

УДК 575,592

ГЛУТАМАТНЫЕ И ГАМК-РЕЦЕПТОРЫ БЕЗНЕРВНЫХ ЖИВОТНЫХ (PLASOZOA): ПРЕАДАПТАЦИЯ К НЕЙРОТРАНСМИССИИ

© 2023 г. М. А. Никитин¹, *, С. И. Борман²

¹Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр. 40, Москва, 119992 Россия

²Институт биологии развития им. К.К. Кольцова РАН
ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*E-mail: nikitin.fbb@gmail.com

Поступила в редакцию 12.11.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 06.12.2022 г.

Появление нервной системы является одним из важнейших событий в эволюции жизни на Земле. Детали этого события остаются малопонятными, в частности, объяснения требует большое разнообразие известных веществ-нейротрансмиттеров. Мы анализируем гомологи нейрональных рецепторов глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) у Placozoa — животных без нервной системы, но обладающих подвижностью и поведением. Филогенетический анализ и сравнение аминокислотных остатков, ответственных за лигандную специфичность, показали, что эти рецепторы Placozoa неожиданно многочисленны, разнообразны и эволюционно динамичны и по всем этим признакам напоминают скорее обонятельные рецепторы высших животных. Наши результаты указывают, что хеморецепторная система была важным источником разнообразных рецепторов для возникающей нервной системы, а будущие аминокислоты-нейротрансмиттеры (глутамат, ГАМК, глицин) были релевантными внешними сигналами для первых животных, еще не имевших нервной системы.

DOI: 10.31857/S0044459623030053, EDN: ZFEFJW

Происхождение нервной системы является одним из сложнейших вопросов эволюционной биологии (Szathmáry, Smith, 1995; Layden, 2019). Его важной частью является происхождение нейротрансмиттеров. Для передачи сигналов между нейронами используются десятки разнообразных веществ: аминокислоты (глутамат, глицин, ГАМК), моноамины (серотонин, дофамин и др.), многочисленные нейропептиды и даже низкомолекулярные газы, например оксид азота NO. Сценарии эволюционного происхождения нервной системы должны включать в себя предположения о происхождении этого разнообразия и критериях, по которым те или иные вещества вошли в число нейротрансмиттеров (Sakharov, 1974; Agnati et al., 1995).

Для изучения происхождения нервной системы необходимы данные по животным с примитивными нервными системами (Cnidaria и Stenophora)

Сокращения: АТФ — аденозинтрифосфат; ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; iGluR — ионотропный глутаматный рецептор; mGluR — метаботропный глутаматный рецептор; ГАМК_A — ионотропный рецептор гамма-аминомасляной кислоты; ГАМК_B — метаботропный рецептор гамма-аминомасляной кислоты.

и без нервной системы вовсе (Porifera и Placozoa). Особое место занимают здесь Placozoa — подвижные животные, у которых есть поисковое, пищевое и социальное поведение при полном отсутствии нервной системы (Окштейн, 1987; Серавин, 1987; Ueda et al., 1999; Smith et al., 2015; Mayorova et al., 2018; Fortunato, Aktipis, 2019; Romanova et al., 2020). В геноме наиболее изученного вида Placozoa, *Trichoplax adhaerens*, обнаружены ионные каналы, которые участвуют в передаче нервных импульсов у животных, компоненты систем биосинтеза нейротрансмиттеров и транспорта везикул, а также предполагаемый нейроэндокринно-подобный секреторный аппарат (Srivastava et al., 2008; Smith et al., 2014).

Для выполнения веществом функции трансмиттера необходимо наличие систем как его синтеза, так и рецепции. Чтобы возникновение этих систем было поддержано естественным отбором, они должны были выполнять какие-то функции по отдельности. То есть эволюция веществ-трансммиттеров с необходимостью должна включать в себя смену функций. Можно предположить две группы путей возникновения трансмиттеров. Во-первых, вещество-трансмиттер исходно

могло быть сигналом из внешней среды, и организм сначала приобретает систему его рецепции, а потом сигнал интернализуется. Во-вторых, будучий трансмиттер исходно может иметь какие-то не сигнальные функции, например защитные. Тогда сначала возникает система его синтеза и выделения, а потом, например для координации защитной реакции, возникают рецепторы к этому веществу, и оно становится трансмиттером.

Первый сценарий (трансмиттер из внешнего сигнала) показан, например, для тироидных гормонов животных, происходящих от вторичных метаболитов водорослей (Heyland, Moroz, 2005; Heyland et al., 2005). Среди нейротрансмиттеров первый сценарий наиболее вероятен для глутамата и АТФ. Эти два вещества содержатся в больших количествах в цитоплазме почти всех клеток, их присутствие во внешней среде сообщает о повреждении и гибели клеток и может служить пищевым или болевым сигналом (Moroz et al., 2021b). Второй сценарий более вероятен для нейропептидов и оксида азота. Нейропептиды используют ту же систему посттрансляционного процессинга, что и антимикробные пептиды, антимикробная активность оксида азота также хорошо известна (Moroz et al., 2020a, 2021b).

Имеющиеся экспериментальные данные по *Trichoplax* показывают большую роль секретиремых пептидов в регуляции и интеграции его пищевого поведения (Senatore et al., 2017; Varoqueaux et al., 2018). В отношении аминокислот-нейротрансмиттеров данных меньше, известно только, что *Trichoplax* содержит миллимолярные концентрации ГАМК, глицина, D-аспартата и L-глутамата, и что глицин является хемоаттрактантом для этого животного (Romanova et al., 2020; Moroz et al., 2020b).

Глутамат и ГАМК выполняют ряд функций, кроме (нейро)трансмиттерной, как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных. Описано их участие в других регуляторных системах млекопитающих: иммунной и эндокринной. Так, секреция ГАМК в бета-клетках поджелудочной железы происходит совместно с секрецией инсулина, что влияет на ингибирование секреции глюкагона (Bansal et al., 2011). В эпителии дыхательных путей была описана ГАМК-эргическая система, которая активируется под воздействием аллергенов и, предположительно, играет роль в механизмах развития астмы. Кроме того, глутамат выполняет функцию пищевого сигнала. Воздействуя на вкусовые рецепторы человека, глутамат вызывает вкус “умами”. Впервые эту функцию глутамата в 1908 г. описал профессор Токийского университета Кикунэ Икэда. Глутамат, ГАМК и другие нейротрансмиттеры являются важными сигнальными молекулами у зародышей различных животных еще до появления у них

первых нейронов (Бузников, 1987; Levy et al., 2021; Špírková et al., 2022).

