

АННОТАЦИЯ НОВОГО НИЗКОПОРОГОВОГО ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО КАЛЬЦИЕВОГО КАНАЛА ТРИХОПЛАКСА *Trichoplax adhaerens* (ТИП Placozoa)

© 2024 г. А.В. Кузнецов*, **, #, Л.Е. Карташов***

*Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Россия

**Институт радиозлектроники и информационной безопасности Севастопольского государственного университета, Университетская ул., 33, Севастополь, 299053, Россия

*** Кафедра приборных систем и автоматизации технологических процессов Севастопольского государственного университета, ул. Гоголя, 12-14, Севастополь, 299007, Россия

#E-mail: kuznet@ibss-ras.ru

Поступила в редакцию 29.06.2020 г.

После доработки 17.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Изучение потенциалзависимых кальциевых каналов проливает свет на формирование систем, ответственных за сопряжение сенсоров и актуаторов в живой клетке. На основании данных по потенциалчувствительному кальциевому каналу TCav3 (2063 аминокислотных остатка) из клеток *Trichoplax adhaerens* идентифицированы гомолог длиной 2090 аминокислотных остатков в скаффолде *Trichoplax* sp. H2 и неполный полипептид длиной 1510 аминокислотных остатков в скаффолде *Trichoplax adhaerens*. Последний гипотетический белок аннотирован как Ca_v3-канал. Для всех трех белков найден EEDD селективный фильтр и реконструирована коровая структура кальциевого канала, состоящая из 24 трансмембранных α-спиралей. Тем не менее исследуемые белки отличаются цитоплазматическими доменами, что свидетельствует о различной специализации Ca_v3-каналов при проведении сигнала внутрь клетки. Так, часть AID-мотива (alpha-interacting domain) и прилежащего сенсора потенциала из аннотированного канала имеют гомологии в 25 видах костистых рыб, а соответствующая область из обоих других каналов в 41 виде костистых рыб и в 4 видах змей. Существенно, что ниже от AID-мотива костистых рыб, как и у трихопакса, обнаружена высококонсервативная петля IIS1-S2 с последовательностью IENHNQP, в то время как у змей найдена гомологичная последовательность IENHEQP, отличающаяся отрицательным остатком глутаминовой кислоты, который также присутствует в соответствующих белках крысы и человека. На основании анализа первичных транскриптов и зрелых полипептидов предполагается модульный механизм эволюции Ca_v3-каналов путем вставок и объединения белковых доменов, выполняющих разнообразные регуляторные функции.

Ключевые слова: трихопакс, Ca_v3-каналы, домены, инсерции, модульная эволюция.

DOI: 10.31857/S0006302924010043, EDN: RHWLPC

Трихопакс (Placozoa) является простейшим многоклеточным животным [1, 2] с наименьшим ядерным [3] и наибольшим митохондриальным геномами [4, 5]. Интересно, что ДНК трихопакса кодирует полипептиды, гомологичные белкам высших метазоа. Считается, что трихопакс обладает всеми тремя типами регулируемых напряжением кальциевых каналов [3, 6], как и человек, у

которого Ca²⁺-каналы L-типа (Ca_v1) участвуют в постсинаптической передаче сигналов в нейронах и мышцах, Ca²⁺-каналы N-, P-/Q- и R-типа (Ca_v2) отвечают за преобразование электрических потенциалов действия в химические сигналы, а Ca²⁺-каналы T-типа (Ca_v3) участвуют в регулировании клеточной возбудимости [7, 8].

Существенно, что кальциевые каналы трихопакса не только предвосхищают доменную архитектуру соответствующих белков из животных с развитой нервной системой, но и демонстрируют похожие биофизические характеристики [9].

Сокращения: нп – пары нуклеотидов, аа – аминокислотные остатки, LSS – лидерный сайт сплайсинга (leader splice site), AID – альфа-взаимодействующий домен (alpha-interacting domain), IML – внутренняя срединная петля (inner mid-loop), кДа – килодальтон.

Предполагается, что Ca_v -каналы, содержащие четыре схожих трансмембранных повтора, возникли в результате двух раундов дубликации последовательностей односубъединичных каналов, таких как потенциалзависимые калиевые каналы, которые состоят из четырех отдельных субъединиц, объединенных в тетрамерный комплекс, или в результате дублирования промежуточного двухсубъединичного канала [10–12].

Подробное исследование низкопорогового потенциалзависимого Ca_v -канала Т-типа из *Trichoplax adhaerens* H1 (T Ca_v3 по новой классификации) было начато сравнительно недавно [6]. Первоначально был идентифицирован и аннотирован ген KJ466205.1, позднее был получен профиль гидрофобности аминокислотной последовательности соответствующего белка AII29365.1, и на основе этих данных была предложена доменная модель интересующего мембранного белка. Ген KJ466205.1 был клонирован, а с помощью гетерологической системы экспрессии удалось охарактеризовать биохимические и физиологические свойства T Ca_v3 -канала [6, 9].

Несмотря на достигнутый прогресс, отсутствует полное понимание направления развития кальциевых каналов и дифференцировки их функций [13]. Мы сосредоточились на изучении модульных механизмов усложнения Ca^{2+} -каналов и в дополнение к гипотезе «двойной дубликации», которая подразумевает последовательное возникновение двухсубъединичных и четырехсубъединичных белков путем удвоения соответствующих генов [10], полагаем, что эволюция кальциевых каналов шла по пути слияния отдельных субъединиц в единую полипептидную цепь, дальнейшей инсерции новых доменов с регуляторными функциями в спейсеры, соединяющие трансмембранные сегменты, и последующего объединения дополнительных белковых субъединиц, которые взаимодействуют с регуляторами канала, в макромолекулярный комплекс, который интегрируется в единую сеть управления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформационный анализ *in silico* осуществляли на удаленных серверах. Поиск ортологов среди кальциевых каналов трихопакса и других биологических видов состоял в последовательном применении программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) против таких баз данных, как nr, pdb, wgs и tsa, внутри реляционной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также в InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). Кроме того, использовали коллекцию белков PFAM (<http://pfam.xfam.org>), а в ряде экспериментов анализ дополняли поиском с помощью SmartBLAST и MOTIF Search ([\[genome.jp/tools/motif\]\(https://www.genome.jp/tools/motif\)\). Параметры оценки гомологии как счет \(BitScores\) и ожидание \(E-value\) приводятся в тексте.](https://www.</p></div><div data-bbox=)

Поиск в базе данных консервативных доменов CDD осуществляли с помощью BLAST-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). В отдельных случаях, чтобы идентифицировать гомологичные белковые последовательности, применяли программу PHMMER (<http://hmmer.org>). Множественные выравнивания выполнены с помощью Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Распознавание сигналов сплайсинга и выявление экзонов осуществили благодаря утилите Splign [14]. Для форматирования и анализа коротких полипептидных последовательностей локально использовали пакет SMS2 [15].

Предсказание консервативных белковых доменов и функциональных участков мембранных белков проводили с помощью InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) и дополняли профилями гидропатии, используя ExPASy ProtScale [16]. Построение пространственных моделей белков выполняли на PyMol-сервере [17]. Заключительный анализ и визуализацию молекулярных структур осуществляли с использованием программы UCSF Chimera [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интрон-экзонная природа исследуемых полипептидов. Исходные данные по нуклеотидным последовательностям были взяты из геномных проектов, опубликованных в работах [3, 19]. Ген белка RDD42051.1 занимал положение с координатами 226881–241350 на скаффолде *Trichoplax* sp. H2 strain Panama scaffold_62, а соответствующие гены белка AII29365.1 и гипотетического неполного белка TRIADDRAFT_21513 находились в разных положениях 48355–61646 и 1727–13230 (6781672–6793175) на скаффолде *Trichoplax adhaerens* TRIADscaffold_2 (рис. 1, 2). Следует отметить, что длина экзонов всех трех белков была сопоставима, варьировала от 69 до 1442 пар нуклеотидов (нп) и в среднем составляла 221 нп. Длина интронов колебалась от 82 до 689 нп при среднем значении 267 нп (табл. 1). Длины первичных транскриптов AII29365.1 и RDD42051.1 существенно не отличались и составляли 6192 и 7499 нп соответственно, а длина первичного транскрипта TRIADDRAFT_21513 была несколько короче и равнялась 4530 нп. Число экзонов для полных полипептидов AII29365.1 и RDD42051.1 составляло 28, а для укороченного белка TRIADDRAFT_21513 имело значение 26.

Сравнение белков AII29365.1 и RDD42051.1. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что белок AII29365.1



Рис. 1. Физические карты генов и первичных транскриптов, кодирующих белки AIJ29365.1 (а), RDD42051.1 (б) и гипотетический полипептид TRIADDRAFT_21513 (в).



Рис. 2. Местоположение гена 6750759 в локусе TRIADDRAFT_21513 на скаффолде *Trichoplax adhaerens* (strain: Grell-BS-1999) [3], кодирующего гипотетический белок TRIADDRAFT_21513.

длиной 2063 аминокислотных остатка (aa) из штамма Н1 имеет 97% гомологии с полипептидом RDD42051.1 длиной 2090 aa из штамма Н2, а так-

же выявил 13 точечных аминокислотных замен и отсутствие N-концевого пептида длиной 13 aa во втором белке, причем 5 аминокислотных замен

Таблица 1. Характеристики изучаемых первичных транскриптов на основе геномных данных *Trichoplax adhaerens* (Н1) и *Trichoplax* sp. (Н2)

Белок	Гаплотип	Длина первичного транскрипта, нп	Число экзонов	Экзоны, нп			Интроны, нп		
				мин.	макс.	ср.	мин.	макс.	ср.
AIJ29365.1	Н1	6192	28	69	855	221	82	688	263
RDD42051.1	Н2	7499	28	69	1442	267	82	689	259
TRIADDRAFT_21513	Н1	4530	26	71	430	174	97	688	279
Суммарное среднее				70	909	221	87	688	267



Рис. 3. Физическая карта (а) и парное выравнивание (б) белковых последовательностей AIJ29365.1 и RDD42051.1, которые являются низкопороговыми кальциевыми каналами Т-типа из трихоплаксов штаммов H1 и H2, соответственно, N-концевой пептид выделен зеленым цветом, лидерный фрагмент с участком сплайсинга – желтым, сайты связывания иона кальция – красным, аминокислотные замены – бирюзовым, IEHNNQP-сайт – малиновым, жирным шрифтом указано положение каналаобразующих повторов I–IV, места сплайсирования PHK указаны прописными буквами.

