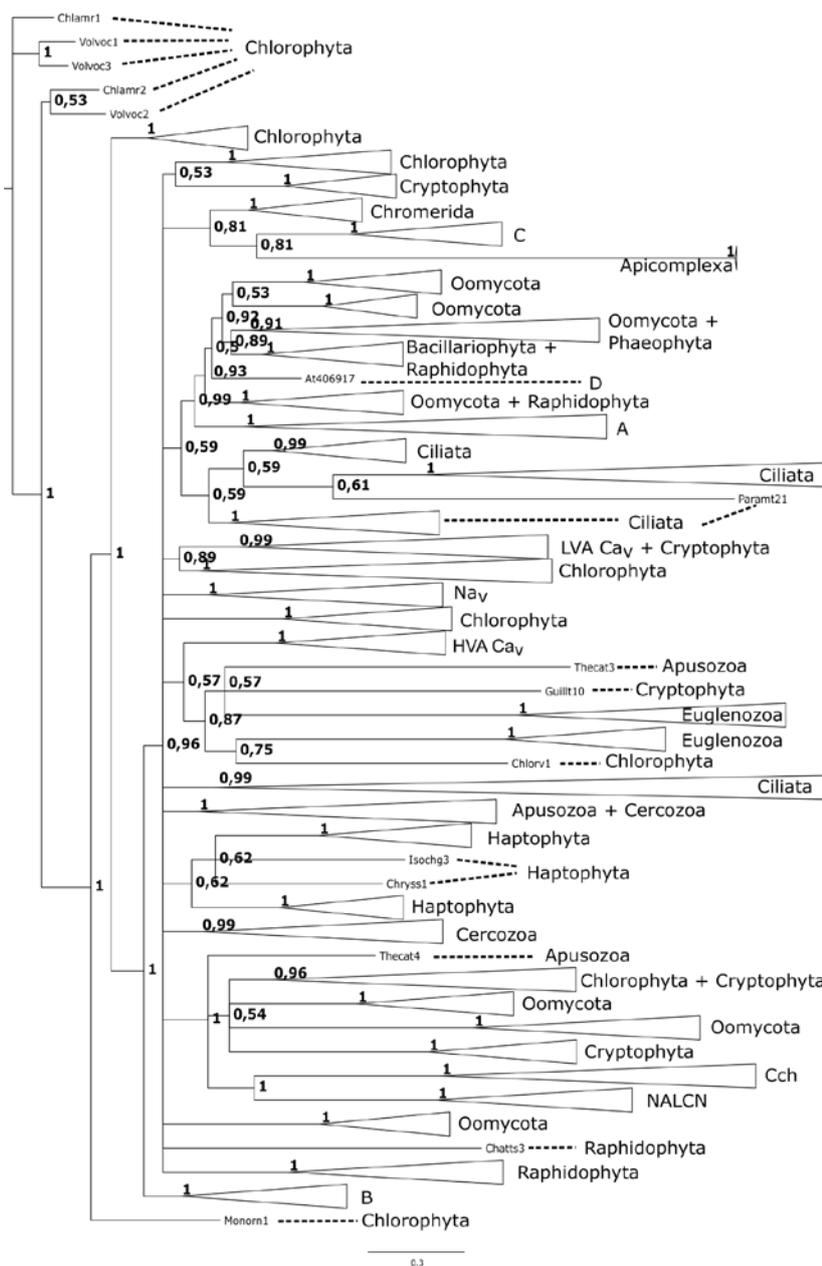


Рисунок 6. Сжатая филограмма ЧД ПКК различных групп эукариот, построенная с помощью байесовского анализа (LG + F + G). А, В, С, D – кластеры, содержащие аминокислотные последовательности ЧД ПКК динофлагеллят. В узлах приведены значения апостериорных вероятностей. Масштабная линейка: 0,3 замены на сайт.