У позвоночных животных в глутаматной передаче участвуют возбуждающие ионотропные глутаматные рецепторы (iGluR) и metabotropные (связанные с G-белками) глутаматные рецепторы (mGluR). Ионотропные рецепторы при связывании лиганда открывают в мембране клетки ионный канал, проницаемый для определенных ионов. Для ионотропных глутаматных рецепторов это Na^+ и Ca^{2+} . В ГАМК-зависимой передаче участвуют тормозные ионотропные ГАМК_A-рецепторы (GABA-A), открывающие каналы для ионов Cl^- , и metabotropные ГАМК_B-рецепторы (GABA-B). G-белок-связанные metabotropные рецепторы в неактивном состоянии связаны с комплексом субъединиц $\text{G}\alpha$, $\text{G}\beta$ и $\text{G}\gamma$. При связывании лиганда рецептор меняет конформацию, субъединицы G-белка диссоциируют от рецептора и связываются с другими внутриклеточными белками, запуская дальнейшие сигнальные каскады, например аденилатциклазный. У ГАМК_B-рецепторов основные пути передачи сигнала G-белком — это активация калиевых каналов внутреннего выпрямления, инактивация кальциевых каналов и аденилатциклазы (Terunuma, 2018). Различные типы metabotropных глутаматных рецепторов могут активировать фосфолипазу C, протеинкиназы MAPK, cdk5, Jun и MTOR/p70-S6, фосфатидилинозитолкиназу PI3, калиевые каналы, инактивировать кальциевые каналы и аденилатциклазу (Niswender, Conn, 2010). В восприятии глицина у позвоночных основную роль играют тормозные ионотропные глициновые рецепторы (GlyR). Кроме того, глицин является коагонистом ионотропных глутаматных рецепторов семейства NMDA. Типичные NMDA-рецепторы — это гетеротетрамеры из двух субъединиц, связывающих глутамат, и двух — глицин, и для активации они нуждаются в одновременном связывании этих двух трансмиттеров.

ГАМК, глутамат и другие аминокислоты участвуют в передаче сигналов между клетками уже у бактерий (Закатаева и др., 2006; Chevrot et al., 2006; Quillin et al., 2021). У бактерий эти аминокислоты участвуют в “чувстве кворума”, регуляции образования биопленок, состояния покоя, патогенности и множества других процессов. У цианобактерии *Synechocystis* был выделен и охарактеризован рецептор, сходный с ионотропными глутаматными рецепторами эукариот. Он реагирует на широкий спектр аминокислот, включая глутамат, серин, треонин, гомоцистеин и аланин, но не реагирует на аспартат (Chen et al., 1999).

Среди эукариот сигнальные функции глутамата, ГАМК и глицина лучше всего изучены у животных, растений, инфузорий и миксомицетов.

У высших растений глутамат регулирует реакцию на повреждение, рост пыльцевых трубок, ответы на стрессы и многие другие процессы. В геноме *Arabidopsis* найдено 20 генов ионотропных глутаматных рецепторов (iGluR), лиганд-связывающие домены некоторых из них похожи на таковые домены рецепторов к гамма-аминомасляной кислоте ГАМК_B. Показано, что агонисты и антагонисты ГАМК_B-рецепторов влияют на транспорт кальция и рост у ряски *Lemna minor* (Kinnersley, Lin, 2000). Совместное действие глицина и глутамата в концентрации 0.01 мМ вызывает вход кальция в клетки проростков *Arabidopsis*. Эти же аминокислоты по отдельности вызывают аналогичный ответ лишь в намного более высокой концентрации 1 мМ. Эффект глицина и глутамата исчезает при добавлении DNQX – блокатора всех семейств ионотропных глутаматных рецепторов животных (Dubos et al., 2003).

У инфузории *Paramecium* ГАМК была обнаружена иммуногистохимическими методами, а ее рецептор ГАМК_A – гистохимически, флуоресцентным производным бензодиазепаина; показано, что ГАМК регулирует конъюгацию этой инфузории (Delmonte Corrado et al., 2002). У нее же был обнаружен ГАМК_B-рецептор, который участвует в модуляции плавания (Ramoino et al., 2003; Vucchi et al., 2005). Выделение ГАМК у этой инфузории происходит по механизмам, близким к синаптическим: кальций-зависимый экзоцитоз, запуск емкой деполяризации мембраны, при участии мембранных белков VAMP, SNAP-25, синтаксина и везикулярного ГАМК-транспортера (Ramoino et al., 2010). Глутамат является хемоаттрактантом для этой инфузории и вызывает гиперполяризацию мембраны (Preston, Usherwood, 1988). Одновременное добавление глицина и N-метил-D-аспартата (NMDA) вызывает у нее переход к плаванию по кругу, тогда как оба эти вещества по отдельности ответа не вызывают. Эта реакция инфузорий на глицин + NMDA подавляется специфическими блокаторами NMDA-семейства глутаматных рецепторов позвоночных: ифенпродиллом, D-AP5, ДСКА, МК-801 и ионами цинка (Ramoino et al., 2014).

У слизевика *Dictyostelium* (тип Mycetozoa) ГАМК в наномолярной концентрации запускает дифференциацию спор через ГАМК_B-рецептор (Anjard, 2006). Глутамат оказался конкурентным ингибитором ГАМК – 100 нМ глутамата полностью подавляют споруляцию на фоне 1 нМ ГАМК.

Таким образом, глутамат, ГАМК и в какой-то степени глицин являются сигнальными молекулами в различных супергруппах эукариот – животные, растения, инфузории, слизевика. В геномах растений обнаруживаются гены, явно сходные по последовательности с генами ионотропных глутаматных рецепторов животных. Гены ионотроп-

ных глутаматных рецепторов обнаруживаются и в других группах эукариот, таких как красные, зеленые, бурые и диатомовые водоросли, динофлагелляты, воротничковые жгутиконосцы, хищный жгутиконосец *Tunicaraptor* (Opisthokonta) и амeba *Naegleria* (представитель супергруппы Excavata), что может указывать на присутствие подобных рецепторов уже у предковых эукариот (Bortoli et al., 2016; Tikhonenkov et al., 2020; Moroz et al., 2021a).

В геномах инфузорий и слизевиков поиск по последовательности не находит известных типов глутаматных и ГАМК-рецепторов, но рецепторы глутамата и ГАМК в этих группах по фармакологическим свойствам похожи на рецепторы семейств NMDA, ГАМК_A и ГАМК_B животных.

На филогенетическом древе животных Placozoa являются третьей ветвью после губок и гребневиков (Ryan et al., 2013; Moroz et al., 2014; Feuda et al., 2017; Simion et al., 2017; Nielsen, 2019). Такая топология древа совместима с двумя сценариями происхождения нервной системы: 1) двукратное независимое появление у Stenophora и Cnidaria + Bilateria и 2) однократное появление у общего предка Metazoa и последующая вторичная утрата у Placozoa и, возможно, еще у Porifera.

Возможность вторичного упрощения в эволюции Placozoa широко обсуждалась (см. обзоры Syed, Schierwater, 2002; Алешин, Петров, 2002). Основными движущими силами глубокого вторичного упрощения в эволюции животных являются паразитизм и прикрепленный образ жизни. Ни то, ни другое не относится к Placozoa – подвижным свободноживущим животным. И даже среди паразитических животных полная утрата нервной системы произошла лишь два раза – у дициемид и миксоспоридий (Feng et al., 2014; Zverkov et al., 2019). И те, и другие демонстрируют крайнюю степень морфологической редукции, будучи устроены намного проще, чем Placozoa. У чуть менее редуцированных паразитов, таких как ортонектиды или спороцисты сосальщиков, нейроны сохраняются (Podvyaznaya, Galaktionov, 2012; Slyusarev et al., 2019).