повтор/доля/домен IV

AIJ29365.1	KVKEKKKNHIPPVEDYPAWRRKLYRFCV	HRYFDITITITIVIAVNIIFMATEHYKMSqaWEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIH	1560
RDD42051.1	KVKEKKKNHIPPVEDYPAWRRKLYRFCV	HRYFDITITITIVIAVNIIFMATEHYKMSqaWEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIH	1587
AIJ29365.1	LVAFGVYYFRDrwNIFDLLIVILSWTGIIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVriLKLIIKAAKGIRALLRTIMNAMPq		1640
RDD42051.1	LVAFGVYYFRDrwNIFDLLIVILSWTGIIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVriLKLIIKAAKGIRALLRTIMNAMPq		1667
AIJ29365.1	vVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCCTTDNPNCGLSQHANFKTFGMAMTLFRIATGDNWQGILqdTLRENCDRSENC		1720
RDD42051.1	vVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCCTTDNPNCGLSQHANFKTFGMAMTLFRIATGDNWQGILqdTLRENCDRSENC		1747
AIJ29365.1	QONCCSNPILSSLFFVIFVLAQAQYVLTNVVAVLM	KHLEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNYYPPGLTDI	1800
RDD42051.1	QONCCSNPILSSLFFVIFVLAQAQYVLTNVVAVLM	KHLEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNYYPPGLTDI	1827
AIJ29365.1	HLSSNHKNLTKIGEDYTTHQFDQNHHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKSTLDQAENEVVMQDKFQVHDIRTKSSY		1880
RDD42051.1	HLSSNHKNLTKIGEDYTTHQFDQNHHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKSVLDQAENEVVMQDKFQVHDIRTKLSY		1907
AIJ29365.1	PLDDHDDVEDQMELTASIHENRKLHRQGNSSDDGHPYLLQOHSPLFRHQSYESNCHHGSIQSDFNFSNLSSDTSFSSEN		1960
RDD42051.1	PLDDHDDVEDQMELTASIHENRKLHRQGNSSDDGHPYLLQOHSPLFRHQSYESNCHHGSIQSDFNFSNLSSDTSFSSEN		1987
AIJ29365.1	PLKSNNSKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKs1KRSNSWDFSFTESEFSNHRYPCKSKKTIYPFHYPTKLSKDDSTIPD		2040
RDD42051.1	PLKSNNSKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKs1KRSNSWDFSFTESEFSNHRYPCKSKKTIYPFHYPTKLSKDDSTISD		2067
AIJ29365.1	QPMVIAKEKKVTLPRKMIQTLv		2063
RDD42051.1	QPMVIAKEKKVTLPRKMIQTLv		2090

Рис. 3. Окончание.

приходилось на сравнительно небольшую N-концевую часть белка. Тем не менее существенное отличие RDD42051.1 заключается в пептидной вставке LSS (leader splice site — лидерный сайт сплайсинга) длиной 40 аа, массой 4.81 кДа, с высоким содержанием алифатических (8 Ile, 20%, и 4 Leu, 10%) и ароматических (6 Phe, 15%, и 4 Tyr, 10%) аминокислот, что составляет 55% от общего числа его аминокислотных остатков. Интересной особенностью данного пептида является внутренняя метка сайта сплайсинга, по которому объединяются экзоны I и II, кодирующие белок RDD42051.1 (рис. 3).

Последовательность LSS-пептида оказалась уникальной. Так, его сравнение при помощи BLAST-сервера с глобальным банком данных NCBI (база nr) выявило присутствие укороченного участка MRSIIINFYLFYLPKSKSIGLNFCLT с 100%-й гомологией лишь в одном неполном гипотетическом белке TRIADDRAFT_21513 (GeneID: 6750759, ProteinID: XP_002109544.1) — предполагаемом переносчике ионов, принадлежащему *Trichoplax adhaerens* (H1). Повторное сравнение короткого пептида длиной 27 аа с базами данных PFAM и InterPro не помогло найти дополнительные существенные гомологии.

Построение структурных моделей белков AIJ29365.1 и RDD42051.1. Полипептидные последовательности AIJ29365.1 и RDD42051.1 длиной 2063 и 2090 аа были использованы для создания трехмерных моделей соответствующих кальциевых каналов на Phyre2-сервере методом гомологического сравнения с известными белковыми структурами [20].

В случае AIJ29365.1 с наибольшим количеством очков и с 100%-й доверительной вероятностью по единичному шаблону натриевого канала были смоделированы 1194 аминокислотных остатка, составляющие 58% общей длины. Дополнительно 1431 остатков (69%) были смоделированы с доверительной вероятностью больше 90% с использованием нескольких шаблонов.

Для RDD42051.1 с наибольшим счетом и с 100%-й вероятностью по одному шаблону были построены 1143 остатка, составляющие 55% последовательности. Кроме того, 1405 остатков (67%) были смоделированы с вероятностью больше 90% с применением нескольких дополнительных шаблонов.

Оба ионных канала имели схожую структуру и состояли из центрального участка, формирующего пору, и четырех потенциалчувствительных доменов, которые окружают кор (рис. 4а,б). Установлено, что ион-проводящая пора образована четырьмя парными антипараллельными α -спиралями, собирающимися в четыре пальца, которые вместе связывают один ион кальция. По периферии к каждому из пальцев присоединены по одному датчику потенциала, каждый из которых образован четырьмя антипараллельными α -спиралями.

В процессе моделирования было потеряно до половины аминокислотных остатков в каждом из исследуемых белков. Из-за отсутствия гомологии с базовыми полипептидами можно предположить, что утраченные белковые фрагменты выполняют delicate регуляторные функции и не являются широко распространенными структу-

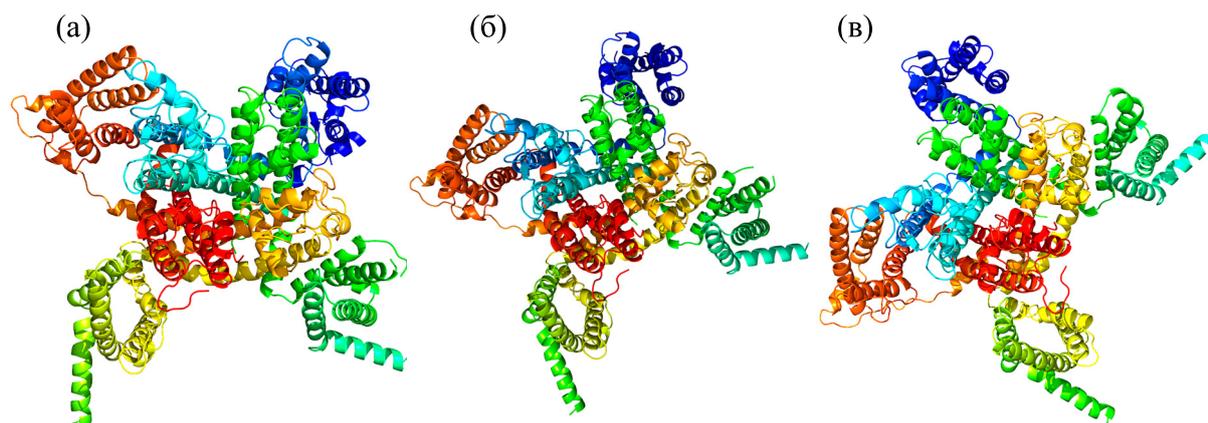


Рис. 4. Реконструкция трехмерных структур Ca_2^+ -каналов по первичным аминокислотным последовательностям AIJ29365.1 (а), RDD42051.1 (б) и TRIADDRAFT_21513 (в) из трихоплексов штаммов Н1 и Н2, первая доля тетрамера обозначена голубым цветом, далее по часовой стрелке.

рами. В частности, в модель не был включен уникальный пептид LSS (рис. 3).

Суммарные данные свидетельствуют, что найденный в белке RDD42051.1 из *Trichoplax* sp. Н2 пептид LSS длиной 40 аа располагается близко к N-концу аминокислотной цепи перед α -спиралью S1 сенсорного домена из повтора I. В силу того, что эта часть мембранного белка образована алифатическими и ароматическими аминокислотными остатками, но обращена в цитоплазму клетки, можно предположить, что данный пептид способен взаимодействовать с гидрофобной частью некой вспомогательной белковой субъединицы, выполняющей модуляторные функции.

В дополнение к структурному анализу для всех исследуемых белков были идентифицированы и картированы трансмембранные домены потенциалзависимых кальциевых каналов, закодированные в первичных аминокислотных последовательностях (табл. 2), что позволило сопоставлять данные и присваивать отдельным пептидным

фрагментам предполагаемые функциональные характеристики.

Аннотация белка TRIADDRAFT_21513 (XP_002109544.1). Гипотетический белок TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* (Gene ID: 6750759, ProteinID: XP_002109544.1) гомологичен имеющим высокое сходство полипептидам AIJ29365.1 и RDD42051.1, однако имеет ряд отличий. Так, в неполном полипептиде TRIADDRAFT_21513 был обнаружен укороченный вариант (Δ LSS) пептида с сайтом сплайсинга внутри. Необходимо подчеркнуть, что фрагмент Δ LSS фактически является N-концевым участком этого белка (рис. 3, 5). Следующей особенностью белка TRIADDRAFT_21513 являются значительные делеции на участках, обозначенных как альфа-взаимодействующий домен (AID – alpha-interacting domain) [21, 22] и IML-домен (inner mid-loop) длиной 66 и 51 аа соответственно. Кроме того, отмечены изменения в паттерне сплайсирования РНК при образовании

Таблица 2. Положение основных четырех трансмембранных доменов, образующих пору кальциевого канала, на аминокислотных последовательностях белков AIJ29365.1, RDD42051.1 и TRIADDRAFT_21513 (XP_002109544.1)

Белок	Повтор/домен							
	I		II		III		IV	
	Интервал	E	Интервал	E	Интервал	E	Интервал	E
AIJ29365.1	161–485	1.19e^{-38}	733–964	1.24e^{-53}	1177–1447	6.73e^{-62}	1509–1755	1.90e^{-47}
RDD42051.1	190–512	1.59e^{-37}	760–991	1.36e^{-53}	1204–1474	2.42e^{-61}	1536–1782	5.11e^{-47}
XP_002109544.1	28–350	4.73e^{-32}	532–763	3.46e^{-48}	924–1189	4.00e^{-53}	1254–1500	2.65e^{-42}

Примечание. E – значение ожидания.