### 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 представление о возможных функциональных особенностях ЧД ПКК динофлагеллят, был предпринят биоинформатический анализ первичной и вторичной структуры нескольких функционально значимых участков этих каналов, а именно: селективного фильтра, сегментов S4 и участка инактивационных ворот (табл. 2) (Pozdnyakov et al., 2016; Pozdnyakov, Skarlato, 2016).

Таблица 2. Обобщенные данные о структуре функционально значимых участков (селективных фильтров, сегментов S4, участков, гомологичных области инактивационных ворот каналов  $Na_v$ , и обрамляющих их вторичных структур) ЧД ПКК динофлагеллят в соответствии с их филогенетической кластеризацией. 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;  $\alpha$  – альфа-спираль;  $\beta$  – 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	<b>FCLT</b>	н/о
		Kb20887	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>VMLT</b>	**** $\alpha$
		Kb269344	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>FLLT</b>	н/о
		Kb53452	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>SLLT</b>	н/о
		Kf405392	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>YLLT</b>	$\alpha$ **** $\alpha$
		Kf407651	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>DIIS</b>	**** $\alpha$
		Kf416989	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>FMLT</b>	**** $\alpha$
		Lp90575	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>QTVS</b>	**** $\alpha$
		Om66755	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>IWAI</b>	**** $\alpha$
		Pm40145	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>LKLT</b>	**** $\alpha$
		Pm47759	E/E/E/E	x/v/v/x	<b>GMLT</b>	**** $\alpha$
		Pm20998	E/E/E/E	-/v/v/v	<b>IMST</b>	вставка, **** $\alpha$
		Pm2595	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>IMST</b>	вставка, **** $\alpha$
		St9808	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>DIIS</b>	**** $\beta$
		St26908	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>VLLS</b>	$\alpha$ ****
		St388392	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>LMLT</b>	**** $\alpha$
		Ssp188361	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>ILLT</b>	н/о
	Ssp190870	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>VMLT</b>	**** $\alpha$	
A2	Ac29873	E/E/E/E	x/v/v/v	<b>YLMT</b>	**** $\beta$	
	St391309	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>LMIT</b>	**** $\alpha$	
B	Kb269973	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>LVLIT</b>	**** $\alpha$	
C	Kb20579	E/E/E/E	v/v/v/v	<b>EMSS</b>	**** $\alpha$	
	St17126	E/Q/E/E	v/v/v/v	<b>DLID</b>	**** $\alpha$	
D	At406917	E/E/E/E	-/v/v/v	<b>VLLT</b>	**** $\alpha$	

### Структура селективного фильтра

Селективные фильтры 23 из 24 рассмотренных в работе последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят имеют вид E/E/E/E (по одному остатку глутамата из каждого домена). Известно, что ЧД ПКК с таким фильтром обладают селективностью в отношении ионов кальция различной степени выраженности (Verret et al., 2010). 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 (табл. 2). Подобный селективный фильтр имеют кальциевые каналы подсемейства Csch. Таким образом, идентифицированные ЧД ПКК динофлагеллят обладают селективным фильтром, характерным для кальциевых каналов.

### Структура сегментов S4

С помощью множественных выравниваний идентифицированных аминокислотных последовательностей ЧД ПКК девяти видов динофлагеллят с аминокислотными последовательностями уже охарактеризованных четырехдоменных каналов животных и грибов в каждом из четырех доменов 24 ЧД ПКК динофлагеллят были выявлены сегменты S4 (табл. 2). 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. Таким образом, эти последовательности имеют первичную структуру, характерную для потенциал-неуправляемых каналов. 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 транскриптомах 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, что характерно для потенциал-управляемых каналов.

### Первичная и вторичная структура области инактивационных ворот

У 24 идентифицированных аминокислотных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят была проанализирована первичная и вторичная структура участка, гомологичного области инактивационных ворот каналов  $Na_v$  и находящегося в цитоплазматическом линкере между доменами III и IV (табл. 2).

