

## **ФІЛОГЕНЕТИНИЙ АНАЛІЗ ПОТЕНЦІЙНИХ КАЛІЄВИХ КАНАЛІВ РОДИНИ ТРК РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

**С. В. Ісаєнков**, старший науковий співробітник,

**Д. О. Самофалова**, провідний інженер

**ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»**

*Проведено біоінформаційний пошук послідовностей потенційних ТРК-каналів та узагальнення філогенетичного різноманіття родини ТРК. За допомогою низки спеціалізованих програм та онлайн сервісів проводився порівняльний аналіз та вирівнювання амінокислотних послідовностей потенційних представників ТРК-каналів. Після вторинного аналізу доменної архітектури порових ділянок 300 потенційних білків, було відібрано 157 каналів родини ТРК різних видів рослин. Подальший кладистичний аналіз показав, що родина ТРК-каналів рослин поділяється на чотири різних клади, показуючи ділення за типовими ознаками.*

**Ключові слова:** *двопорові калієві канали родини ТРК, доменна структура ТРК-каналів, кладистичний аналіз, філогенетичне дерево*

Представники родини двопорових каналів родини ТРК виконують різноманітні фізіологічні функції. За винятком однопорового родича AtKCO<sub>3</sub>, усі інші мембранні канали, які відповідають за транспорт калію мають дві пори з характерним амінокислотним підписом GYGD, що відповідає за селективність до калію (рис. 1). Цілком можливо, що однопоровий канал KCO<sub>3</sub> утворився внаслідок часткового відділення одного із селективних за калієм фільтрів та двох трансмембранних доменів (рис. 1). Було показано, що однопоровий канал AtKCO<sub>3</sub> із арабідопсису набуває функціональності лише за умови формування димерів [6, 15].

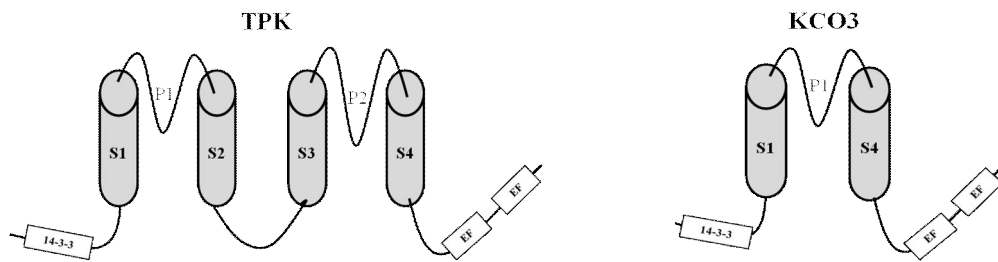


Рис. 1. Структура ТРК та КСО3 каналів в рослинах. Канали складаються з порових доменів (P) та трансмембранних доменів (S). Канали родини ТРК та КСО мають на своєму N-кінці 14-3-3 домени, що можуть зв'язуватись із 14-3-3 білками і таким чином регулювати активність цих каналів. Зазвичай С-кінець цих каналів містить EF-домени, що відповідають за зв'язування із іонами кальцію, внаслідок цього відбувається регуляція роботи цих каналів.

Канали родини ТРК мають структурну подібність до калієвих каналів із тандемним поровим доменом з клітин ссавців (рис. 1). Канали родини ТРК мають чотири трансмембранних домени, два порових регіони, що містять у собі амінокислотну послідовність GYGD. Такий амінокислотний «підпис» відповідає за селективність порових регіонів за калієм. Окрім того, слід зазначити, що більшість представників цих каналів мають EF- домени у С-терміналі, тому ці білки можуть регулюватись іонами кальцію. Багато представників родини ТРК також містять сайт зв'язування 14-3-3 білками у своєму N-терміналі.