AIJ29365.1	mDISFAIIPFNYN MTLLSILSANWNLVLLLLVDMSSNGHRCHQRFAASSSYQSDQPSHHA	60
RDD42051.1	-----mTLLSILSANWNLVLLLLVDMSSNGHRCHQRFAASSSYQSDQPSHHA	47
XP_002109544.1	-----	0
AIJ29365.1	IDRNKHQDLPHYHGKAKSPDLLSPISAYDRYQQGRQQQD G TNQNYKADNYRQPHD I IREFQ	120
RDD42051.1	IDRNKHQDLPHYHGKAKSPDLLSPISAYDRYQQGRQQQD R TNQNYKADNYRQPHD V IREFQ	107
XP_002109544.1	-----	0
AIJ29365.1	SEQQINSNDADI E EIHPVVCWYLHKD Q WPRKYFVKLSQWr-----	162
RDD42051.1	SEQQINSNDADI D DEIHPVVCWYLHKD E WPRKYFVKLSQWr Y PFIDGFNI I ni Y MRS I I	167
XP_002109544.1	-----mRS I I	5
AIJ29365.1	-----w F ERITIIIVILINCVTLG S YNPAG Q FKN N TCVD S TC Q I	200
RDD42051.1	I NFY L F L Y P H S K S I G L N F C F L T W FERITIIIVILINCVTLG S YNPAG Q FKN N TCVD S TC Q I	227
XP_002109544.1	I NFY L F L Y P H S K S I G L N F C F L T W FERITIIIVILINCVTLG S YNPAG Q FKN N TCVD S TC Q I	65
AIJ29365.1	T SVVDN I I F GY F V V EM I IK M VAL G V F G K Y A F S SG W N R LD F I I VL T g C LE Y L I NE G E F LT	260
RDD42051.1	T SVVDN I I F GY F V V EM I IK M VAL G V F G K Y A F S SG W N R LD F I I VL T g C LE Y L I NE G E F LT	287
XP_002109544.1	T SVVDN I I F GY F V V EM I IK M VAL G V F G K Y A F S SG W N R LD F I I VL T g C LE Y L I NE G E F LT	125
AIJ29365.1	I IRT V R V L R PL R AIN R V p s M RL V N L L L D T PL L GN V LM L CF I V F S I FG I V G V Q L W K G IL	320
RDD42051.1	I IRT V R V L R PL R AIN R V p s M RL V N L L L D T PL L GN V LM L CF I V F S I FG I V G V Q L W K G IL	347
XP_002109544.1	I IRT V R V L R PL R AIN R V p s M RL V N L L L D T PL L GN V LM L CF I V F S I FG I V G V Q L W K G IL	185
AIJ29365.1	R SR C T L Q O N I T A P P g i F L Y R Y L P S Y E D P D V CS L PE Y NG I H H CR D L T LS N L T D L T C K I	380
RDD42051.1	R SR C T L Q O N I T A P P g i F L Y R Y L P S Y E D P D V CS L PE Y NG I H H CR D L T LS N L T D L T C K I	407
XP_002109544.1	R SR C T L Q O N I T A P P g i F L Y R Y L P S Y E D P D V CS L PE Y NG I H H CR D L T LS N L T D L T C K I	245
EL1		
AIJ29365.1	T N Q T L S Q Y G D G T C T E Y L Q F Y D T C S T S G P N I F Y D N I S F D N F A M A F I A I F q v I T L E A W V D I	440
RDD42051.1	T N Q T L S Q Y G D G T C T E Y L Q F Y D T C S T S G P N I F Y D N I S F D N F A M A F I A I F q v I T L E A W V D I	467
XP_002109544.1	T N Q T L S Q Y G D G T C T E Y L Q F Y D T C S T S G P N I F Y D N I S F D N F A M A F I A I F q v I T L E A W V D I	305
AIJ29365.1	M Y A I Q D G H A S I D W I F V I L I L i G S L F L L N F L V M A T Q F S E T K R R	500
RDD42051.1	M Y A I Q D G H A S I D W I F V I L I L i G S L F L L N F L V M A T Q F S E T K R R	527
XP_002109544.1	M Y A I Q D G H A S I D W I F V I L I L i G S L F L L N F L V M A T Q F S E T K R R	365
AIJ29365.1	R G S F S T L S S S A E S R T C Y N E T I R L I R R I I L I A Y L I Q F Y S R C L K K i W N R L Y N R C L I C K R K	560
RDD42051.1	R G S F S T L S S S A E S R T C Y N E T I R L I R R I I L I A Y L I Q F Y S R C L K K i W N R L Y N R C L I C K R K	587
XP_002109544.1	R G S F S T L S S S A E S R T C Y N E T I R L I R R I I L I A Y L I Q F Y S R C L K K i-----	411
AIJ29365.1	W S S R H Q R S T S M S E S R V N G N A K F T S D D Q R L D R L H Q N F F L P D I D G S C L S D G T E R S T Y L A F R I	620
RDD42051.1	W S S R H Q R S T S M S E S R V N G N A K F T S D D Q R L D R L H Q N F F L P D I D G S C L S D G T E R S T Y L A F R I	647
XP_002109544.1	----- S T Y L A F R I	419
AIJ29365.1	D N W R Q R S Y S Q N T T T T S Q I Y Q E S A L R D R L G K R N G D L A I N N S L Y D G T T D N D G D T P I H P L E S N	680
RDD42051.1	D N W R Q R S Y S Q N T T T T S Q I Y Q E S A L R D R L G K R N G D L A I N N S L Y D G T T D N D G D T P I H P L E S N	707
XP_002109544.1	D N W R Q R S Y S Q N T T T T S Q I Y Q E S A L R D R L G K R N G D L A I N N S L Y D G T T D N D G D T P I H P L E S N	479
AIJ29365.1	T E L Q L F N F Q L R H Q P D G V S L T T D L S N K P T N Y Q L K Q R I R R L R V R C C I F T K S Q R F S L I V L F A	740
RDD42051.1	T E L Q L F N F Q L R H Q P D G V S L T T D L S N K P T N Y Q L K Q R I R R L R V R C C I F T K S Q R F S L I V L F A	767
XP_002109544.1	T E L Q L F N F Q L R H Q P D G V S L T T D L S N K L T N Y Q L K Q R I R R L R V R C C I F T K S Q R F S L I V L F A	539
AIJ29365.1	I L A N T I V M A I E H H N q p T Y Q I Q A L E V C N I I F T I F F T L E M V F K L F A L G L L R Y A K D S F N V F D A	800
RDD42051.1	I L A N T I V M A I E H H N q p T Y Q I Q A L E V C N I I F T I F F T L E M V F K L F A L G L L H Y A K D S F N V F D A	827
XP_002109544.1	I L A N T I V M A I E H H N q p T Y Q I Q A L E V C N I I F T I F F T L E M V F K L F A L G L L H Y A K D S F N V F D A	599
AIJ29365.1	I I V I V s l V E I A T D G K L S V L R S F R L L R I F K I V R F L P T L Q R O M M V M A Q T F D N V I F L G L L F	860
RDD42051.1	I I V I V s l V E I A T D G K L S V L R S F R L L R I F K I V R F L P T L Q R O M M V M A Q T F D N V I F L G L L F	887
XP_002109544.1	I I V I V s l V E I A T D G K L S V L R S F R L L R I F K I V R F L P T L Q R O M M V M A Q T F D N V I F L G L L F	659
AIJ29365.1	L F M F T F S I L G M H L F G N R F C L A R V K D G P V V C S R K N F D S L L W A F V T V F q i L T Q E D N V V M Y D	920
RDD42051.1	L F M F T F S I L G M H L F G N R F C L A R V K D G P V V C S R K N F D S L L W A F V T V F q i L T Q E D N V V M Y D	947
XP_002109544.1	L F M F T F S I L G M H L F G N R F C L A R V K D G P V V C S R K N F D S L L W A F V T V F q i L T Q E D N V V M Y D	719
EL2		
AIJ29365.1	G M L A R G K W A A I Y F L A L V T L G N Y V L L N L L V A I L V N G F Q E Q e k d E K N R K K D L T A K M G R A L K H	980
RDD42051.1	G M L A R G K W A A I Y F L A L V T L G N Y V L L N L L V A I L V N G F Q E Q e k d E K N R K K D L T A K M G R A L K H	1007
XP_002109544.1	G M L A R G K W A A I Y F L A L V T L G N Y V L L N L L V A I L V N G F Q E Q e k d-----	760
AIJ29365.1	Y C D S I T D V R S E D Q P A N R Q V N A P D E N S G Y Q V G R D L Q G I P T T Q I V E G Y G K S T P I C D H Q S C A	1040
RDD42051.1	Y C D S I T D V R S E D Q P A N R Q V N A P D E N S G Y Q V G K D L Q G I P T T Q I V E G Y G K S T P I C D H Q S C A	1067
XP_002109544.1	----- L Q I P T T Q I V E G Y G K S T P I C D H Q S C A	788
AIJ29365.1	M E S S A L N Q S N K R E E D G S Q T E F Y I R T F Q S S L S C N H N Q E E E Q Q L P N L V D P N E V Q I F P C R	1100
RDD42051.1	M E S S A L N Q S N K R E E D G S Q T E F Y I R T F Q S S L S C N H N Q E E E Q Q L P N L V D P N E V Q I F P C R	1127
XP_002109544.1	M E S S A L S Q S N K R E E D G S Q T E F Y I R T F Q S S L S C N H N Q E E E Q Q L P N L V D P N E V Q I F P C R	848

Рис. 5. Начало.

AIJ29365.1	VPIGPRDPPQSKNKFAKLRRRLMPw	SKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLLI	1160
RDD42051.1	VPIGPRDPPQSKNKFAKLRRRLMPw	SKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLLI	1187
XP_002109544.1	VPIGPRDPPQSKNKFAKLRRRLMPw	-sKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLLI	907
AIJ29365.1	LPKENrfrkWCKNVVK	NPYFDRIILVVIIFNCVTLAMERPGIDPNSmeRHFLNLMVIIIFT	1220
RDD42051.1	LPKENrfrkWCKNVVK	NPYFDRIILVVIIFNCVTLAMERPGIDPNSmeRHFLNLMVIIIFT	1247
XP_002109544.1	LPKENrfrkWCKNVVK	NPYFDRIILVVIIFNCVTLAMERPGIDPNSmeRHFLNLMVIIIFT	967
AIJ29365.1	FIFTSEMIIk	vLALGLVTGDKSYLRNGWNVLDLLLVIIISWVDLIITYTGGASNILGVLRI	1280
RDD42051.1	FIFTSEMIIk	vLALGLVTGDKSYLRNGWNVLDLLLVIIISWVDLIITYTGGASNILGVLRI	1307
XP_002109544.1	FIFTSEMIIk	v-----vTGDKSYLRNGWNVLDLLLVIIISWVDLIITYTGGASNILGVLRI	1022
AIJ29365.1	LRGFRTLRLrv	INRAPGLKLVVQTLFSSSLKAIGNIVIICVAFFVIFGILGVq1FSGKFY	1340
RDD42051.1	LRGFRTLRLrv	INRAPGLKLVVQTLFSSSLKAIGNIVIICVAFFVIFGILGVq1FSGKFY	1367
XP_002109544.1	LRGFRTLRLrv	INRAPGLKLVVQTLFSSSLKAIGNIVIICVAFFVIFGILGVq1FSGKFY	1082
AIJ29365.1	YCKATDDVENKTQCVEQYGLSEWVNRPNYFDDL	VnaSLSLFVISSKDGWMDITYHGIDAR	1400
RDD42051.1	YCKATDDVENKTQCVEQYGLSEWVNRPNYFDDL	VnaSLSLFVISSKDGWMDITYHGIDAR	1427
XP_002109544.1	YCKATDDVENKTQCVEQYGLSEWVNRPNYFDDL	VnaSLSLFVISSKDGWMDITYHGIDAR	1142
EL3			
AIJ29365.1	GVDLqpKKNHNVVLLYFISFLLLVGFFVLMFVGVVVENFHKQEE	HERRQREKKRNRK	1460
RDD42051.1	GVDLqpKKNHNVVLLYFISFLLLVGFFVLMFVGVVVENFHKQEE	HERRQREKKRNRK	1487
XP_002109544.1	GVDLqpKKNHNVVLLYFISFLLLVGFFVLMFVGVVVENFHKQEE	HERRQREKKRNRK	1202
AIJ29365.1	LQRAKKNQNKANAKkV--I	-IKKKVKEKKKNIIPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITIT	1517
RDD42051.1	LQRAKKNQNKANAKkV--I	-IKKKVKEKKKNIIPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITIT	1544
XP_002109544.1	LQRAKKNQNKANAK	SVSQIFCikKVKEKKKNIIPVEDYPAWRRKLYRFCVHRYFDITIT	1262
AIJ29365.1	IVIAVNIIFMATEHYKMSqa	WEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIHLVAFGVVYFRDrwNIF	1577
RDD42051.1	IVIAVNIIFMATEHYKMSqa	WEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIHLVAFGVVYFRDrwNIF	1604
XP_002109544.1	IVIAVNIIFMATEHYKMSqa	WEEVHKYANYFFTVVFTLEAVIHLVAFGVVYFRDrwNIF	1322
AIJ29365.1	DLIVILSWTGIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVri	LKLIKAAKGIALLRTIMNA	1637
RDD42051.1	DLIVILSWTGIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVri	LKLIKAAKGIALLRTIMNA	1664
XP_002109544.1	DLIVILSWTGIIESQVLSNPTINPTIIRVMRLLRIVri	LKLIKAAKGIALLRTIMNA	1382
AIJ29365.1	MPqvVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCGLSQHANEKTFGMAMTLFRIA		1697
RDD42051.1	MPqvVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCGLSQHANEKTFGMAMTLFRIA		1724
XP_002109544.1	MPqvVNLGMLFFLLFFIFAALGIELFGRldCTTDNPNCGLSQHANEKTFGMAMTLFRIA		1442
EL4a			
AIJ29365.1	TGDNWQGILqdTLRENCDRSENCQONCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNVVVAVLMKH		1757
RDD42051.1	TGDNWQGILqdTLRENCDRSENCQONCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNVVVAVLMKH		1784
XP_002109544.1	TGDNWQGILqdTLRENCDRSENCQONCCSNPILSSLFFVIFVLAQYVLTNVVVAVLMKH		1502
EL4b			
AIJ29365.1	LEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNYYPPGLTDIHLSSNHKNLKDIGEDYT		1817
RDD42051.1	LEESDEKENNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNYYPPGLTDIHLSSNHKNLKDIGEDYT		1844
XP_002109544.1	LEESDEKe-----		1510
AIJ29365.1	THQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKS	TLDOAENEVVMQDKFQVHDIRTK	1877
RDD42051.1	THQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKS	TLDOAENEVVMQDKFQVHDIRTK	1904
XP_002109544.1	-----		1510
AIJ29365.1	SSYPLDDHDDVEDQMELTASIHENRKLHRQGNQSDDGHPYLQQHSPLFRHQSYESNCHH		1937
RDD42051.1	LSYPLDDHDDVEDQMELTASIHENRKLHRQGNQSDDGHPYLQQHSPLFRHQSYESNCHH		1964
XP_002109544.1	-----		1510
AIJ29365.1	GSIQSDFNFSNLSSDTSSFSSENPLKSNNSKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKslKRSN		1997
RDD42051.1	GSIQSDFNFSNLSSDTSSFSSENPLKSNNSKDNPTDRDIYTADDLNRILSKKRKslKRSN		2024
XP_002109544.1	-----		1510
AIJ29365.1	SWDFSFTSEFSNHRRYPCKSKKTIYPFHYPSTKLSKDDSTIPDQPMVVIKEKKVTLPRK		2057
RDD42051.1	SWDFSFTSEFSNHRRYPCKSKKTIYPFHYPSTKLSKDDSTIPDQPMVVIKEKKVTLPRK		2084
XP_002109544.1	-----		1510
AIJ29365.1	MIQTLv	2063	
RDD42051.1	MIQTLv	2090	
XP_002109544.1	-----	1510	