Аминокислотный состав последовательности инактивационных ворот каналов  $Na_v$  имеет вид XXXT, где X – остаток неполярной, обычно гидрофобной аминокислоты, T – остаток полярного треонина. Анализ первичной структуры гомологичной области ЧД ПКК динофлагеллят выявил, что 12 из 24 последовательностей содержат мотив XXXT/S, где S – остаток полярного серина. Такие мотивы наиболее близки к мотиву инактивационных ворот каналов  $Na_v$ . Среди остальных 12 последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят в гомологичной области наблюдаются замены 1–2 гидрофобных аминокислотных остатков триплета XXX на остатки полярных незаряженных и заряженных аминокислот. Кроме того, одна из этих последовательностей содержит остаток заряженного аспартата вместо полярного незаряженного треонина или серина (табл. 2).

Известно, что в стабилизации инактивационных ворот в сайте докинга принимают участие альфа-спиральные структуры, фланкирующие мотив инактивационных ворот. Анализ вторичной структуры линкерного участка между доменами III и IV с помощью алгоритма PsiPred выявил, что 18 из 24 последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят имеют по крайней мере одну консервативную альфа-спираль в непосредственной близости от участка, гомологичного инактивационным воротам (рис. 7), в том числе у 10 из 12 последовательностей с мотивом XXXT/S (табл. 2).

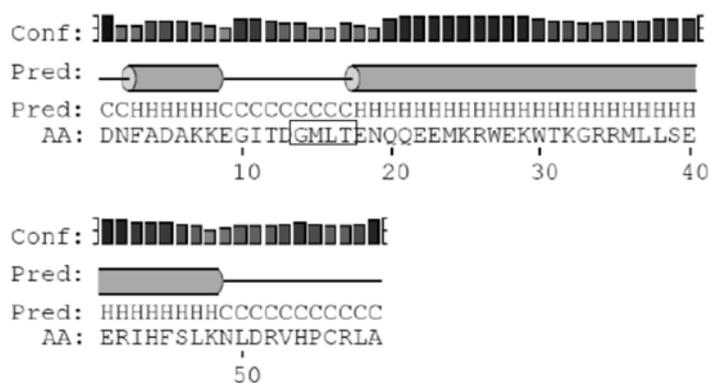


Рисунок 7. Результат моделирования с помощью программы PsiPred вторичной структуры аминокислотной последовательности цитозольного участка между доменами DIII и DIV, несущего инактивационные ворота, у ЧД ПКК *P. minimum* Pm47759.  – альфа-спираль (H);  –

неорганизованный участок (C);  – уровень значимости (min=0; max=9). Прямоугольником выделен  участок, гомологичный участку инактивационных ворот каналов Nav.

Таким образом, среди 24 аминокислотных последовательностей ЧД ПКК динофлагеллят выявлены как последовательности, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, свидетельствует о возможности быстрой инактивации, так и последовательности, у которых структура участка, гомологичного инактивационным воротам, не характерна для каналов с быстрой инактивацией.

## Регистрация активности ионных каналов динофлагеллят

### 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 (шипики) 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. Для решения проблемы применения метода локальной фиксации потенциала на мембране для изучения ионных каналов динофлагеллят *in situ* автором был предложен метод получения сферопластов, основанный на использовании блокатора синтеза целлюлозы 2,6-дихлорбензонитрила (ДХБ) (рис. 8) (Поздняков, 2014а,б; Pozdnyakov, Skarlato, 2012; Pozdnyakov, Matantseva, 2013; Pozdnyakov et al., 2014; Pozdnyakov, Skarlato, 2014).