Завдяки своїм структурним відмінностям, ТРК-канали виконують різні фізіологічні функції і можуть мати різну клітинну локалізацію. Вакуолярні канали родини ТРК були знайдені у геномах багатьох видів рослин від мохів роду *Physcomitrella* до евкаліпту. Найбільш вивченим представником ТРК-каналів є AtTRK1 із арабідопсису. Активність цього каналу залежить від значення рН у цитозолі та внутріклітинної концентрації кальцію. Як і більшість каналів цієї родини, AtTRK1 локалізований у тонопласті великих літичних вакуоль [3, 15]. Останні дослідження функцій та клітинної локалізації деяких представників родини ТРК свідчать про те, що існують

ТРК-канали із відмінною від тонопласта літичних вакуоль мембранною спеціалізацією. Зокрема відомо, що AtTPK4 з арабідопсису локалізується у плазматичній мембрані [1] і немає EF-доменів у C-терміналі. Раніше вважалося, що AtTPK3 локалізується у тонопласті центральної вакуолі, але останні дані свідчать про те, що цей канал має хлоропластну локалізацію [2, 15]. Цікавим фактом є те, що ТРК-канали із рису (OsTPKa та OsTPKb) локалізуються у вакуолях різних типів. OsTPKa специфічний для тонопласту літичної вакуолі, а у мембрані малих, за розміром, протеїнових вакуоль знаходиться OsTPKb [6, 7]. Схожий характер клітинної локалізації має представник родини ТРК із тютюну - NtTPK1b (таблиця) [8, 14]. Було показано, що канали цього типу локалізуються у везикулярних структурах подібних до протеїнових вакуоль. Слід відзначити, що хоча інші представники родини ТРК з арабідопсису, а саме AtTPK2 і AtTPK5 локалізуються в мембранах літичних вакуоль, існують експериментальні дані про те, що ці канали також можуть локалізуватися у менших за розміром везикулярних структурах (див. таблицю) [15].

Фізіологічна роль каналів родини ТРК є дуже різноманітною. Вони беруть участь у підтримуванні гомеостазу калію і генерації тургорного тиску. Канали цієї родини задіяні у багатьох процесах рослинних відповідей на дію абіотичних стресів [6]. Зокрема було показано, що AtTPK1 бере участь у русі продихових клітин [3]. На відміну від AtTPK1, ген якого експресується у всіх типах рослинних тканин, AtTPK2 є спеціалізованим каналом пилку, отже є важливим елементом у процесах запилення [1]. Рисовий OsTPKb завдяки своїй унікальній локалізації важливий для процесів формування насіння і збагачення його на мінерали. Існує низка даних, яка свідчить про те, що функція каналів цієї родини є надзвичайно важливою при сольовому та водному стресі [6]. Відомо, що активність NtTPK1a чутлива до дії спермідину і сперміну, а рівень транскриптів гена цього каналу підвищується за гіперосмотичних умов [4]. Показано, що експресія гена ТРК каналу із тополі в клітинах тютюну підвищувала їх стійкість проти сольового стресу [16].

Головні фізіологічні та функціональні характеристики деяких представників каналів родини ТРК

Білок	Експресія гену	Клітинна локалізація	Функція	Посилання
AtTRK1	Всі тканини	Тонoplast центральних вакуоль	Гомеостаз $K^+$ , вивільнення $K^+$ протягом руху продихових клітин, проростання насіння	1, 3
AtTRK2	Пилок	Тонoplast центральних вакуоль	Невідома	1, 2
AtTRK3	Кінцівки коренів, Пилок	Мембрана хлорпластів	Гомеостаз $K^+$ в хлоропластах	2, 5
AtTRK4	Пилок	Плазматична мембрана	Гомеостаз $k^+$	1,4
AtTRK5	Провідні тканини	Тонoplast центральних вакуоль	Невідома	1, 2
OsTRKa	Всі тканини	Тонoplast центральних вакуоль	Невідома	1, 6
OsTRKb	Всі тканини, насіння	Тонoplast протеїнових вакуоль	Гомеостаз $K^+$ у насінні	1, 6
NtTRK1a	Невідомо	Тонoplast центральних вакуоль	Регуляція сольового та осмотичного шоку	1, 7, 9
NtTRK1b	Невідомо	Можливо протеїнові вакуолі	Клітинний поділ, посуха	1, 7, 8

**Мета дослідження** – вивчення і узагальнення відомих послідовностей калієвих каналів родини ТРК. Верифікація цих послідовностей на основі вторинної перевірки доменної структури. Проведення кладистичного аналізу і побудова філогенетичного дерева. Оцінка перспективи подальших досліджень цих каналів.

**Матеріал і методика досліджень.** Пошук рослинних гомологів виконували за ключовими словами і на основі результатів BLASTp-сканування бази даних UniProt (SIB BLAST Network Service) та GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) [9, 17].