Рис. 5. Множественное выравнивание полипептидов AIJ29365.1, RDD42051.1 и TRIADDRAFT_21513, N-концевой пептид отмечен зеленым цветом, лидерный фрагмент с сайтом сплайсинга (LSS) и его укороченная форма (Δ LSS) выделены желтым, AID-фрагмент обозначен черным, внутренняя срединная петля IML – серым, C-концевой фрагмент – светло-серым, сайты связывания иона кальция окрашены красным, аминокислотные замены – бирюзовым, короткие вставки и делеции – голубым, IEHNP-сайт – малиновым, желтым шрифтом маркирована последовательность «зонда», жирным шрифтом – позиции каналаобразующих доменов I–IV, линии подчеркивания обозначают внешние аминокислотные петли, сайты сплайсинга PHK отмечены прописью.

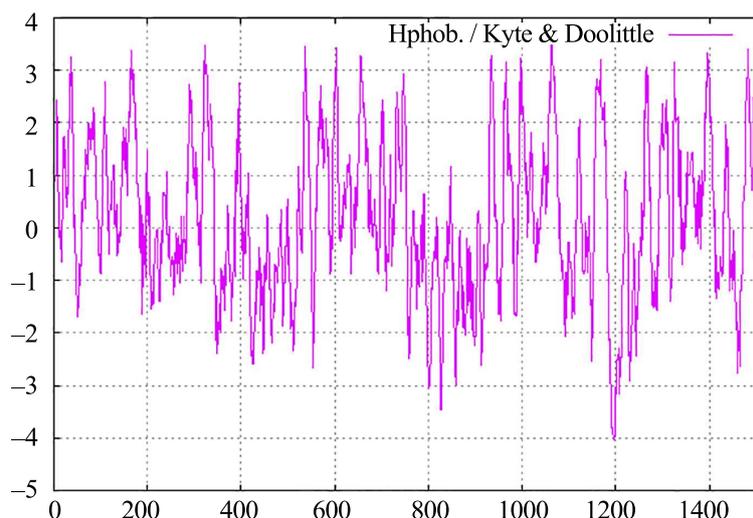


Рис. 6. Масштабный профиль гидропатии Kyte-Doolittle с окном 9 предполагаемого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens*, номер позиции в последовательности – по абсциссе, счет – по ординате.

зрелого транскрипта, выявленные в полипептиде TRIADDRAFT_21513. Например, это точечная делеция в IML-петле, делеция 4 аминокислотных остатков в доле III и короткая вставка с заменой из 7 aa в линкере, соединяющем доли III и IV. Существенно, что все изменения произошли в непосредственной близости от участков сплайсирования РНК. Следует также отметить полное отсутствие С-концевой части в полипептиде TRIADDRAFT_21513, в отличие от белков AII29365.1 и RDD42051.1 из штаммов H1 и H2 соответственно (рис. 5).

Особо следует подчеркнуть идентичное расположение сайтов связывания ионов Ca^{2+} во всех трех белках, образующих EEDD-селективный фильтр [6, 23, 24]. Данное обстоятельство позволяет утверждать, что полипептид TRIADDRAFT_21513 является кальциевым каналом семейства Ca_v3 (рис. 5).

На Phyge2-сервере по единичному шаблону натриевого канала с наибольшим количеством очков и с 100%-й доверительной вероятностью были смоделированы 1139 аминокислотных остатка, составляющие 75% общей последовательности белка TRIADDRAFT_21513. Дополнительно 1375 остатков (91%) были смоделированы с доверительной вероятностью >90% с использованием нескольких шаблонов, что позволило выявить коровую структуру белка TRIADDRAFT_21513, схожую с каналами AII29365.1 и RDD42051.1 (рис. 4). Полученная 3D-модель представляет характерную структуру тетрамерного Ca_v3 -канала, включающую по шесть трансмембранных α -спиралей (сегменты S1-S6) в каждом из четырех гомологичных повторов (I-IV).

Профили гидропатии и анализ вторичной последовательности белка TRIADDRAFT_21513 показывают, что AID-вставка между повторами I и II со стороны цитоплазмы клетки представляет структуру «спираль–петля–спираль» (gating brake structure) с последующей длинной аминокислотной петлей (рис. 6, 8) [6].

Восстановление функций отдельных модулей Ca_v3 -каналов трихоплаксы. При поиске в базах данных использовали аминокислотные последовательности изучаемых пептидов, а также прилегающие к ним участки, образующие вместе последовательности «зондов» (рис. 5, табл. 3, 4). Отметим, что AID-мотив белка TRIADDRAFT_21513 короче, чем его аналог в полипептидах AII29365.1 и RDD42051.1. Было обнаружено, что AID-зонд из TRIADDRAFT_21513 имеет гомологии в каналах Т-типа костистых рыб (табл. 5), тогда как AID-зонд из AII29365.1 и RDD42051.1 имеет гомологии в соответствующих белках костистых рыб и змей (табл. 6).

Например, AID-зонд предполагаемого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* показал 45% (32/71) гомологии с $\alpha 1$ -субъединицей потенциалзависимого кальциевого канала Т-типа XM_019071747.1 из костистой рыбы *Cyprinus carpio* при счете 62.8 и ожидании $4e^{-08}$ (рис. 8). Особо следует обратить внимание на высококонсервативную последовательность IENHNQP, которая входит в состав «зонда», но расположена ниже по аминокислотной последовательности чем AID-мотив, а именно, в начале второго повтора между сегментами S1 и S2. Данный сайт встречался возле AID-мотива костистых рыб, в то время как похожий сайт IENHNQP был найден рядом с AID-мотивом змей. Последняя

Таблица 3. Последовательности регуляторных пептидов из Ca_v3-каналов трихоплекса

Пептид	Аминокислотная последовательность
N-концевой пептид	mdisfaiipfnyn
LSS	ypfidgfniiinyMRSIIINFYFLYPHSKSIGLNFCLT
ΔLSS, укороченный вариант LSS	MRSIIINFYFLYPHSKSIGLNFCLT
AID-мотив из Cav3-каналов AIJ29365.1 и RDD42051.1	VTKKARNSPSAIRSRRGSFSTLSSSAESRTCYNETIRLIRRIILYIAYLIQQFYSRCLK KIWNRLYNRCLICKRKWSSRHQRSTSMSESRVNGNAKFTSDDQRLDRLHQNFF LPDIDGSCSLDGTERTSTYLAFLDNRQSRYSQNTTTTTSQIYQESALRDRLGKRN GDLAINNSLYDGTDDNDGDTPIHPLESNTELQLFNFQLRHQPDPGVSLTTDLNKL PTNYQKQKQIRRLRVRCCIFTKSQK
AID-мотив из белка TRIADDRAFT_215	VTKKARNSPSAIRSRRGSFSTLSSSAESRTCYNETIRLIRRIILYIAYLIQQFYSRCLK KISTYLAFLDNRQSRYSQNTTTTTSQIYQESALRDRLGKRNGLAINNSLYDGT TDNDGDTPIHPLESNTELQLFNFQLRHQPDPGVSLTTDLNKLNTNYQKQKQIRRL RVRCCIFTKSQK
IML из AIJ29365.1	EKNRKKDLTAKMGRALKHYCDSITDVRSEDQPANRQVNAPDENSGYQVGRDLQ GIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCAYCDSITDVRSEDQPANRQVNAPDENSGYQV GRDLQGIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCAVPIGPRDPPQSKNKFALRRLMPWK SKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLILPKENRFRKWCKNVVK
IML из TRIAD-DRAFT_215	LQGIPTTQIVEGYGKSTPICDHQSCAMESSALSQSNKREEDGDSQTEFYIRTFQS SSLSCNHNQEEEEQQQLPNLVDPNVQIFPCRVPIGPRDPPQSKNKFALRRLMP WSKQKWQAIRRKYWICPEEVNPNWLTRHRNHSLILPKENRFRKWCKNVVK

короткая последовательность была также обнаружена с помощью MOTIF Search в банке данных UniProt/SWISS-PROT внутри α-II субъединицы кальциевых каналов Т-типа у крысы (CAC11_RAT) и человека (CAC11_HUMAN).

Далее было показано, что полипептидный фрагмент IML располагается с внутренней стороны мембраны в виде неупорядоченного клубка и соединяет повторы II и III в белках AIJ29365.1 и RDD42051.1, а предполагаемый Ca_v3-канал TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* имеет делецию в начале IML-аминокислотной петли (рис. 5, 6). Поиск подобных последовательностей в других организмах не выявил значимых гомологий. При соответствующем анализе также не было обнаружено сходство с линкером III–IV, кото-

рый представляет цитоплазматическую структуру «α-спираль–клубок» между повторами III и IV. Кроме того, С-концевой фрагмент кальциевых каналов AIJ29365.1 и RDD42051.1, который отсутствует в белке TRIADDRAFT_21513 (рис. 5), тоже не демонстрировал существенных гомологий при использовании программ BLASTp и tBLASTn против баз nr, pdb, wgs и tsa (табл. 7).