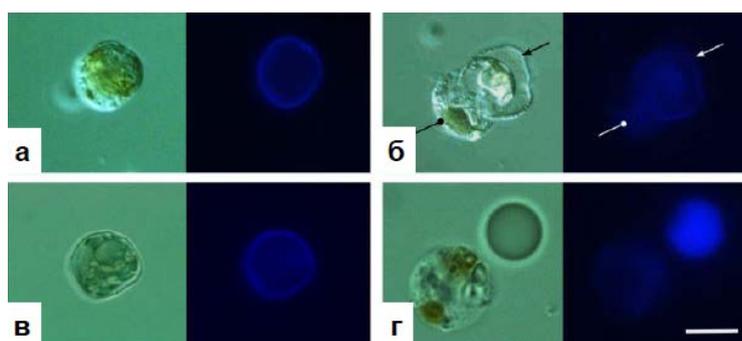


Рисунок 8. Микрофотографии клеток *P. minimum*, окрашенных CFW. а – нативная клетка, б – клетка, проходящая экдизис (стрелка с круглым концом) и сбрасываемая тека (стрелка с треугольным концом), в – клетка, обработанная 10 мМ ДМСО, г – клетка, обработанная

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.

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

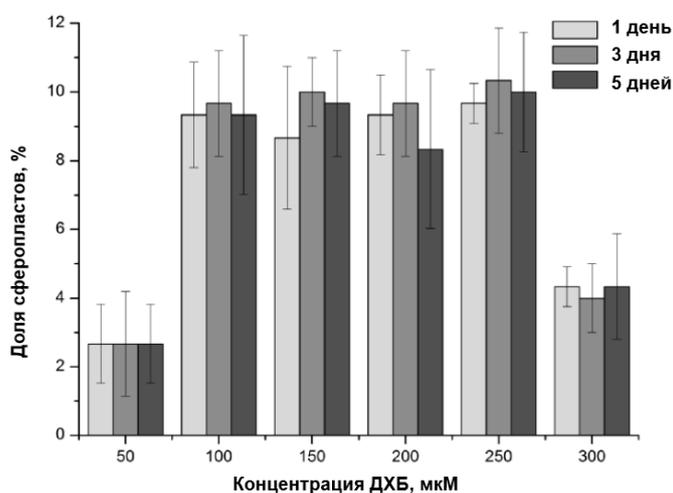


Рисунок 9. Зависимость доли полученных сферопластов от концентрации ДХБ и времени инкубации. Показаны стандартные отклонения. Из: Pozdnyakov et al., 2014, с изменениями.

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,  $p < 0,05$ ) (рис. 10). Экдизис, индуцированный ДХБ, начинается после 4 ч инкубации и достигает постоянного максимального уровня через 20 ч. Таким образом, ДХБ может рассматриваться как 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.

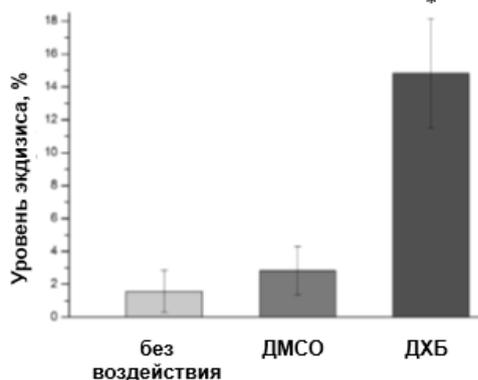


Рисунок 10. Уровень экдизиса в культуре *P. minimum* в зависимости от вида воздействия. Показаны стандартные отклонения. Звездочкой показаны типы воздействия, при которых уровень экдизиса статистически значимо отличался от уровня экдизиса в контроле «без воздействия» ( $p < 0,05$ ). Из: Pozdnyakov et al., 2014, с изменениями.

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

С помощью разработанного автором метода получения сферопластов *P. minimum* впервые были зарегистрированы одиночные ионные каналы динофлагеллят. На рисунке 11 представлены результаты регистрации активности ионного канала плазматической мембраны сферопласта *P. minimum*, полученные в конфигурации «cell-attached» с использованием ступенчатого протокола и растворов «240 NaCl»<sub>п</sub> (в пипетке) и «240 KCl»<sub>к</sub> (в камере). Рассчитанная величина проводимости зарегистрированного канала составила 117 пСм. Потенциал реверсии ( $E_{rev}$ ) такого канала находится в области положительных значений потенциала (+25 мВ).