Геномные данные указывают на возможную вторичную утрату симметрии и сегментации у Placozoa в связи с миниатюризацией (гипотеза “призрачного Нох-локуса”; Ferrier, 2016), но миниатюризованные животные не утрачивают нервную систему полностью. Поэтому вторичная утрата нервной системы Placozoa выглядит менее вероятной, чем первичное ее отсутствие.

Независимо от первичности или вторичности отсутствия нервной системы у Placozoa изучение их набора рецепторов представляет большой интерес. Если у Placozoa никогда не было нервной системы, их рецепторы могут сохранять те исходные функции, которые они выполняли у древних животных до появления нервной системы, что

может дать важную информацию о вхождении глутамата, ГАМК и глицина в число нейротрансмиттеров. Если нервная система у Placozoa была потеряна вторично, у нас есть шанс изучить смену функций бывших компонентов нервной системы. Поэтому мы произвели поиск, аннотацию и филогенетический анализ генов, кодирующих рецепторы глутамата, глицина и ГАМК, в геномах двух видов Placozoa: *Trichoplax adhaerens* и *Hoilungia hongkongensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для поиска и аннотации генов рецепторов мы использовали последовательности геномов животных из базы данных GenBank. Для Placozoa использовали обновленную аннотацию генома *T. adhaerens* (<https://genomevolution.org/coge/GenomeInfo.pl?gid=31909>) и аннотацию генома *H. hongkongensis* (<https://bitbucket.org/molpalmuc/hoilungia-genome/src/master/>).

Поиск производили по гомологии последовательностей с помощью программы BLASTP (Altschul et al., 1997), используя в качестве исходного запроса последовательности всех iGluR, mGluR и ГАМК_B-рецепторов человека из базы данных SwissProt/Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Найденные таким образом последовательности рецепторов Placozoa были выравнены с последовательностями других животных при помощи сервера MAFFT Online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato, Standley, 2013). Выравнивания были проверены вручную. Неполные последовательности, не содержащие одного из обязательных для iGluR или mGluR доменов (PBP1, PBP2 и TMD для ионотропных, PBP1 и 7tm для метаболитропных), были удалены.

Филогенетические деревья были построены с помощью алгоритма Maximum Likelihood, реализованного в программе IQTREE 1.6.12 (Nguyen et al., 2015) с автоматическим выбором модели аминокислотных замен, и с помощью Байесового алгоритма в программе MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012). Статистическая достоверность Maximum Likelihood деревьев была проверена с помощью 2000 реплик ультрабыстрого бутстрэпа (Hoang et al., 2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск и аннотация рецепторов в геномах Placozoa

Мы анализировали генные семейства, связанные с передачей сигналов при помощи глутамата, глицина и гамма-аминомасляной кислоты. У позвоночных животных в глутаматной передаче участвуют возбуждающие ионотропные глутаматные рецепторы (iGluR) и метаболитропные глутаматные рецепторы (mGluR). В ГАМК-зависи-

мой передаче участвуют тормозные ионотропные ГАМК_A-рецепторы (GABA-A) и метаболитропные ГАМК_B-рецепторы (GABA-B). В восприятии глицина у позвоночных основную роль играют тормозные ионотропные глициновые рецепторы (GlyR). В геноме *Trichoplax* обнаружены гены для большинства из этих семейств рецепторов, за исключением ГАМК_A и глициновых.

Филогения и эволюция ионотропных глутаматных рецепторов

Актуальный взгляд на классификацию и эволюцию ионотропных глутаматных рецепторов представлен в обзорах (Ramos-Vicente et al., 2018, 2021; Moroz et al., 2021a). iGluR животных делятся на семейства NMDA, Epsilon, Lambda и AKDF. В свою очередь, семейство NMDA делят на классы NMDA1, NMDA2, NMDA3. В семействе AKDF выделяют четыре класса (AMPA, каинатные, Delta, Phi), соответствующих монофилетическим кладам на дереве рецепторов. Кроме того, часть рецепторов семейства AKDF, образующая на дереве несколько ветвей в основании семейства, не включается ни в один из этих классов. Далее мы будем называть эту группу рецепторов “неклассифицированные AKDF”. Экспериментально изучены в первую очередь представленные у человека и других позвоночных и важные для медицины классы NMDA, AMPA и каинатных рецепторов.

Все обнаруженные нами iGluR *Trichoplax* на филогенетическом дереве попадают в семейство Epsilon (присутствуют у базальных многоклеточных животных, головохордовых и немертин) и группу неклассифицированных AKDF.

У *Trichoplax* имеется 14 генов ионотропных глутаматных рецепторов (10 семейства Epsilon и 4 семейства AKDF). Рецепторы *Trichoplax* AKDF-типа делятся на две клады, одна из которых является сестринской по отношению к AKDF-рецептору губки *Sycon*. В то же время у представителя другого рода пластинчатых, *H. hongkongensis*, только пять iGluR – те же четыре AKDF и лишь один рецептор Epsilon-семейства (рис. 1). Таким образом, *T. adhaerens* и *H. hongkongensis* имеют ионотропные глутаматные рецепторы и потенциально могут реагировать на глутамат.

Представители двух самых базальных ветвей животных, губки и гребневики, тоже имеют ионотропные глутаматные рецепторы. Гребневики имеют многочисленные рецепторы семейства Epsilon, обыкновенная губка *Ircinia* – один Epsilon-рецептор, у известковой губки *Sycon* и гомосклеритной *Oscarella* есть рецепторы AKDF-типа. У модельных видов обыкновенных губок *Amphimedon queenslandica* и *Spongilla lacustris* ионотропные глутаматные рецепторы полностью отсутствуют.