В заключение следует отметить, что нам не удалось обнаружить значимые гомологии для N-концевого пептида, LSS/ΔLSS пептида, IML-соединительной аминокислотной петли, линкера III–IV и С-концевого фрагмента ни с помощью алгоритма BLAST, использующего основное локальное выравнивание, ни с применением алгоритма PHMMER, имплементирующего скрытую

Таблиц. 4. Примеры запросов (Query) или виртуальных зондов при поиске в информационных базах данных

Пептид	Аминокислотная последовательность
N-концевой пептид	mdisfaiipfnyn
LSS	ypfidgfniiinyMRSIIINFYLFLYPHSHSIGLNFCLT
Δ LSS, укороченный вариант LSS	MRSIIINFYLFLYPHSHSIGLNFCLT
C-фрагмент AID-мотива, из каналов AIJ29365.1 и RDD42051.1 с прилегающим N-фрагментом из повтора II	CKRKWSSRHQRSTSMSESRVNGNAKFTSDDQRLDRLHQNFFLPDIDGSCSLSDG TERSTYLAFRLDNWRQRSYSQNTTTTTSQIYQESALRDRLGKRNGDLAINNSLYD GTTDNDGDTPIHPLESNTELQLFNFQLRHQPDGVSLLTDLNKPNTNYQKQKQRI RRLRVRCCIFTKSQKFSLIVLFAILANTIVMAIEHHNQPTYQIQALEVCNIIFTIFFTL
C-фрагмент AID-мотива из белка TRIAD-DRAFT_215 с прилегающим N-фрагментом из повтора II	STYLAFRLDNWRQRSYSQNTTTTTSQiyQESALRDRLGKRNGDLAINNsLYDGTDD NDGDTPIHPLESNTELQLFNFQLRHQPDGVSLLTDLNKLNTNYQKQKQIRRLR VRCCIFTKSQKFSLIVLFAiIANTIVMAIEHHNQPTYQIQALEVCNIIFTIFFTL
IML-фрагмент	EKNRKKDLTAKMGRALKHYCDSITDVRSEDQPANRQVNAPDENSGYQVG
C-концевой фрагмент	NNDLDPGSSSAKESQGLDDGMTESNNYPPGLTDIHLSSNHKNLNDKIGEDYTT HQFDQNHTLKSPLPYQNKYARITVSRISITAIVPQKSVLDQAENEVVMQDKFQVHD IRTKLSYPLDDHDDVEDQMELTASIHENRKLHRQGNQSDDGHPYLQQHSPLF RHQSYESNCHHGSIQSDFNSFSNLSSDTSFSSENPLKSNNSKDNPTRDRIYTADD LNRILSKKRKSLKRSNSWDFSFTSEFSNHRRYPCSKKKTYPFHYPSTKLSKDDST ISDQPMVVIAKEKKVTLPRKMIQTLV

марковскую модель, что подчеркивает уникальность и функциональную значимость данных структур в кальциевых каналах у трихоплакса (табл. 7).

Визуализация полученных данных и их интерпретация. При анализе геномов *Trichoplax adhaerens* H1 [3] и *Trichoplax* sp. H2 [19] мы обнаружили ген 6750759 в локусе TRIADDRAFT_21513 на скаффолде *T. adhaerens* (штамм Grell-BS-1999), кодирующий гипотетический полипептид TRIADDRAFT_21513 с идентификатором XP_002109544.1 длиной 1510 аа, у которого отсутствует C-концевой фрагмент, и аннотировали этот белок как низковольтный потенциалзависимый кальциевый канал семейства Ca_v3 . Особенностями данного белка являются делеция N-кон-

цевого пептида, а также укороченные LSS-пептид, AID-фрагмент и IML-соединительная петля, несущие редкие аминокислотные замены. Кроме того, в доле III обнаружена делеция сегмента LALGL из 5 аминокислот, а также индел длиной 7 аа в линкере III–IV (рис. 5, табл. 7). Тем не менее, белок TRIADDRAFT_21513 проявлял на обширных участках полную гомологию с Ca_v3 -каналами AIJ29365.1 и RDD42051.1 из *T. adhaerens* H1 и *Trichoplax* sp. H2 соответственно (рис. 5), что позволило построить пространственные модели всех трех кальциевых каналов (рис. 4). Следует отметить большее структурное соответствие между полипептидами AIJ29365.1 и RDD42051.1 из штаммов трихоплакса H1 и H2 (рис. 3) по сравнению с белками AIJ29365.1 и TRIADDRAFT_21513

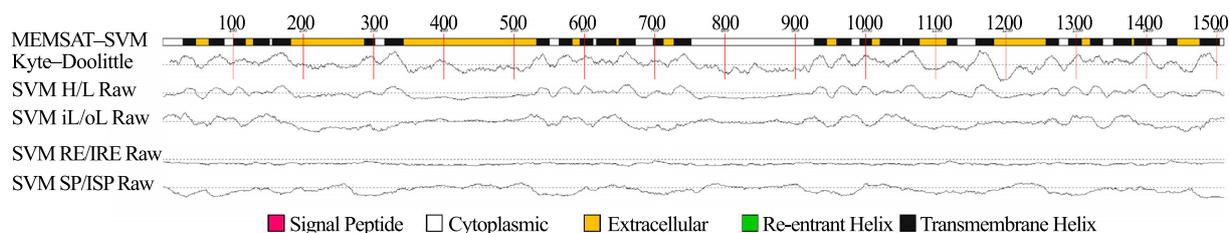


Рис. 7. Доменная структура и профили гидропатии предполагаемого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens*, позиции аминокислотных остатков на полипептидной цепи обозначены вертикальными красными отрезками через каждые 100 аа, белым, темным и желтым цветом отмечены цитоплазматические, трансмембранные и внеклеточные участки/домены, соответственно, вдоль полипептидной цепи изображены один под другим профили гидропатии, рассчитанные разными методами: Kyte-Doolittle, SVM H/L Raw, SVM iL/oL Raw, SVM RE/IRE Raw и SVM SP/ISP Raw, где SVM – Support Vector Machine.

из *T. adhaerens* H1 (рис. 5). Данный факт может свидетельствовать в пользу независимой эволюции данных каналов по пути дифференцировки и приобретения новых функций.

Нам не удалось выяснить точное функциональное значение N-концевого пептида, участка

LSS/ Δ LSS, петли IML, линкера III–IV и C-концевого фрагмента с помощью поиска гомологичных известных структур. Тем не менее местоположение данных фрагментов внутри молекулы белка и их строение дает основание делать предположения относительно их функциональности.

Таблица 5. Гомологи AID-зонда из предполагаемого потенциалзависимого Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens*, обнаруженные в костистых рыбах (BLASTp против nr)

Организм	BLAST-категория	BLAST-счет	Организм	BLAST-категория	BLAST-счет
<i>Cyprinus carpio</i>	Костистые рыбы	62.8	<i>Gadus morhua</i>	Костистые рыбы	60.1
<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	Костистые рыбы	62.8	<i>Oryzias latipes</i>	Костистые рыбы	60.1
<i>Carassius auratus</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Neolamprologus brichardi</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Oryzias melastigma</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Ictalurus punctatus</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Takifugu rubripes</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Danio rerio</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Mastacembelus armatus</i>	Костистые рыбы	59.7
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Nothobranchius furzeri</i>	Костистые рыбы	59.3
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Костистые рыбы	59.3
<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Larimichthys crocea</i>	Костистые рыбы	59.3
<i>Gymnodraco acuticeps</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Костистые рыбы	58.9
<i>Anabas testudineus</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Poecilia mexicana</i>	Костистые рыбы	58.9
<i>Clupea harengus</i>	Костистые рыбы	60.5	<i>Xiphophorus hellerii</i>	Костистые рыбы	58.9
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Костистые рыбы	60.1			

Таблица 6. Гомологи AID-зонда из низковольтных потенциалзависимых Cav3-каналов A1J29365.1- и RDD42051.1-штаммов трихоплакса H1 и H2 соответственно, найденные в других животных (BLASTp против nr)

Организм	BLAST-категория	BLAST-счет	Организм	BLAST-категория	BLAST-счет
<i>Cyprinus carpio</i>	Костистые рыбы	62.4	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	Костистые рыбы	62.4	<i>Hippocampus comes</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	Костистые рыбы	62.0	<i>Parambassis ranga</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Carassius auratus</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Anabas testudineus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Ictalurus punctatus</i>	Костистые рыбы	61.6	<i>Cottoperca gobio</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Danio rerio</i>	Костистые рыбы	61.2	<i>Poecilia reticulata</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Cyclopterus lumpus</i>	Костистые рыбы	60.8	<i>Betta splendens</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Notechis scutatus</i>	Змеи	60.8	<i>Sander lucioperca</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Thamnophis elegans</i>	Змеи	60.5	<i>Amphiprion ocellaris</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	Костистые рыбы	60.5	<i>Larimichthys crocea</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Костистые рыбы	60.5	<i>Etheostoma spectabile</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Clupea harengus</i>	Костистые рыбы	60.1	<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Pantherophis guttatus</i>	Змеи	60.1	<i>Gouania willdenowi</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Костистые рыбы	60.1	<i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Thamnophis sirtalis</i>	Змеи	59.7	<i>Stegastes partitus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Perca flavescens</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Takifugu rubripes</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Labrus bergylta</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Salarias fasciatus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Gadus morhua</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	Костистые рыбы	58.5
<i>Neolamprologus brichardi</i>	Костистые рыбы	59.3	<i>Xiphophorus couchianus</i>	Костистые рыбы	58.2
<i>Mastacembelus armatus</i>	Костистые рыбы	58.9	<i>Poecilia mexicana</i>	Костистые рыбы	58.2
<i>Astyanax mexicanus</i>	Костистые рыбы	58.9	<i>Poecilia formosa</i>	Костистые рыбы	58.2
<i>Nothobranchius furzeri</i>	Костистые рыбы	58.5			

Таблица 7. Функциональные аминокислотные последовательности внутри низковольтных потенциалзависимых Ca_v3-каналов трихоплакса

Полипептид	Длина, aa	Присутствие в кальциевом канале			Свойства
		AIJ29365.1	RDD42051.1	XP_002109544.1	
N-концевой пептид	13	+	–	–	Значимые совпадения отсутствуют
LSS / ΔLSS	40 / 27	–	+	Укороченный фрагмент	Уникальный пептид с неизвестной функцией
AID-мотив	247 / 181	+	+	Укороченный фрагмент	Внутренний затвор канала между повторами I и II
Петля IENHNQP	7	+	+	+	Соединяет снаружи трансмембранные сегменты IIS1 и IIS2 в повторе II
IML	214 / 162	+	+	Укороченный фрагмент	Линкер между повторами II и III
Линкер III–IV	61 / 64	+	+	Удлиненный фрагмент	α-Спираль–клубок между повторами III и IV
C-концевой фрагмент	298	+	+	–	Уникальный неупорядоченный внутренний пептид

Например, участок LSS/ΔLSS располагается непосредственно перед сегментом IS1 сенсорного домена в повторе I, а аминокислотный состав данного пептида позволяет гидрофобное взаимодействие с неизвестным фактором, что указывает на возможную модуляцию проводимости канала. Кроме того, пространственное положение петли IENHNQP в белке между трансмембранными сегментами IIS1 и IIS2 с наружной стороны мембраны клетки (рис. 9) и ее высокий консерватизм в различных таксономических группах позволяют предположить, что она определяет чувствительность потенциалзависимого кальциевого канала.