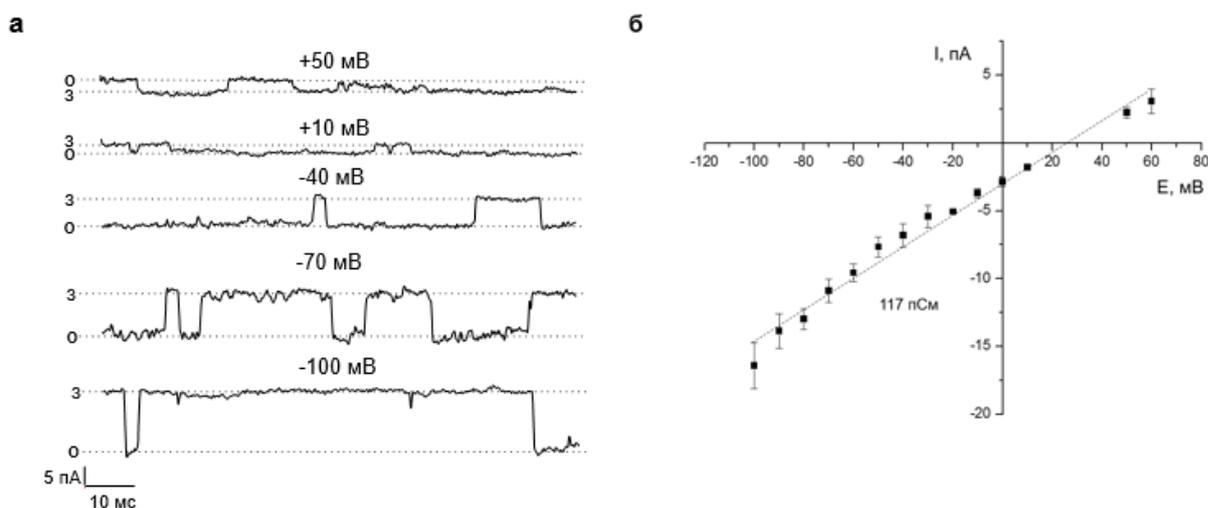


Рисунок 11. Фрагмент записи (а) и вольт-амперная характеристика (б) ионного канала *P. minimum*, полученная в конфигурации «cell-attached» с использованием ступенчатого протокола и растворов «240 NaCl»<sub>п</sub> (в микропипетке) и «240 KCl»<sub>к</sub> (в камере). о – уровень, соответствующий открытому состоянию канала, з – уровень, соответствующий закрытому состоянию канала (здесь и на рисунках 12–13).

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 (в частности, реальная величина  $E_{rev}$  для зарегистрированного канала (рис. 11) неизвестна). Для того чтобы решить эту проблему, контролируя ионный состав растворов по обе стороны мембраны, была применена конфигурация регистрации ионных токов на изолированном участке мембраны – «inside-out» («внутренняя сторона мембраны обращена в наружный раствор»). Для удобства в большинстве экспериментов 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 и исходя из допущения, что анионные каналы непроницаемы для аспартата, вместо растворов на основе хлорида калия были использованы растворы на основе аспартата калия.

На рисунке 12 представлены фрагменты записи активности и вольт-амперные характеристики канала, зарегистрированного в симметричных растворах «240 KAsp» («240 KAsp»<sub>к</sub> в камере и «240 KAsp»<sub>п</sub> 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 могут быть охарактеризованы как катион-проводящие каналы с неопределенной селективностью.