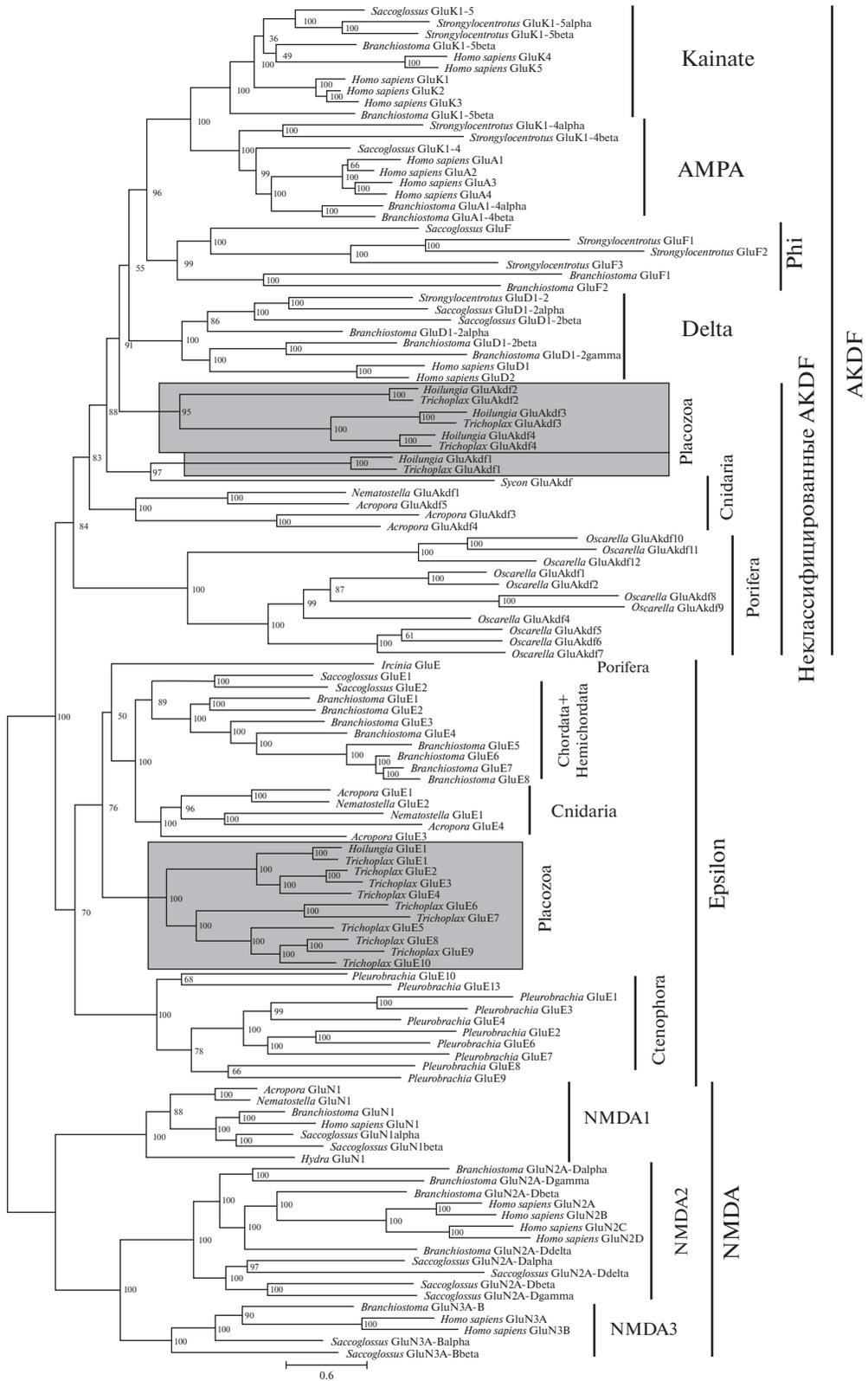


Рис. 1. Байесово филогенетическое древо 117 ионотропных глутаматных рецепторов животных. Ветви рецепторов Плацозоа выделены серым фоном. Байесовы постериорные вероятности ветвей обозначены цифрами около узлов дерева. Анализ продолжался 1.42 млн поколений до конвергенции марковских цепей, определенной с помощью программы Трасер. Выравнивание состояло из 2472 позиций, 1348 из них информативных.

Это указывает на то, что дивергенция семейств ионотропных глутаматных рецепторов произошла до дивергенции современных типов многоклеточных животных и до появления нервных систем. Распределение типов рецепторов по представителям классов губок указывает, что в эволюции губок происходила потеря генов глутаматных рецепторов.

Особо стоит обсудить происхождение рецепторов семейства NMDA. Эти рецепторы, с одной стороны, отсутствуют у всех вошедших в анализ губок, гребневики и Placozoa, с другой стороны, их ветвь отходит от самой базальной части дерева, что указывает на глубокую древность разделения рецепторов на NMDA и все остальные – до дивергенции базальных типов Metazoa. Это можно интерпретировать либо как полную вторичную потерю NMDA-рецепторов у губок, гребневики и Placozoa, либо как искажение их положения на дереве, например, в результате эффекта притяжения длинных ветвей.

Лигандная специфичность ионотропных глутаматных рецепторов

Несмотря на название “глутаматные”, многие рецепторы этого семейства имеют другие физиологические лиганды. Лигандная специфичность экспериментально изучена в основном для семейства NMDA и классов AMPA, каинатных и Delta, так как они играют важную роль в нервной системе млекопитающих и человека. AMPA и каинатные рецепторы высоко специфичны к глутамату. Семейства NMDA1, NMDA3 и Delta реагируют на глицин и D-серин, но не на глутамат. NMDA2 реагируют на глутамат и аспарат.

Семейство Epsilon отсутствует у позвоночных и модельных групп беспозвоночных, таких как насекомые и моллюски. Поэтому лигандная специфичность известна лишь для пяти рецепторов этого семейства – двух из ланцетника и трех из гребневики (Alberstein et al., 2015; Ramos-Vicente et al., 2018). Три из пяти этих рецепторов специфичны к глицину, один (GluE13_Mle) – к глутамату, и, наконец, рецептор GluE7_Vla ланцетника не реагирует ни на какие проверенные аминокислоты. Изучение кристаллической структуры GluE7_Vla показало, что его лиганд-связывающий карман перекрыт объемной боковой цепью тирозина-653 (Ramos-Vicente et al., 2018), и, вероятно, этот белок больше не является ионотропным рецептором аминокислот и выполняет другие функции.

Аминокислотные остатки рецепторов, участвующие в связывании лигандов, хорошо изучены (Armstrong, Gouaux, 2000; Furukawa et al., 2005; Naur et al., 2007; Yao et al., 2008; Mayer, 2021). Тирозин или фенилаланин в позиции 450 участвует

в Ван-дер-Ваальсовом взаимодействии с альфа-углеродным атомом лиганда, консервативный аргинин в позиции 485 образует ионную связь с карбоксильной группой, аспарат или глутамат в позиции 705 – ионную связь с аминогруппой лиганда (нумерация соответствует зрелой последовательности рецептора GluA2 крысы). Кроме того, водородную связь с карбоксиллом образует NH-группа 654 остатка (обычно серин или аланин), а водородные связи с аминогруппой лиганда – остатки 478 (пролин, аланин или аспарат) и 480 (серин или треонин).

Лигандная специфичность зависит главным образом от аминокислотных остатков 653, 655 и 704, контактирующих с боковой цепью аминокислоты-лиганда. У глутамат-специфичных AMPA и каинатных рецепторов в этих позициях находятся остатки G/S, T, V/I/M соответственно. Глутамат-специфичный рецептор GluE13_Mle имеет в этих позициях серин, треонин и глутамат. Рецепторы NMDA2, связывающие глутамат и аспарат, имеют в этих позициях глицин, треонин и тирозин (табл. 1).

У глицин-связывающих рецепторов лиганд-связывающие сайты более разнообразны. У NMDA1, NMDA3 и Delta (лиганды – глицин и D-серин) в этих позициях серин, гидрофобная аминокислота и триптофан. У глицин-связывающих рецепторов семейства Epsilon наблюдается большее разнообразие. GluE1_Bba ланцетника имеет там остатки S, P, W, что похоже на NMDA1/3, тогда как у GluE7_Mle и GluE3_Pba гребневики присутствуют более полярные остатки: аргинин в 653 и глутамат в 704, между их боковыми цепями есть ионная связь, в 655 позиции пролин (табл. 1).