Межі каталітичних доменів визначали за даними статей GenBank, UniProt і результатів аналізу доменної архітектури в SMART7 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [12]. Пошук рослинних гомологів проводили за алгоритмом BLASTp з обмеженням пошуку в групі «Viridiplantae» і

використанням таких параметрів: вагова матриця – BLOSUM62, число очікуваних збігів у випадковій вибірці із порогом E=10 за активної фільтрації низькоконструйованих ділянок і фрагментів вирівнювань, що містять пробіли ([www.expasy.org](http://www.expasy.org); [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)) [9, 12, 17]. Первинну вибірку послідовностей гомологів виконували на основі ваги вирівнювань і показників ідентичності у відсотках, подібності і наявності генів [9].

Оцінку потенційної специфічності та доменної архітектури білків виконували на основі аналізу із застосуванням мережевого інструменту SMART7 ([www.smart.embl-heidelberg.de](http://www.smart.embl-heidelberg.de)) [12]. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей здійснювали за допомогою програми ClustalX (2.0.5) ([www.clustal.org](http://www.clustal.org)) із використанням серії матриць BLOSSUM [11].

Філогенетичний аналіз калієвих каналів родини ТРК проводили на основі кластеризації всіх білків з архітектурою двох каталітичних доменів об'єднаних лінкерною областю, із застосуванням методу зв'язування двох найближчих сусідів (Neighbor-Joining) [11, 13].

Візуалізацію, аналіз і визначення кореню філогенетичного дерева виконували за допомогою програм Dendroscope 3.2.8 та MEGA5 [5, 10].

Загальну методологію дослідження представлено на рис.2.

**Результати дослідження.** На основі літературних джерел [3, 6, 15] і баз даних UniProtKB і GenBank були відібрані відповідні повні амінокислотні послідовності і послідовності їх каталітичних доменів калієвих каналів родини ТРК з *Arabidopsis thaliana*. Подальший BLASTp-пошук усіх інших рослинних гомологів у базі даних UniProtKB і GenBank, виконаний відносно повних амінокислотних послідовностей і каталітичних доменів іонних транспортерів (SMART-Ion\_trans\_2: PF07885). Випадки багаторазового депонування виявляли на підставі порівняння координат локусів генів відповідних білків.

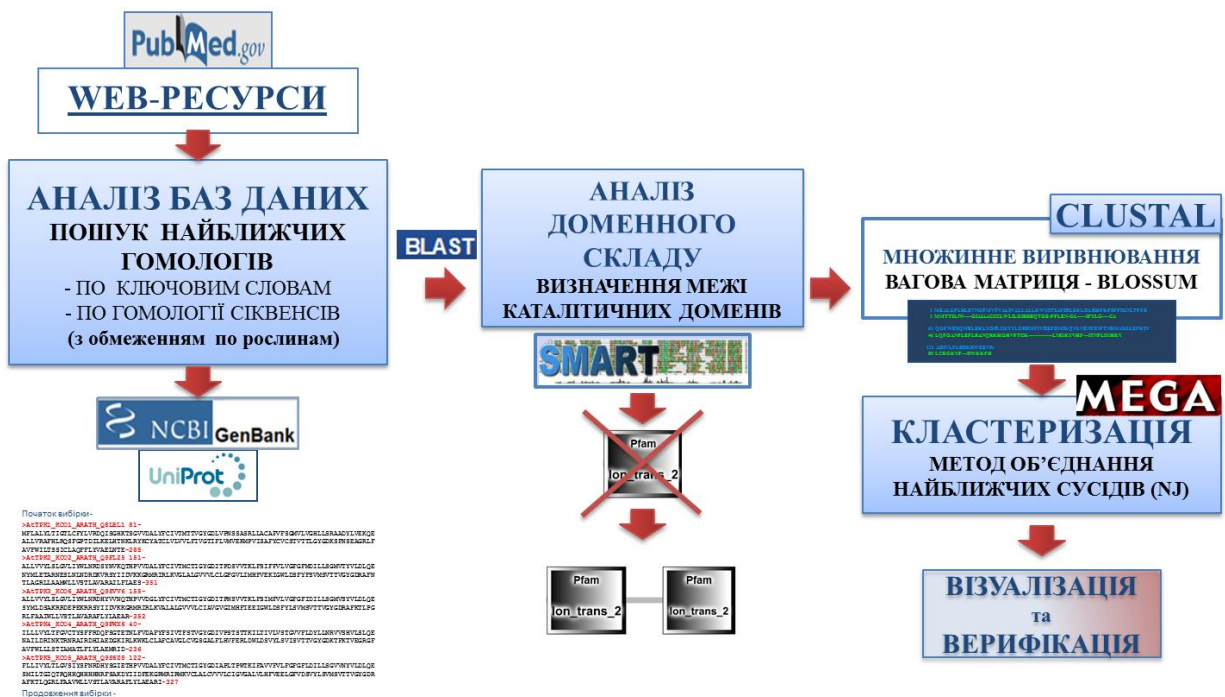


Рис. 2. Загальна методологія дослідження потенційних двопорових калієвих каналів рослинного походження.