Детальное изучение структуры сенсорного домена во второй доле гипотетического низковольтного потенциалзависимого кальциевого канала TRIADDRAFT_21513 (рис. 10) показывает, что аминокислотная петля IENHNQP с двумя положительно заряженными гистидинами H551 и H552, соединяющая сегменты IIS1 и IIS2, может

электростатически взаимодействовать с потенциалчувствительным сегментом IIS4, несущим положительно заряженные аминокислотные остатки K614, R620, R623, R626, K629 и R632. Как известно, сегмент IIS4 играет решающую роль в конформационном переходе кальциевого канала, индуцированном изменением потенциала покоя, что, в свою очередь, регулирует проницаемость поры и поток ионов Ca²⁺ [25–27]. Таким образом, изменение заряда петли IENHNQP в результате аминокислотной замены N→E с нейтрально заряженного остатка Asn553 на положительно заряженный остаток Glu может иметь драматический эффект на взаимодействие линкера IIS1–S2 с подвижным сегментом IIS4, а следовательно, повлиять на чувствительность кальциевого канала.

В противоположность рассматриваемой возможности были обнаружены две несущественные аминокислотные замены в сенсоре II, изучаемых

Query	94	KLTNYQKLKQRIRRLRVRCCIFTKSQKFSLIVLFAILANTIVMA	IEHHNQPT	YQIQALEV	153
		K T + K K +RV+ +S+ F+ ++ AIL NTI M	IEHHNQPT	LE+	
Sbjct	1633	KRTCFGKCKDVWDEMRVKLWGVESKYFNRGIMIAILINTISMG	IEHHNQPT	DELTVNLEI	1812
Query	154	CNIIFTIFFTL			164
		CNI+FT FTL			
Sbjct	1813	CNIVFTSMFTL			1845

Рис. 8. Выявленная гомология между AID-зондом Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens* (Query) и аналогичной структурой в потенциалзависимом кальциевом канале T-типа XM_019071747.1 *Cyprinus carpio* (Sbjct), последовательность IEHHNQPT выделена цветом.

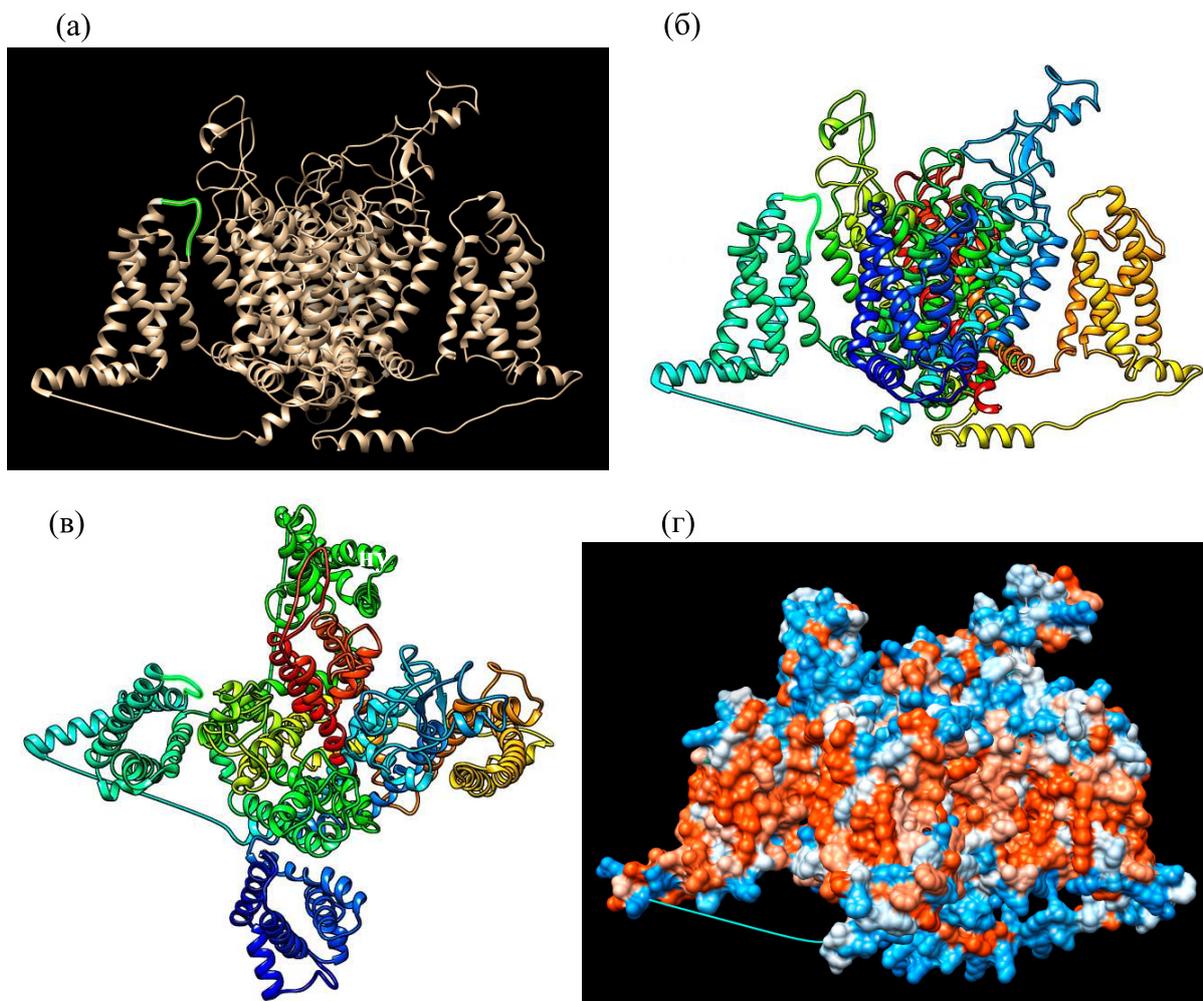


Рис. 9. Пространственное представление Ca_v3 -канала TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens*: (а) – положение консервативной петли IEHHNQPT в экстрацеллюлярном пространстве, образующей соединение между сегментами S1 и S2 в доле II, что отмечено зеленым цветом; (б, в) – взаимное расположение 4 долей белка, окрашенных от синего к красному следуя направлению полипептидной цепи от N- к C-концу, представлены: вид сбоку с долей I на переднем плане и вид сверху с долей I внизу и далее по часовой стрелке соответственно; (г) – поверхность трансмембранного белка, где красным цветом обозначены гидрофобные участки, тонкие линии заменяют потерянные в процессе моделирования части и соединяют соответствующие фрагменты белка.

кальциевых каналов трихоплакса. Так, позитивный гидрофильный остаток His588 в линкере IIS2–S3 белка TRIADDRAFT_21513, обращенный в цитоплазму клетки, заменен на остаток аргинина с такими же свойствами в соответствующей

позиции в белке AII29365.1, а неполярный алифатический остаток Val604 в сегменте IIS3, расположенный на уровне верхнего липидного бислоя клеточной мембраны, заменен на похожий остаток изолейцина в белке RDD42051.1

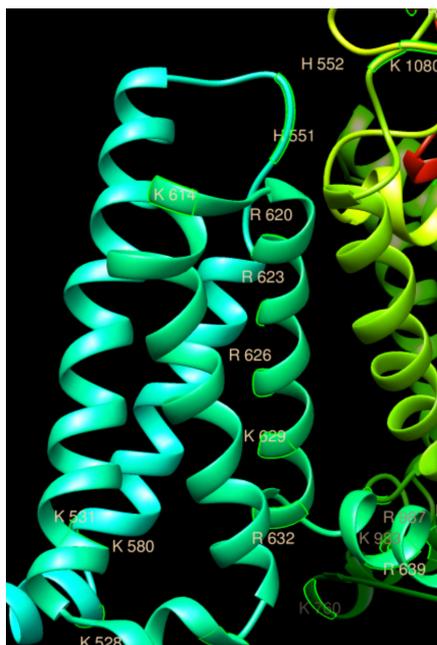


Рис. 10. Сенсорная часть повтора II в Ca_v3 -канале TRIADDRAFT_21513 *Trichoplax adhaerens*, N-конец сенсорного домена находится в левом нижнем углу. Светло-бирюзовая α -спираль IIS1 направлена по диагонали слева направо и снизу вверх в глубину на заднем плане сцены, где последовательно переходит в соединительную петлю IENHNQP с двумя положительно заряженными остатками гистидина H551 и H552. Далее IENHNQP-линкер поворачивает налево и преобразуется в более темную бирюзовую α -спираль IIS2, которая спускается из глубины на передний план. Внизу она превращается в гибкую петлю, поворачивает направо, уходит в глубину и преобразуется в светло-зеленую α -спираль IIS3, которая из глубины поднимается и выходит на передний план. Здесь она трансформируется в петлю, а затем превращается в зеленую регуляторную α -спираль IIS4, которая имеет 5 положительно заряженных аминокислотных остатков R620, R623, R626, K629 и R632, расположенных на одной стороне жесткой α -спирали. Предположительно, изменение поверхностного заряда мембраны с положительного на отрицательный приводит к частичному «всплыванию» α -спирали IIS4, что провоцирует ее поворот, вызывает структурную перестройку канала и открытие поры.

(рис. 5), что, вероятно, не влияет существенно на работу сенсорного домена.

Дополнительно следует отметить, что внешние петли у всех трех изучаемых белков оказались абсолютно схожими как в четырех сенсорных доменах, так и в каналобразующем домене (рис. 5). Данное обстоятельство подчеркивает их консерватизм. Петли EL1, EL2, EL3 и EL4a, EL4b, окружающие пору, имеют отрицательные значения гидропатии (табл. 8) [16]. Интересно, что при нейтральном значении pH петли EL1 и EL3, а также EL4a и EL4b приобретают отрицательный заряд и лишь петля EL2 заряжена положительно, что в целом благоприятно для притягивания катионов. Длинные петли EL1 и EL3 с негативным зарядом могут взаимодействовать с более короткой положительно заряженной петлей EL2, образуя купол над входом в канал, что, возможно, также влияет на его проницаемость для ионов кальция (рис. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ионы Ca^{2+} отличаются тем, что они не только несут заряд, но и являются вторичными мессен-

джерами. Зависимые от напряжения кальциевые каналы позволяют клеткам сопрягать электрическую активность с внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализацией [28]. Кальциевый канал образован $\alpha 1$ -субъединицей, в которую входят ион-проводящая пора, сенсоры напряжения и затвор канала, а также сайты регулирования проводимости канала вторичными мессенджерами, лекарствами и токсинами [29]. Коровая структура натриевых, калиевых и кальциевых каналов включает четыре полипептидных пучка, каждый из которых состоит из шести спиралей, где пять из этих трансмембранных сегментов (S1, S2, S3, S5, S6) являются гидрофобными, в то время как шестой (S4) положительно заряжен и служит в качестве датчика электрического потенциала [26, 30].