Посмотрим теперь на соответствующие аминокислотные остатки рецепторов *Trichoplax*. Среди его рецепторов Epsilon-семейства выделяются пять белков (GluE5, GluE7, GluE8, GluE9, GluE10) с небольшими аминокислотами (Gly, Ala, Ser) в 704 позиции. 704 остаток контролирует размер лиганд-связывающего кармана, у глициновых рецепторов там обычно триптофан, у глутаматных – алифатические аминокислоты или тирозин. Небольшие аминокислоты в этой позиции указывают на вероятность связывания молекул лигандов более крупных, чем глутамат. Более того, у белка GluE7 *Trichoplax* консервативный аргинин-485 заменен на неполярный лейцин, что должно нарушать связывание карбоксильных групп аминокислот, и, вероятно, его лиганды вообще не относятся к аминокислотам. Замены в этой позиции, помимо Placozoa, нами были найдены только у губок, все 63 проанализированных рецептора Bilateria имеют там аргинин. Один рецептор (GluE1) имеет мотив SAW в этих позициях, как у NMDA3-рецепторов млекопитающих

Таблица 1. Выравнивание фрагментов ионотропных глутаматных рецепторов, участвующих в связывании лигандов

Тип животных	Рецептор	Семейство	Лиганд	Аминокислотные позиции						
				450	478	480	485	653	655	704
Placozoa	GluE1_Hhon	Epsilon	неизвестный промежуточный	S S Y G S	A G A F S	I T V N R A	G G G A T E	F L	W D A A	
Placozoa	GluE1_Triad	Epsilon	глицин/D-серин	R N Y G S	A G A F S	I T A S R S	I D S E A M	F L	W D A A	
Placozoa	GluE2_Triad	Epsilon	неизвестный промежуточный	-	A G A F S	I T V K R S	I D T E A M	- - - -	- - - -	
Placozoa	GluE3_Triad	Epsilon	глицин/D-серин	N S Y G G	A G A F S	I T V K R S	A N S S Y E	F L	W D A A	
Placozoa	GluE4_Triad	Epsilon	неизвестный промежуточный	D S Y G G	A G A F S	I S V S R A	A N T S T E	F L	W D A A	
Placozoa	GluE5_Triad	Epsilon	неизвестный крупный	G Q Y G A	A A P L S	I S P V R Q	K E G S T N	F I	G D A S	
Placozoa	GluE6_Triad	Epsilon	глицин/D-серин	G Q Y G I	V A P L S	I T K E R E	A N S S I E	F L	Y D A S	
Placozoa	GluE7_Triad	Epsilon	неизвестный крупный	G Q Y G R	L V P L S	I T A E L Q	G N S S A E	F I	A D S T	
Placozoa	GluE8_Triad	Epsilon	неизвестный крупный	G Q Y G S	A A P L S	I T P E R Q	A G G S I H	Y I	G D A A	
Placozoa	GluE9_Triad	Epsilon	неизвестный крупный	G F Y G T	A A P L S	I T P E R Q	Q G S S V Y	F I	G G A T	
Placozoa	GluE10_Triad	Epsilon	неизвестный крупный	G Q Y G V	A A A L S	I T P E R Q	S G S S V H	F I	S D T A	
Placozoa	GluAkd1_Hhon	AKDF	глицин/D-серин	N I F G E	V A P L S	I T S F R Q	- - - -	F I	W Y S Q	
Placozoa	GluAkd1_Triad	AKDF		N I F G E	I A P L S	I T S F R Q	Q G S S V D	F I	W Y Y P	
Placozoa	GluAkd2_Hhon	AKDF		неизвестный промежуточный	K R Y G V	V A D L T	I T A D R E	R G G Q T S	F I	W D T P
Placozoa	GluAkd2_Triad	AKDF		неизвестный промежуточный	M I Y G A	F A D L T	I T A E R E	K G G H T S	F I	W D T P
Placozoa	GluAkd3_Hhon	AKDF		неизвестный промежуточный	G Q Y G S	I G D L T	I S Q Q R Q	S D T S L T	F L	L D Q P
Placozoa	GluAkd3_Triad	AKDF		неизвестный промежуточный	G Q Y G S	L G D F T	I S R E R Q	S D T S L T	F L	L D R P
Placozoa	GluAkd4_Hhon	AKDF		неизвестный промежуточный	H Q Y G Q	L A D L T	I T M H R E	R D S Q L H	F L	I D Q V
Placozoa	GluAkd4_Triad	AKDF		неизвестный промежуточный	H Q Y G A	L A D L T	I S L I R E	Q D S Q V H	F L	I D K A
Chordata	GluA2_Hsa	AMPA		L-глутамат	G K Y G A	I A P L T	I T L V R E	D S G S T K	Y L	L E S T
Arthropoda	GluA1-4_Ame	AMPA		L-глутамат	G K Y G M	I A P M T	I T S E R E	S H G S T W	L L	I E S P
Chordata	GluK2_Hsa	Kainate	L-глутамат	G K Y G A	V A P L A	I T Y V R E	E D G A T M	F L	M E S T	
Arthropoda	GluK1-5alpha_Ame	Kainate	L-глутамат	E R Y G S	I A D L T	I T Y D R E	K G G S T A	F L	M E S T	
Ctenophora	GluE13_Mle	Epsilon	L-глутамат	G R Y G H	A M D L S	V S S Q R R	Q N S V T S	L I	E D S L	
Ctenophora	GluE3_Pba	Epsilon	глицин	L K F G G	V V A L S	N N A V R K	D S R N P E	F I	D E I P	
Ctenophora	GluE7_Mle	Epsilon	глицин	R K F G A	A I D L S	T N S A R K	G S R H P E	F I	D E G P	
Chordata	GluE1_Bla	Epsilon	глицин	E N F G A	A A S F T	I S Y E R E	Q N S Q P L	F I	W D S A	
Chordata	GluE7_Bla	Epsilon	нет	G Q Y G I	L A P L S	I T S E R Q	S T Y A T W	L F	T D S A	
Chordata	GluN1_Hsa	NMDA	глицин/D-серин	G K F G T	V A P L T	I N N E R A	K Q S S V D	F I	W D S A	
Chordata	GluN3A_Hsa	NMDA	глицин/D-серин	G K Y G A	V T S F S	I N T A R S	R E S S A E	F I	M D K A	
Chordata	GluD2_Hsa	Delta	глицин/D-серин	V W D A A	I S A L T	I T P D R E	L D S A V Y	F V	W D A A	
Chordata	GluN2_Hsa	NMDA	L-Глу/L-Асп	G K H G K	V G S L T	I N E E R S	P N G S T E	F I	Y D A A	

Примечание. Лигандная специфичность приведенных в таблице рецепторов Chordata, Arthropoda и Ctenophora установлена экспериментально. Специфичность рецепторов Placozoa предсказана нами путем сравнения последовательностей с экспериментально охарактеризованными рецепторами. Аминокислоты, связывающие аминокислотную группу, карбоксильную группу и альфа-углерод лиганда, выделены светло-серым фоном. Аминокислоты, связывающие боковую цепь лиганда, выделены жирным шрифтом на светло-сером фоне. Аминокислоты, резко отличающиеся от гомологичных у других рецепторов, показаны белым шрифтом на черном фоне. Аминокислота в позиции 450 взаимодействует с альфа-углеродом лиганда, в позициях 478, 480 и 705 – связывают аминокислотную группу, 485 и 654 – альфа-карбоксильную группу. Аминокислотные позиции 653, 655 и 704 контактируют с боковой цепью лиганда и определяют специфичность рецептора. Специфичность “неизвестный промежуточный” указана для рецепторов, лиганд-связывающие мотивы которых сочетают признаки глутаматных и глициновых рецепторов. Они потенциально могут связывать бета-аланин, таурин и ГАМК. Специфичность “неизвестный крупный” – для рецепторов, у которых в 704 позиции объемные аминокислоты (Trp, Tyr, Leu, Ile, Met) заменены на компактные (Gly, Ala, Ser), и, соответственно, лиганд-связывающий карман больше, чем у типичных глутаматных рецепторов.