В одном из экспериментов удалось произвести регистрацию трансмембранного тока с последовательной заменой растворов камеры, омывающих внутреннюю сторону мембранного фрагмента: 1) «240KAsp»<sub>к</sub>, начальные симметричные условия, 2) «120K/120NaAsp»<sub>к</sub>, 3) «60K/180NaAsp»<sub>к</sub> (рис. 13). 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»<sub>п</sub>). 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»<sub>к</sub>), 76 пСм («120K/120NaAsp»<sub>к</sub>) и 74 («60K/180NaAsp»<sub>к</sub>). Отсутствие изменений в вольт-амперной характеристике говорит о том, что зарегистрированный канал является катион-проводящим неселективным каналом

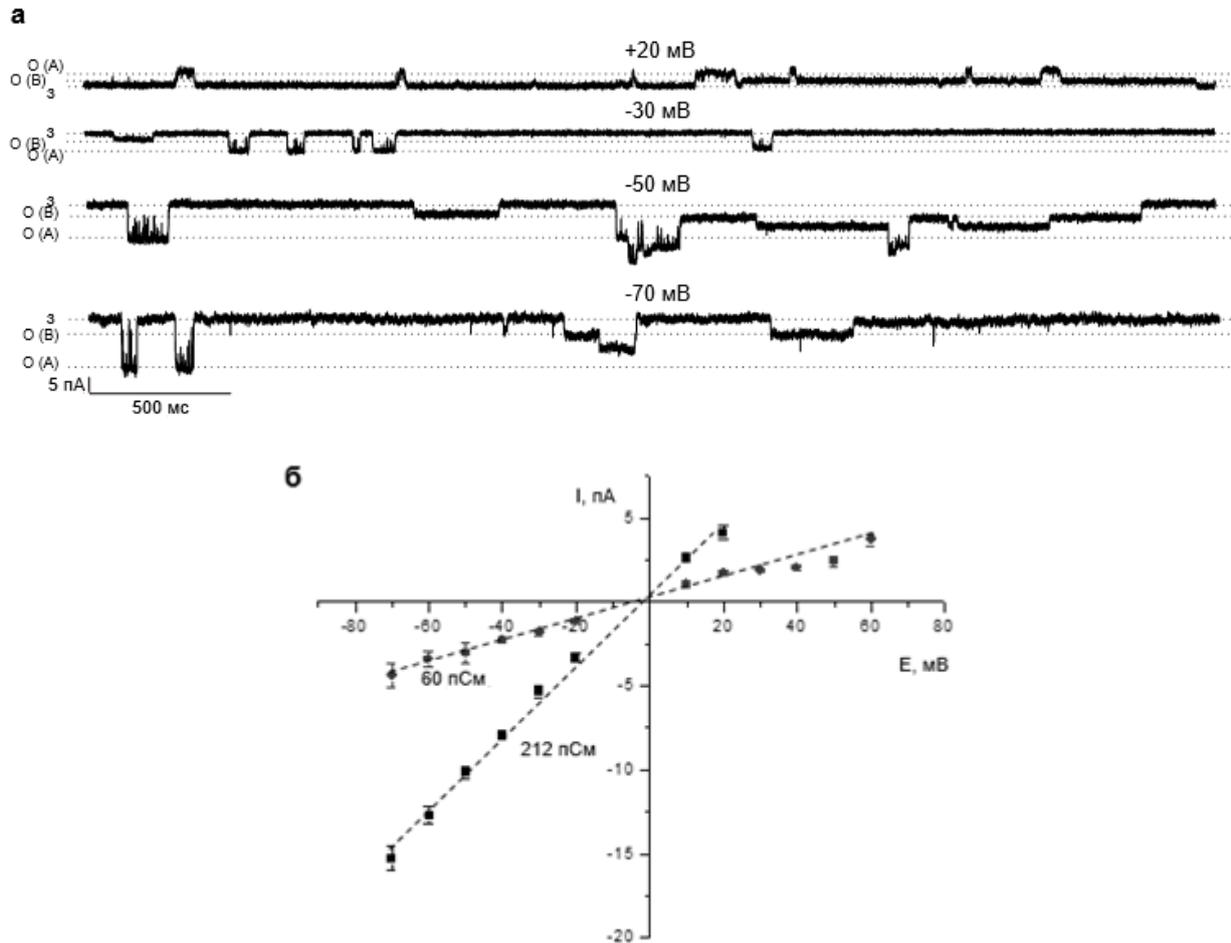
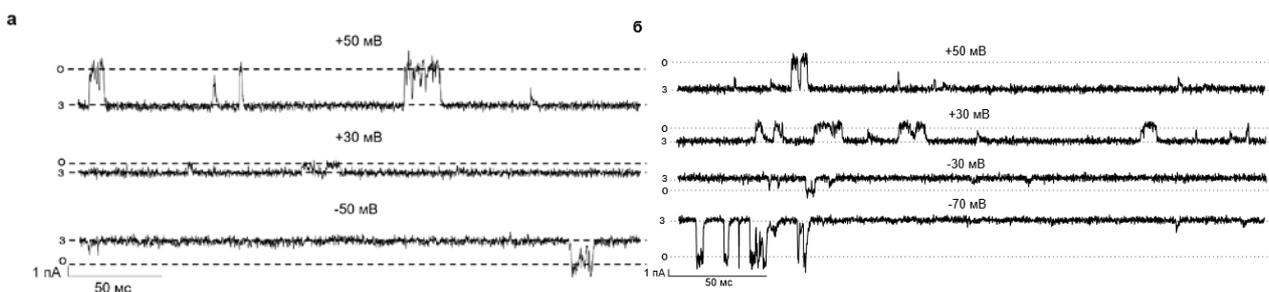