Для обмеження отриманої вибірки розміром в 300 білків, проведено відбір послідовностей за допомогою аналізу доменної архітектури. Відібрали тільки ті послідовності, що мали два домени іонних транспортерів Ion\_trans\_2: PF07885, об'єднаних неструктурованою лінкерною ділянкою. Роботу виконували за допомогою інструменту SMART з підключенням скриптів аналізу за всіма іншими додатковими базами даних. У результаті такого відбору послідовностей відібрали 157 білків, що містять домени визначені за НММ-профілями і є відповідною конструкцію (рис. 2).

За результатами множинного вирівнювання 157 відібраних послідовностей показано високий ступінь гетерогенності відібраної групи гомологів з показниками ідентичності 3,5 та 7,7% подібності, але чітким виділенням консервативних мотивів.

Попри високу гетерогенність в середині вибірки результати спільної NJ – кластеризації каталітичних доменів йонних каналів арабідопсису й інших рослинних гомологів свідчать про існування загальних для них клад, що

може вказувати на їх еволюційну близькість. Зокрема встановлено, що всі знайдені послідовності потенційних рослинних каналів ТРК сформували чотири великі клади (рис. 3). Так, перша клада складалась з контроль-каналу ТРК1 (UniprotKB: KCO1, Q8LBL1) *A. thaliana* та 69 рослинних гомологів цього типу. Слід відзначити, що кладистичний аналіз виявив існування окремої гілки представленої одним білком - ТРК4 з арабідопсису (UniprotKB: KCO4, Q9FWX6), що знаходиться ближче до гіпотетичного кореня філограми (рис. 3). ТРК4 з арабідопсису локалізується у плазматичній мембрані і не містить EF-мотивів у С-терміналі (див. табл. 1) [1]. Друга група каналів родини ТРК має три гілки з дуже схожими за своїми консервативними мотивами білками і складається з 25 потенційних каналів (рис. 3). Третя група представлена 23 рослинними білками, об'єднаними із контрольним білком ТРК5 з арабідопсису (UniprotKB: KCO5, Q9S6Z8). Четверта група ТРК-каналів, що містить потенційний корінь філограми, має 35 потенційних калієвих каналів рослин. Вона об'єднана з двома контрольними білками арабідопсису ТРК2 (UniprotKB: KCO2, Q9FL25) і ТРК3 (UniprotKB: KCO6, Q9SVV6) (рис. 3).

### **Висновки**

1. Проаналізовано 300 білків і відібрано 157 унікальних послідовностей потенційних калієвих каналів родини ТРК на основі аналізу специфічної доменної архітектури.
2. Множинне вирівнювання вказує на високий ступінь дивергенції серед послідовностей потенційних калієвих каналів родини ТРК рослинного походження.
3. У наслідок проведення кладистичного аналізу було виділено чотири клади ТРК – подібних послідовностей із чіткими ознаками та об'єднанням з більш дослідженими контрольними білками з *A. thaliana*.
4. Попри розподіл калієвих каналів родини ТРК на чотири різних групи гомологів, фізіологічні функції і клітинна локалізація їх може різнитися.

Тому подальше вивчення функцій, клітинної локалізації цих транспортних білків та застосування молекулярного моделювання є дуже важливим.