(лиганды – глицин и D-серин). Два рецептора, GluE3 и GluE6, имеют мотивы SYW и SIY, более сходные с NMDA1 млекопитающих, и тоже, вероятно, могут связывать глицин и D-серин. На-

конец, GluE4 имеет мотив TTW, сочетающий черты глицин-связывающих (W704) и глутамат-связывающих (T655) рецепторов, и его специфичность мы предположить не можем (табл. 1).

Из четырех AKDF-рецепторов *Trichoplax* один (GluAkdf1) имеет мотив SVW, как NMDA1 млекопитающих, и, вероятно, связывает глицин и D-серин. Три других имеют мотивы TLL, SVI, GTW, сочетающие черты глицин-связывающих и глутамат-связывающих белков, и их лигандная специфичность остается под вопросом.

Таким образом, из 14 ионотропных глутаматных рецепторов *Trichoplax* 4, предположительно, специфичны к глицину и D-серину, 5, вероятно, реагируют на какие-то лиганды большей молекулярной массы, чем глутамат, возможно даже не аминокислоты, и у 5 рецепторов лиганд-связывающие сайты имеют промежуточное строение между типичными глутаматными и глициновыми. Ни один из рецепторов *Trichoplax* не соответствует типичным глутаматным, ближе всего к ним рецептор GluAkdf2 с мотивом GTW.

Филогенез и эволюция метаболитных глутаматных и ГАМК_B-рецепторов

Метаболитные рецепторы глутамата и ГАМК относятся к G-белок-связанным рецепторам (GPCR) класса C, характеризующимся гетероили гомодимерной структурой. Этот класс рецепторов также включает внеклеточные кальциевые, вомероназальные, вкусовые рецепторы сладкого и умами, рецепторы стероидов GPRC6A и несколько рецепторов с неизвестными лигандами (orphan).

Из-за значительной дивергенции последовательностей GPCR класса C мы аннотировали и анализировали ГАМК_B отдельно от mGluR и родственных им рецепторов. При построении филогенетических деревьев рецепторов ГАМК_B последовательности mGluR использовали в качестве внешней группы, и наоборот.

В геноме *Trichoplax* нами обнаружено 34 гена mGluR-подобных рецепторов, что намного больше, чем у человека (8 mGluR и 4 mGluR-подобных рецепторов) и *Aplysia* (2 mGluR и 8 mGluR-подобных). Большое разнообразие mGluR-подобных рецепторов также найдено у коралла *Stylophora* (35 генов) и известковой губки *Sycon* (29 генов).

Филогенетическое дерево mGluR и родственных рецепторов (рис. 2) показывает большое разнообразие этих рецепторов у Placozoa. В это дерево также включены рецепторы внеклеточного кальция, вкусовые (сладкого и умами) и мембранный рецептор андрогенов GPRC6A, поскольку они более сходны с mGluR, чем с GABA-B. Рецепторы Bilateria на этом древе образуют две ветви. Одна составлена метаболитными глутаматными рецепторами (mGluR), другая — рецепторами внеклеточного кальция, вкусовыми и GPRC6A. Рецепторы *Trichoplax* образуют четыре ветви на древе. Два рецептора *Trichoplax* образуют сест-

ринскую ветвь к mGluR моллюсков (TriadITZ_005103, 005104). Три других белка *Trichoplax* составляют две ветви, близкие к ветви кальций-чувствительных, вкусовых рецепторов и рецепторов GPRC6 позвоночных (TriadITZ_006745, 006746, 009440). 29 iGluR-подобных рецепторов *Trichoplax* образуют свою собственную кладу, более отдаленно связанную с кальций-чувствительными, вкусовыми и GPRC6 рецепторами Bilateria.

Также у *Trichoplax* и ряда других видов обнаружено большое количество рецепторов ГАМК_B. У *Trichoplax* их 37, у *Stylophora* (Anthozoa) — 18, *Amphimedon* (Porifera) — 21, *Saccoglossus* (Hemichordata) — 28. Это резко отличает их от позвоночных, моллюсков и членистоногих, которые имеют не более четырех рецепторов этого семейства. На филогенетическом древе рецепторов ГАМК_B (рис. 3) рецепторы *Trichoplax*, Porifera и Cnidaria образуют множество ветвей, перемешанных друг с другом и с рецепторами полухордового *Saccoglossus*.

Примечательно, что кладу рецепторов Placozoa и Cnidaria является сестринской к рецепторам ГАМК_B Bilateria. Общая топология древа с несколькими кладами рецепторов Placozoa и Cnidaria предполагает, что диверсификация семейства рецепторов ГАМК_B началась на самых ранних стадиях эволюции животных, и Bilateria (кроме *Saccoglossus*) потеряли большую часть этого древнего разнообразия.

Микроэволюция глутаматных и ГАМК_B-рецепторов у Placozoa

Мы провели филогенетический анализ ионотропных и метаболитных рецепторов, используя последовательности двух относительно близких видов Placozoa — *Trichoplax adhaerens* и *Hoilungia hongkongensis*. Это позволило нам выявить события дупликаций и делеций генов, произошедшие после расхождения этих видов.

H. hongkongensis отличается от *T. adhaerens* меньшим количеством генов ионотропных глутаматных рецепторов (5 вместо 14) и большим — метаболитных глутаматных и ГАМК_B-рецепторов (43 и 49 вместо 34 и 37 соответственно). Среди ионотропных рецепторов отличия касаются только семейства Epsilon. *Trichoplax* имеет 10 этих рецепторов, *Hoilungia* — лишь один. На древе Epsilon-рецептор *Hoilungia* является сестринским к белку *Trichoplax* GluE1, дивергенция остальных Epsilon-рецепторов *Trichoplax* произошла ближе к корню древа. Это означает потерю *Hoilungia* разнообразия рецепторов, которое было у ее общего предка с *Trichoplax*. Набор AKDF-рецепторов *Hoilungia* и *Trichoplax* идентичен, оба вида имеют по четыре рецептора, которые на древе объединяются в пары ортологов.