Рисунок 12. Фрагмент записи (а) и вольт-амперная характеристика (б) катионных каналов *P. minimum*, полученная в конфигурации «inside-out» с использованием протокола постоянной записи и растворов «240 KAsp»<sub>к</sub> (в камере) и «240 KAsp»<sub>п</sub> (в микропипетке). Квадраты – значения амплитуды тока для канала типа А. Круги – значения амплитуды тока для канала типа В.



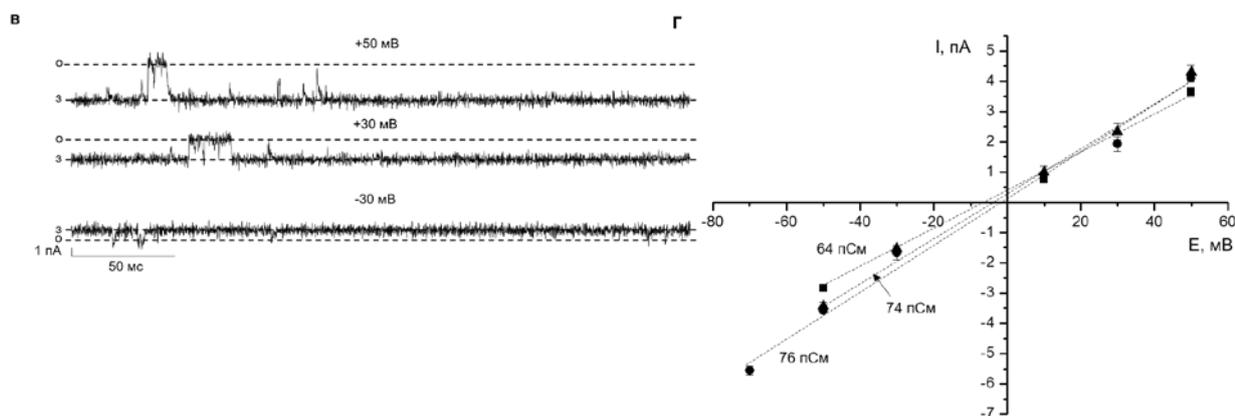


Рисунок 13. Фрагменты записи (а–в) и вольт-амперные характеристики (г) катионных каналов *P. minimum*, полученные в конфигурации inside-out с использованием протокола постоянной записи. Раствор в микропипетке: «240KAsp»<sub>п</sub>. Растворы в камере: «240KAsp»<sub>к</sub> (а), «120K/120NaAsp»<sub>к</sub> (б), «60K/180NaAsp»<sub>к</sub> (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).

Таким образом, использование разработанного подхода к получению сферопластов армированных динофлагеллят позволило впервые 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.

## 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 ( $K_{2p}$ ); 4) 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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-depended 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.