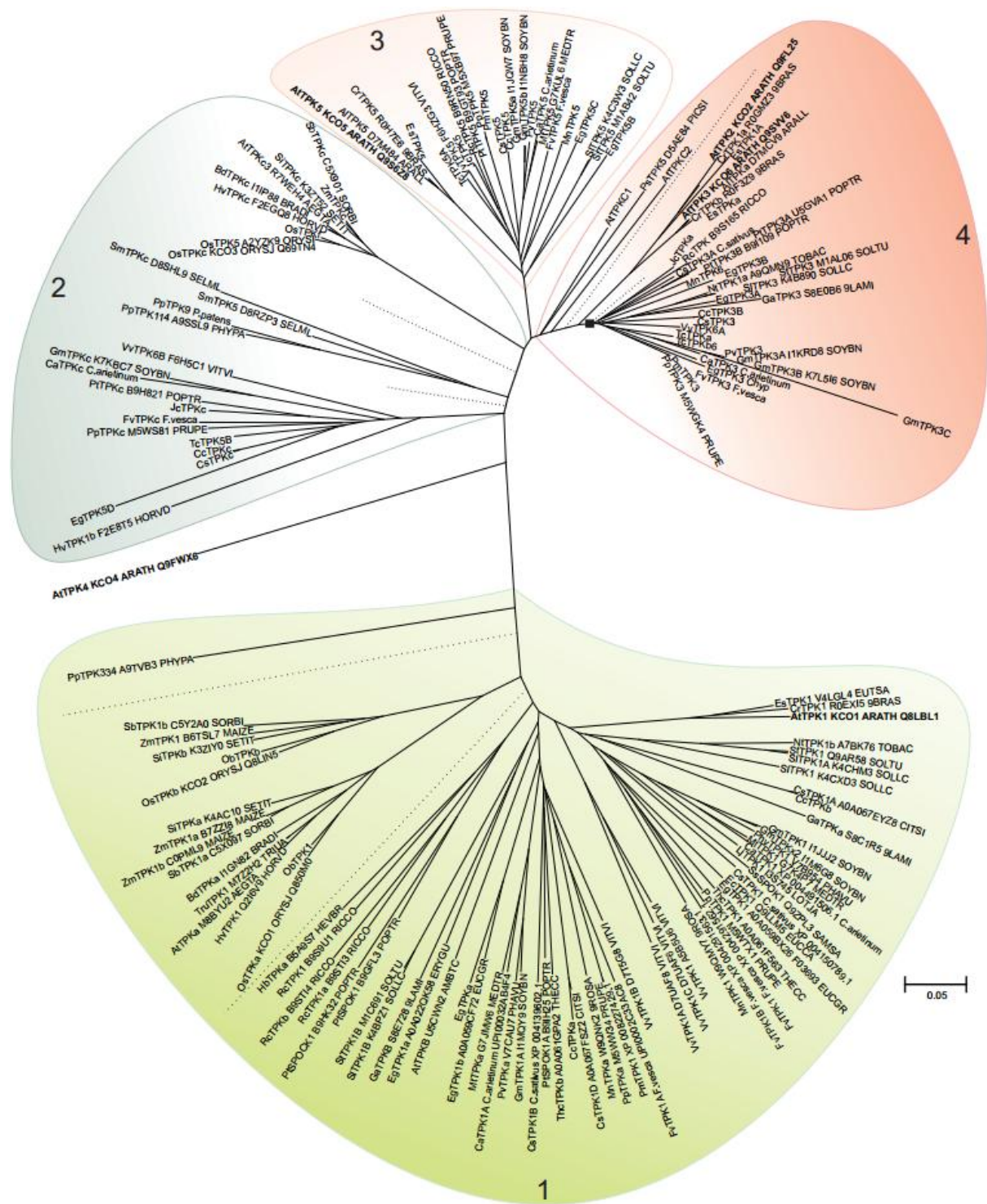


Рис. 3. Результати філогенетичного аналізу зведеної групи потенційних двопорових калієвих каналів рослинного походження. Примітки: алгоритм – зв’язування найближчих сусідів, квадратиком відзначений потенційний корінь дерева.