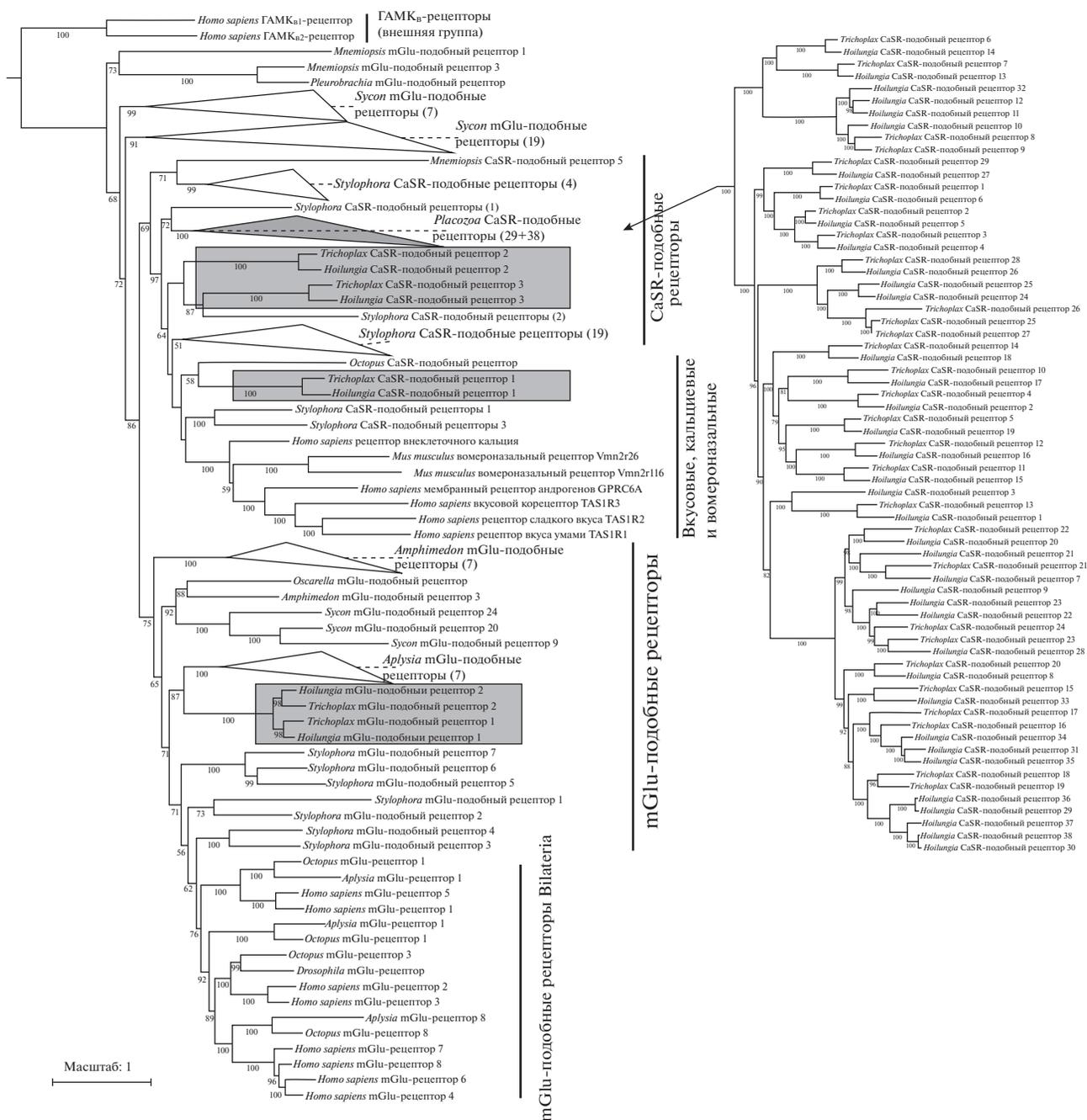


Рис. 2. Филогенетическое древо 189 метаботропных глутаматных рецепторов (mGluRs) животных. Древо построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Ветви рецепторов Placozoa выделены серым фоном. Ветви многочисленных рецепторов одного и того же организма схлопнуты в треугольники. Схлопнутые ветви рецепторов Placozoa показаны в развернутом виде в правой части рисунка. Выравнивание состояло из 4306 позиций, 1574 из них информативных.

На филогенетических деревьях метаботропных рецепторов (рис. 2 и 3) видно 24 пары ортологичных рецепторов mGluR *Trichoplax* и *Hoilungia* и 29 пар GABA-B рецепторов. Соответственно, чтобы объяснить количество этих рецепторов у современных Placozoa, после расхождения *Trichoplax* и *Hoilungia* должны были произойти не

менее 19 дупликаций и делеций генов mGluR и не менее 28 – генов GABA-B рецепторов.

Таким образом, во всех трех семействах рецепторов у Placozoa происходят многочисленные дупликации и/или делеции генов, причем в эволюции р. *Hoilungia* преобладала потеря ионотропных и дупликация метаботропных рецепторов.