Низковольтные потенциалзависимые Ca_v3 -каналы ответственны за фазу деполяризации потенциала действия в большинстве электрически возбуждаемых клеток [31]. Тем не менее если у трихоплекса кальциевые каналы T-типа, возможно, принимают участие в секреции регуляторных пептидов и в управлении движением [32], то у человека встречаются множественные структурные

Таблица 8. Биохимические свойства внешних полипептидных петель изучаемых Ca_v3-каналов трихоплакса

Петля	Положение	Длина, aa	Молекулярная масса, кДа	Изоэлектрическая точка (pI)	Заряд при pH 7.00	GRAVY
EL1	IS5-P1	101	11.51	4.59	-3.8	-0.361
EL2	IIS5-P1	19	2.09	8.82	1.9	-0.258
EL3	IIIS5-P1	39	4.67	4.17	-3.1	-0.879
EL4a	IVS5-P1	27	2.99	5.51	-0.9	-0.563
EL4b	IVP2-S6	7	2.00	4.43	-1.2	-1.459

Примечание. Значение GRAVY (grand average of hydropathy) рассчитывается путем сложения значений гидропатии для каждого остатка и деления суммы на число остатков в последовательности.

и функциональные изоформы Ca_v3-каналов, спектр действия которых гораздо шире: от выделения гормонов [33] и возбудимости гладкой мускулатуры [34] до активности нейронов при нормальном функционировании мозга, как глубокий сон, а также до патологических состояний, таких как эпилепсия [35].

Субъединичная структура свойственна многим кальциевым каналам [36]. Возможно, в нашем случае основная α 1-субъединица TCa_v3-канала трихоплакса штамма H2, в отличие от штамма H1, взаимодействует в цитоплазме клетки не только через AID-мотив, но и благодаря обнаруженному сегменту LSS с вспомогательной β -субъединицей кальциевого канала, которая, в свою очередь, связывается с RIM-регулятором экзоцитоза SNARE (soluble NSF attachment receptor), запуская высвобождение нейромедиатора [37, 38]. Также не исключено взаимодействие гидрофобного LSS-пептида с альтернативным внутриклеточным фактором с участием GPCR-рецепторов (G-protein coupled receptors), сопряженных с G-белками [39]. Предполагаемый механизм регуляции, включающий уникальную пептидную вставку возле сенсорного домена I, присутствует у *Trichoplax* sp. H2, но отсутствует у *Trichoplax adhaerens*. Другое отличие – это существенная делеция размером 52 aa в петле IML, соединяющей повторы II и III в гипотетическом белке TRIADDRAFT_21513, которая может модулироваться множеством клеточных регуляторов, как кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaM-

KII), протеинкиназы A (PKA), C (PKC) и G (PKG), протеинтирозинкиназа (ПТК), фосфолипаза C (PLC), полиненасыщенные жирные кислоты и другие макромолекулы [40]. Упомянутые структурные отличия в управлении потенциал-зависимыми Ca²⁺-каналами Т-типа могут быть причиной разного поведения штаммов трихоплакса H1 и H2 в электрических полях [41].

Интересно, что С-концевой фрагмент длиной 298 aa представляет неупорядоченный клубок, локализованный в цитоплазме, что может говорить о его участии в формировании надмолекулярного комплекса, так как, например, известно, что многие рибосомальные белки поодиночке образуют хаотические клубки, но структурируются при сборке в рибосому [42]. Данное наблюдение в меньшей степени относится и к IML-внутренней соединительной аминокислотной петле (рис. 5, табл. 8).

Наиболее изученным оказался AID-мотив длиной 181 aa в белке TRIADDRAFT_21513 и длиной 247 aa в белках AIJ29365.1 и RDD42051.1 (рис. 5, табл. 8). Схожие AID-фрагменты, включающие часть сенсора II, с низкой гомологией были обнаружены в 25 видах костистых рыб для белка TRIADDRAFT_21513 (табл. 5), а также в 41 виде костистых рыб и в 4 видах змей для белков AIJ29365.1 и RDD42051.1 (табл. 6). Минимальное расхождение в последовательностях AID-зонда TRIADDRAFT_21513 из *Trichoplax adhaerens* и AID-фрагмента XM_019071747.1 из *Cyprinus carpio*

при счете 62.8 и ожидании $4e^{-08}$ составило 32/71, т.е. 45% гомологии (рис. 8). Интересно, что возле AID-мотива костистых рыб, как и возле AID трихопакса в составе сенсора II, находится консервативный сайт IENHNQP, в то время как возле AID у змей располагается последовательность IENNEQP, отличающаяся заменой нейтрально заряженного остатка аспарагина на отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты. Особо следует отметить, что короткий IENNEQP-фрагмент был также найден в Ca_v3 -каналах крысы и человека. Полученные данные могут указывать не только на дивергенцию низкопороговых кальциевых каналов T-типа между рыбами и пресмыкающимися, но и на возможное изменение чувствительности Ca_v -каналов, а следовательно, и на реорганизацию их функции с выходом жизни на сушу.

Возможно, в отличие от трихопакса, у млекопитающих зависящие от напряжения кальциевые каналы T-типа представляют большие белковые комплексы, которые формируются за счет гидрофобных взаимодействий [43], где, например, линкер IS6–AID связывается с регуляторной β -субъединицей (PDB код 1T3L), что вызывает структурные перестройки, приводящие к изменению проницаемости канала для ионов кальция [44]. Исследования Ca_v -каналов с высоким разрешением привели как к пониманию тонкой структуры поры канала (6KZO) [45], так и указывают на наличие множественных регуляторных сайтов с внутренней и внешней сторон клеточной мембраны (6BYO) [46]. Так, в комплексе с основной $\alpha 1a$ -субъединицей кролика были охарактеризованы как цитоплазматическая β -субъединица, так и массивная внешняя $\alpha 2\delta$ -субъединица, а также трансмембранная γ -субъединица (5GJW) [47].

Обнаружение вставок и делеций, граничащих с сайтами сплайсирования РНК, во всех трех изучаемых белках с короткими интронами у трихопакса (табл. 1) позволяет по-новому взглянуть на возможную эволюцию кальциевых каналов с позиций функциональных вставок и модуляризации белков на основе механизма, отдаленно напоминающего альтернативный сплайсинг, обнаруженный в иммунной [48] и нервной [49] системах у организмов с высоким содержанием интронов. Просто устроенные Ca_v3 -каналы трихопакса дают возможность связать воедино функцию со структурой и определить отправную точку в усложнении и диверсификации кальциевых каналов вплоть до высокоорганизованных животных и человека. Дальнейшее усовершенствование методов реконструкции отдельных

белков, их высокомолекулярных комплексов и сети взаимодействия [50–52] позволяет надеяться на конечное понимание роли сопряжения сенсоров и актуаторов в живой клетке, а также механизмов взаимодействия отдельных клеток в мультклеточном организме.

ВЫВОДЫ

1. С помощью набора методов биоинформатики идентифицированы гомолог потенциалчувствительного кальциевого канала TCa_v3 RDD42051.1 длиной 2090 aa в геноме *Trichoplax* sp. H2 и неполный белок XP_002109544.1 длиной 1510 aa в скаффолде *Trichoplax adhaerens*.

2. Для обоих белков найден EEDD селективный фильтр и реконструирован кор кальциевого канала, состоящий из 24 трансмембранных α -спиралей. Исследуемые белки отличаются цитоплазматическими доменами, что свидетельствует об их различной специализации при проведении сигнала.

3. На основании анализа первичных транскриптов предполагается модульный механизм эволюции Ca_v3 -каналов, выполняющих разнообразные регуляторные функции, путем вставок и соединения белковых доменов за счет сплайсинга РНК.

4. На примере белков AIJ29365.1, RDD42051.1 и XP_002109544.1, последний из которых аннотирован впервые, продемонстрирована модульная архитектура кальциевых каналов и охарактеризованы функции некоторых доменов. Проведен анализ линкера IIS2-S3 белка XP_002109544.1, и описаны аминокислотные замены.

5. Изучение структуры сенсорного домена показало, что петля IENHNQP с двумя положительно заряженными гистидинами H551 и H552, соединяющая сегменты IIS1 и IIS2, может электростатически взаимодействовать с потенциалчувствительным сегментом IIS4, несущим положительно заряженные аминокислотные остатки. Следовательно, изменение заряда петли IENHNQP в результате замены нейтрального Asn553 на положительный Glu влияет на взаимодействие линкера IIS1-S2 с подвижным сегментом IIS4.

6. Возле AID-мотива костистых рыб, как и возле AID трихопакса в составе сенсора II, находится консервативный сайт IENHNQP, в то время как возле AID у змей располагается последовательность IENNEQP, отличающаяся заменой нейтрально заряженного остатка Asn на отрицательно заряженный остаток Glu. Это обстоятельство свидетельствует о дивергенции низкопороговых кальциевых каналов T-типа между рыбами и пресмыкающимися при выходе жизни на сушу.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Л.В. Пузаковой и М.В. Пузакову за любезное прочтение рукописи, а также за ценные советы и замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации по Постановлению № 220 (договор № 14.W03.31.0015 от 28.02.2017).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schulze F. E. *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zool. Anzeiger*, **6**, 92–97 (1883).
- Schulze F. E. Über *Trichoplax adhaerens*. *Physik Abh. Kgl. Akad. Wiss. (Berlin)*, **1**, 1–23 (1891).
- Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N. H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M. L., Signorovitch A. Y., Moreno M. A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I. V., Buss L. W., Schierwater B., Dellaporta S. L., and Rokhsar D. S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, **454** (7207), 955–960 (2008). DOI: 10.1038/nature07191
- Dellaporta S. L., Xu A., Sagasser S., Jakob W., Moreno M. A., Buss L. W., and Schierwater B. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103** (23), 8751–8756 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0602076103
- Signorovitch A. Y., Buss L. W., and Dellaporta S. L. Comparative genomics of large mitochondria in placozoans. *PLoS Genet.*, **3** (1), e13 (2007). DOI: 10.1371/journal.pgen.0030013
- Senatore A., Raiss H., and Le P. Physiology and Evolution of Voltage-Gated Calcium Channels in Early Diverging Animal Phyla: Cnidaria, Placozoa, Porifera and Ctenophora. *Front. Physiol.*, **7**, 481 (2016). DOI: 10.3389/fphys.2016.00481
- Ertel E. A., Campbell K. P., Harpold M. M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R. W., and Catterall W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25** (3), 533–535 (2000). DOI: 10.1016/s0896-6273(00)81057-0
- Rang H. P., Ritter J. M., Flower R. J., and Henderson G. *Rang & Dale's Pharmacology*, 8th Edition (Churchill Livingstone, 2014).
- Smith C. L., Abdallah S., Wong Y. Y., Le P., Harrack-singh A. N., Artinian L., Tamvacakis A. N., Rehder V., Reese T. S., and Senatore A. Evolutionary insights into T-type Ca²⁺ channel structure, function, and ion selectivity from the *Trichoplax adhaerens* homologue. *J. Gen. Physiol.*, **149** (4), 483–510 (2017). DOI: 10.1085/jgp.201611683
- Strong M., Chandy K. G., and Gutman G. A. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol. Biol. & Evolution*, **10** (1), 221–242 (1993). DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a039986
- Ishibashi K., Suzuki M., and Imai M.. Molecular Cloning of a Novel Form (Two-Repeat) Protein Related to Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270** (2), 370–376 (2000). DOI: 10.1006/bbrc.2000.2435
- Rahman T., Cai X., Brailoiu G. C., Abood M. E., Brailoiu E., and Patel S. Two-pore channels provide insight into the evolution of voltage-gated Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Science Signaling*, **7** (352), ra109 (2014). DOI: 10.1126/scisignal.2005450
- Warnier M., Gackière F., Roudbaraki M., and Mariot P. Expression and Role of T-type Calcium Channels during Neuroendocrine Differentiation. *J. Cell Signal.*, **1** (2), 113 (2016). DOI: 10.4172/2576-1471.1000113
- Kapustin Y., Souvorov A., Tatusova T., and Lipman D. Splign: algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. *Biol. Direct*, **3** (20), 1–13 (2008). DOI: 10.1186/1745-6150-3-20
- Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *BioTechniques*, **28**, 1102–1104 (2000). DOI: 10.2144/002861r01
- Kyte J. and Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157** (1), 105–132 (1982). DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0
- Kelley L. A. and Sternberg M. J. E. Protein structure prediction on the Web: A case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, **4** (3), 363–371 (2009). DOI: 10.1038/nprot.2009
- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., and Ferrin T. E. UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.*, **25** (13), 1605–1612 (2004). DOI: 10.1002/jcc.20084
- Kamm K., Osigus H. J., Stadler P. F., DeSalle R., and Schierwater B. *Trichoplax* genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Sci Rep.*, **8** (1), 11168 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-29400-y
- Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., and Sternberg M. J. The Phyre2 web portal for protein

- modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, **10** (6), 845–858 (2015). DOI: 10.1038/nprot.2015.053
21. Berrou L., Dodier Y., Raybaud A., Tousignant A., Dafi O., Pelletier J. N., and Parent L. The C-terminal Residues in the Alpha-interacting Domain (AID) Helix Anchor CaV β Subunit Interaction and Modulation of CaV2.3 Channels. *J. Biol. Chem.*, **280** (1), 494–505 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M410859200
 22. Findeisen F., Campiglio M., Jo H., Abderemane-Ali F., Rumpf C. H., Pope L., Rossen N. D., Flucher B. E., DeGrado W. F., and Minor D. L., Jr. Stapled Voltage-Gated Calcium Channel (CaV) α -Interaction Domain (AID) Peptides Act As Selective Protein-Protein Interaction Inhibitors of CaV Function. *ACS Chem. Neurosci.*, **8** (6), 1313–1326 (2017). DOI: 10.1021/acschemneuro.6b00454
 23. Cloues R. K., Cibulsky S. M., and Sather W. A. Ion Interactions in the High-Affinity Binding Locus of a Voltage-Gated Ca $^{2+}$ Channel. *J. Gen. Physiol.*, **116** (4), 569–586 (2000). DOI: 10.1085/jgp.116.4.569
 24. Cibulsky S. M. and Sather W. A. The Eeee Locus Is the Sole High-Affinity Ca $^{2+}$ Binding Structure in the Pore of a Voltage-Gated Ca $^{2+}$ Channel: Block by Ca $^{2+}$ Entering from the Intracellular Pore Entrance. *J. Gen. Physiol.*, **116** (3), 349–362 (2000). DOI: 10.1085/jgp.116.3.349
 25. Catterall W. A. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron*, **67** (6), 915–928 (2010). DOI: 10.1016/j.neuron.2010.08.021
 26. Jensen M. O., Jogini V., Borhani D. W., Leffler A. E., Dror R. O., Shaw D. E. Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science*, **336** (6078), 229–233 (2012). DOI: 10.1126/science.1216533
 27. Tuluc P., Yarov-Yarovoy V., Benedetti B., and Flucher B. E. Molecular Interactions in the Voltage Sensor Controlling Gating Properties of CaV Calcium Channels. *Structure*, **24** (2), 261–271 (2015). DOI: 10.1016/j.str.2015.11.011
 28. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. Ed. by S. Brady, G. Siegel, and R. W. Albers, 8th Edition (Elsevier, 2011). 1120 pages. ISBN-10: 0125468075.
 29. Catterall W. A., Striessnig J., Snutch T. P., and Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.*, **55** (4), 579–581 (2003). DOI: 10.1124/pr.55.4.8
 30. Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., and Minamino N. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, **312** (5990), 121–127 (1984). DOI: 10.1038/312121a0
 31. Akaike N., Kostyuk P. G., and Osipchuk Y. V. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* **412**, 181–195 (1989). DOI: 10.1113/jphysiol.1989.sp017610
 32. Senatore A., Reese T. S., and Smith C. L. Neuropeptidergic integration of behavior in *Trichoplax adhaerens*, an animal without synapses. *J. Exp. Biol.*, **220** (18), 3381–3390 (2017). DOI: 10.1242/jeb.162396
 33. Enyeart J. J., Mlinar B., and Enyeart J. A. T-type Ca $^{2+}$ channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1031–1040 (1993).
 34. Loirand G., Mironneau C., Mironneau J., and Pacaud P. Two types of calcium currents in single smooth muscle cells from rat portal vein. *J. Physiol.*, **412**, 333–349 (1989). DOI: 10.1113/jphysiol.1989.sp017619
 35. Huguenard J. R. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 329–348 (1996). DOI: 10.1146/annurev.ph.58.030196.001553
 36. Catterall W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3** (8), a003947 (2011). DOI: 10.1101/cshperspect.a003947
 37. Kiyonaka S., Wakamori M., Miki T., Uriu Y., Nonaka M., Bito H., Beedle A. M., Mori E., Hara Y., De Waard M., Kanagawa M., Itakura M., Takahashi M., Campbell K. P., and Mori Y. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle the vesicular SNARE protein synaptobrevin (syb) was dispensable for dockinganchoring to presynaptic Ca $^{2+}$ channels. *Nat Neurosci.*, **10** (6), 691–701 (2007). DOI: 10.1038/nn1904
 38. Smith C. L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Azzam R. N., Cooper B., Winters C. A., Eitel M., Fasshauer D., and Reese T. S. Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Curr. Biol.*, **24** (14), 1565–1572 (2014). DOI: 10.1016/j.cub.2014.05.046
 39. Yim Y. Y., Zurawski Z., and Hamm H. GPCR Regulation of Secretion. *Pharmacol. Ther.*, **192**, 124–140 (2018). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.07.005
 40. Zhang Y., Jiang X., Snutch T. P., and Tao J. Modulation of low-voltage-activated T-type Ca $^{2+}$ channels. *Biochim. Biophys. Acta*, **1828** (7), 1550–1559 (2013). DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.08.032
 41. Кузнецов А. В., Кулешова О. Н., Пронозин А. Ю., Кривенко О. В. и Завьялова О. С. Действие прямоугольных электрических импульсов низкой частоты на трихоплакса (тип Placozoa). *Морской биол. журн.*, **5** (2), 50–66 (2020). DOI: 10.21072/mbj.2020.05.2.05
 42. Uversky V. N. Dancing Protein Clouds: The Strange Biology and Chaotic Physics of Intrinsically Disordered Proteins. *J. Biol. Chem.*, **291**, 6681–6688 (2016). DOI: 10.1074/jbc.R115.685859
 43. Catterall W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca $^{2+}$ channels. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.*, **16** (16), 521–555 (2000). DOI: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
 44. Opatowsky Y., Chen C. C., Campbell K. P., and Hirsch J. A. Structural Analysis of the Voltage-Dependent Calcium Channel Beta Subunit Functional Core

- in Complex with Alpha1 Interaction Domain. *Neuron*, **42**, 387–399 (2004). DOI: 10.1016/S0896-6273(04)00250-8
45. Zhao Y., Huang G., Wu Q., Wu K., Li R., Lei J., Pan X., and Yan N. Cryo-EM structures of apo and antagonist-bound human Cav3.1. *Nature*, **576**, 492–497 (2019). DOI: 10.1038/s41586-019-1801-3
46. Cardozo T. J. and Martinez-Ortiz W. Residue assignment correction to the voltage gated calcium Cav1.1 rabbit alpha 1 subunit PDB entries 3JBR & 5GJV. *Cell Rep.*, **23**, 1399–1408 (2018). DOI: 10.2210/pdb6BYO/pdb
47. Wu J. P., Yan Z., Li Z. Q., Zhou Q., and Yan N. Structure of the mammalian voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex for ClassII map. *Nature*, **537**, 191–196 (2016). DOI: 10.2210/pdb5GJW/pdb
48. Maki R., Roeder W., Traunecker A., Sidman C., Wabl M., Raschke W., and Tonegawa S. The Role of DNA Rearrangement and Alternative RNA Processing in the Expression of Immunoglobulin Delta Genes. *Cell*, 1981 **24** (2), 353–365. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90325-1
49. Schmucker D., Clemens J. C., Shu Huidy, Worby C. A., Xiao Jian, Muda M., Dixon J.E., and Zipursky S. L. Drosophila Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell*, **101** (6), 671–684 (2000). DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80878-8
50. Leman J. K., Ulmschneider M. B., and Gray J. J. Computational modeling of membrane proteins. *Proteins*, **83** (1), 1–24 (2015). DOI: 10.1002/prot.24703
51. Martinez-Ortiz W., and Cardozo T. J. An Improved Method for Modeling Voltage-Gated Ion Channels at Atomic Accuracy Applied to Human Cav Channels. *Cell Rep.*, **23** (5), 1399–1408 (2018). DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.02452
52. Sebé-Pedrós A., Chomsky E., Pang K., Lara-Astiaso D., Gaiti F., Mukamel Z., Amit .I, Hejnol A., Degnan B. M., and Tanay A. Early metazoan cell type diversity and the evolution of multicellular gene regulation. *Nat. Ecol. Evol.*, **2** (7), 1176–1188 (2018). DOI: 10.1038/s41559-018-0575-6

Annotation of a New Low Voltage Activated Calcium Channel of *Trichoplax adhaerens* (Phylum Placozoa)

A.V. Kuznetsov* ** and L.E. Kartashov***

*Federal Research Center “A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas”, Russian Academy of Sciences, prosp. Nakhimova 2, Sevastopol, 299011 Russia

**Institute of Radio-electronics and Information Security, Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

***Department of Instrumental Systems and Automation of Technological Processes, Sevastopol State University, ul. Gogolya 12-14, Sevastopol, 299007 Russia

Studying the voltage-gated calcium channels sheds light on the formation of systems responsible for the coupling of sensors and actuators in a living cell. A homologue of 2090 aa length in the *Trichoplax* sp. H2 scaffold and an incomplete protein of 1510 aa length in the *Trichoplax adhaerens* scaffold were identified on the basis of the data on the voltage-gated calcium channel TCa_v3 (2063 aa) from the *Trichoplax adhaerens* cells. The incomplete hypothetical protein is annotated as Ca_v3-channel. An EEDD selective filter was found for all 3 proteins and the calcium channel core structure consisting of 24 trans-membrane α -helices was reconstructed. However, the studied proteins demonstrated significant variations in their cytoplasmic domains that indicates the different specialization of Ca_v3-channels in the signal transduction. So part of the AID motive (alpha-interacting domain) and the adjacent potential sensor from the annotated channel have homologies in 25 species of bony fish, and the corresponding region from both other channels in 41 species of bony fish and in 4 species of snakes was found. Significantly, a highly conserved IIS1-S2 loop with the IEHNNQP sequence was identified lower from the AID motif of bony fish, like in *Trichoplax*, while the homologous IEHHEQP sequence was revealed in snakes, which differs in the negative residue of glutamic acid that is also present in the corresponding proteins of the rat and human. A modular mechanism for the evolution of Ca_v3-channels by insertions and merging of protein domains that perform various regulatory functions is suggested based on the analysis of primary transcripts and mature proteins.

Keywords: trichoplax, Ca_v3-channels, domains, insertions, modular evolution