## Список літератури

1. Becker D. AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner / D. Becker, D. Geiger, M. Dunkel, [et. al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol.101, № 44. – P. 15621-15626.
2. Carraretto L. Thylakoid-Located Two-Pore K<sup>+</sup> Channel Controls Photosynthetic Light Utilization in Plants / L. Carraretto, E. Formentin, E. Teardo, [et. al.] // Sci. – 2013. – Vol. 342, № 6154. – P. 114-118.
3. Gobert A. The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis /A. Gobert, S. Isayenkov, C. Voelker, [et. al.] // Proc Natl. Acad. Sci. USA. – 2007 – Vol.104, № 25. – P. 10726-10731.
4. Hamamoto S. Characterization of a tobacco TPK-type K<sup>+</sup> channel as a novel tonoplast K<sup>+</sup> channel using yeast tonoplasts / S. Hamamoto, J. Marui, K. Matsuoka, [et. al.] // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, № 4 – P. 1911-1920.
5. Huson D. H. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks / D. H. Huson, C. Scornavacca // Syst Biol. – 2012. – Vol. 61, № 6. – P. 1061–1067.
6. Isayenkov S. Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role / S. Isayenkov, J. C. Isner, F. J. M. Maathuis // Plant Signal Behav. –2011. – Vol.6, №8. – P. 1201-1205.
7. Isayenkov S. Rice two-pore K<sup>+</sup> channels are expressed in different types of vacuoles / S. Isayenkov, J. C. Isner, F. J. M. Maathuis // Plant Cell. – 2011. – Vol. 23, № 2. – P.756-768.
8. Ісаєнков С. В. Клонування та особливості клітинної локалізації калієвих каналів родини ТПК із тютюну / С. В. Ісаєнков, Ф. Й. М. Маатхаус // Доп. НАН України. – 2014. – Т. 10. – С. 154 -160.
9. Korf I. Serial BLAST searching / I. Korf //Bioinformatics. - 2003. – Vol.19, № 12. – P. 1492–1496.

10. Kumar S. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences / S. Kumar, J. Dudley, M. Nei, K. Tamura // *Briefings in Bioinformatics*. – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 299-306.
11. Larkin M. A. Clustal W and Clustal X version 2.0 / M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, [et. al.] // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23, № 21. – P. 2947-2948.
12. Letunic I. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource / I. Letunic, T. Doerks, P. Bork // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40, № 34. – P. 302-305.
13. Nei M. *Molecular evolution and phylogenetics* / M. Nei, S. Kumar. – Oxford: University Press, 2000. – pp.333.
14. Sano T. Outward-rectifying K<sup>+</sup> channel activities regulate cell elongation and cell division of tobacco BY-2 cells / T. Sano, N. Kutsuna, D. Becker, [et. al.] // *Plant J.* – 2009. – Vol. 57, № 1. – P. 55-64.
15. Voelker C. Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta / C. Voelker, D. Schmidt, B. Mueller-Roeber B, K. Czempinski // *Plant J.* - 2006. –Vol. 48, №2. – P. 296-306.
16. Wang F. Overexpression of a poplar two-pore K<sup>+</sup> channel enhances salinity tolerance in tobacco cells / F. Wang, S. Deng, M. Ding, [et. al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2013. – Vol. 112, № 1. – P. 19 -31
17. Wu C.H. The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information / C.H. Wu, R. Apweiler, A. Bairoch, [et. al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34, № 34. - P. 187-191.

# PHYLOGENETIC ANALYSIS OF PUTATIVE PLANT POTASSIUM CHANNELS BELONGING TO TPK FAMILY

**S.V. Isayenkov, D.O. Samofalova**

*The bioinformatic sequence hunting of putative TPK-channels and summarizing of phylogenetic diversity TPK family were conducted. By application of wide range of bioinformatic tools and online services the comparative analysis and aminoacid sequence alignment of putative TPK-channels were performed. After secondary analysis of pore domain architecture the 157 sequences of TPK-channels from different plants species were selected. The further cladistical analysis of selected TPK sequences exhibited division of TPK family on four different clades.*

**Key words:** *two-pore potassium channels (TPK), TPK-channel domain architecture, cladistical analysis, phylogenetic tree*

# ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА ТРК

**С.В. Исаенков, Д. А. Самофалова**

*Был проведен биоинформационный поиск потенциальных последовательностей ТРК-каналов и обобщение филогенетического разнообразия семейства ТРК.*

*Проведено біоінформаційний пошук та узагальнення філогенетичного різноманіття рослинних калієвих каналів родини ТРК. За допомогою низки спеціалізованих програм та онлайн сервісів проводився порівняльний аналіз та вирівнювання амінокислотних послідовностей потенційних представників ТРК-каналів. Після відбору на основі вторинного аналізу доменної архітектури порових ділянок було відібрано 157 каналів родини*

*ТРК різних видів рослин. Подальший кладистичний аналіз показав, що родина ТРК-каналів рослин поділяється на 4 різних класи.*

**Ключові слова:** *двопорові калієві канали родини ТРК, доменна структура ТРК-каналів, кладистичний аналіз, філогенетичне дерево*