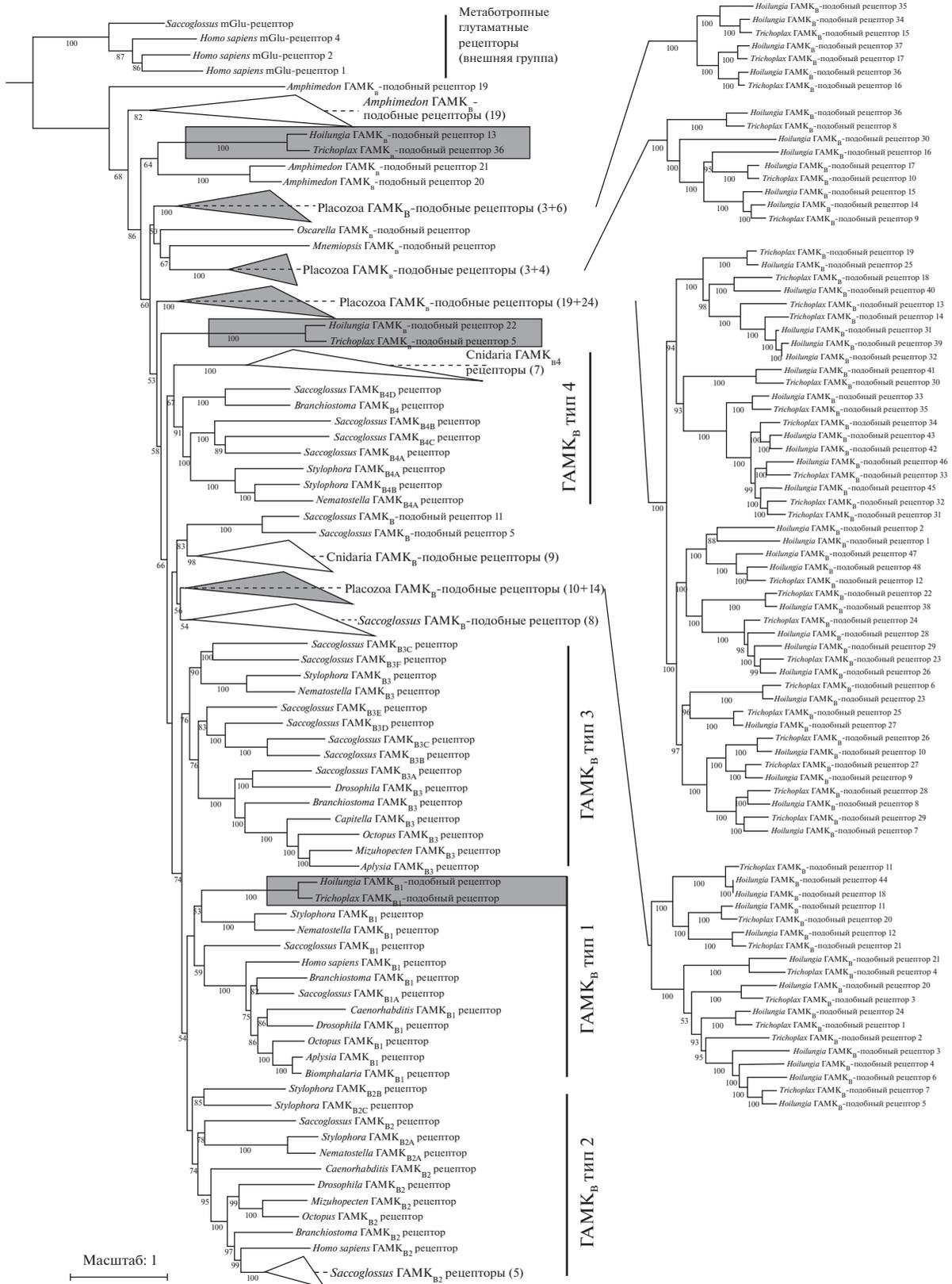


Рис. 3. Филогенетическое древо 190 метаботропных GAMK_B-рецепторов животных. Древо построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood). Ветви рецепторов Placozoa выделены серым фоном. Ветви многочисленных рецепторов одного и того же организма схлопнуты в треугольники. Схлопнутые ветви рецепторов Placozoa показаны в развернутом виде в правой части рисунка. Выравнивание состояло из 6303 позиций, 1700 из них информативных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы обнаружили у Placozoa большое разнообразие рецепторов iGluR, mGluR и GABA-B. Количество iGluR *Trichoplax* (14) сопоставимо с таковым у животных с нервной системой (17 у человека), а количество метаботропных рецепторов mGluR и GABA-B даже выше, чем у большинства Bilateria.

Сравнение аминокислот, участвующих в связывании лигандов, указывает на большое разнообразие лигандной специфичности iGluR *Trichoplax*. Среди них пять рецепторов имеют детерминанты лигандной специфичности, промежуточные между типичными глутаматными и глициновыми, а еще пять, предположительно, связывают более крупные молекулы, чем глутамат. Следовательно, функции iGluR Placozoa не могут ограничиваться глутаматной и глициновой передачей, они также участвуют в восприятии других веществ, причем скорее из внешней среды. На это указывает и почти полная (9 из 10) потеря Epsilon iGluR у *Hoilungia*. Из нашего опыта культивирования этого рода известно, что у *Hoilungia* есть те же основные формы поискового, пищевого и социального поведения, что и у *Trichoplax*, следовательно, потерянные iGluR не играли важной роли в этих программах поведения.

Какие молекулы потенциально могут связывать iGluR с “промежуточными” лиганд-связывающими сайтами? Это могут быть, например, аминокислоты, промежуточные по строению между глицином и глутаматом: ГАМК, бета-аланин и таурин. Трансмиттерные функции ГАМК у различных животных хорошо известны. Бета-аланин связывается с ГАМК_A, NMDA и ионотропными глициновыми рецепторами млекопитающих и играет роль нейромодулятора (Tiedje et al., 2010). Таурин у млекопитающих тоже связывается с ГАМК_A и глициновыми рецепторами и работает нейромодулятором, нейропротектором и регулятором развития нейронов (Wu, Prentice, 2010). У кишечнополостных таурин и бета-аланин накапливаются в синаптических пузырьках, выделяются нейронами в ответ на электрическую стимуляцию и вызывают потенциалы действия постсинаптических мембран, т.е. являются настоящими нейротрансмиттерами (Anderson, Trapido-Rosenthal, 2009). Поэтому вероятно, что рецепторы бета-аланина и таурина могут присутствовать и у безнервных животных, таких как Placozoa.

Гены рецепторов iGluR, mGluR и ГАМК_B Placozoa неожиданно склонны к дупликациям и делециям. Со времени расхождения *Trichoplax* и *Hoilungia* произошло около 0.6 делеций и/или дупликаций на ген. Время расхождения *Trichoplax* и *Hoilungia* оценивается в 20–50 млн лет назад (Eitel et al., 2018). Для сравнения, человек и мышь име-

ют идентичные наборы генов глутаматных рецепторов, несмотря на 100 млн лет независимой эволюции. *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura* и *D. virilis* тоже имеют одни и те же глутаматные рецепторы, хотя разошлись около 50 млн лет назад (Nozawa, Nei, 2007). Рецепторы Placozoa по эволюционной динамичности сходны с обонятельными рецепторами Bilateria. Так, у далеких видов *Drosophila* за 50 млн лет произошло 0.2 дупликаций и делеций на ген обонятельных рецепторов, у различных отрядов млекопитающих – 0.5–0.7 дупликаций и делеций на ген за 100 млн лет (Nozawa, Nei, 2007; Niimura et al., 2014). Эволюционная динамичность характерна для генных семейств, участвующих во взаимодействии с переменными факторами внешней среды – обонятельных рецепторов, белков иммунной системы, ферментов детоксикации и белков, участвующих во взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки (Aagaard et al., 2006; Konofov et al., 2017; Vicens et al., 2017). Поэтому можно ожидать, что большинство mGluR-подобных и ГАМК_B-подобных рецепторов Placozoa участвуют в хеморецепции внешних стимулов. Даже у млекопитающих часть GPCR класса C сохраняют эту функцию как вкусовые (TASR) и вомероназальные рецепторы. Однако у Placozoa есть ортологи ГАМК_B-рецепторов позвоночных и mGluR *Aplysia*, которые являются первыми кандидатами на восприятие эндогенных ГАМК и глутамата.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Д.Ю. Романову за ценные обсуждения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа финансировалась из средств гранта РФ № 22-24-00566.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликты интересов отсутствуют.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алешин В.В., Петров Н.Б., 2002. Молекулярные свидетельства регресса в эволюции Metazoa // Журн. общ. биологии. Т. 63. № 3. С. 195–208.
- Бузников Г.А., 1987. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. М.: Наука. 232 с.

- Закатаева Н.П., Кутукова Е.А., Гронский С.В., Трошин П.В., Лившиц В.А., Алёшин В.В., 2006. Экспорт метаболитов белками семейств DMT и RhtV и их возможная роль в межклеточной коммуникации // Микробиология. Т. 75. № 4. С. 509–520.
- Окитейн И.Л., 1987. К биологии *Trichoplax* sp. (Placozoa) // Зоол. журн. Т. 66. № 3. С. 325–338.
- Серавин Л.Н., 1987. Особенности ориентировки беспозвоночных в трехмерном пространстве // Зоол. журн. Т. 66. № 9. С. 1285–1292.
- Aagaard J., Yi X., Maccoss M., Swanson W., 2006. Rapidly evolving zona pellucida domain proteins are a major component of the vitelline envelope of abalone eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 103. P. 17302–17307.
- Agnati L.F., Bjelke B., Fuxe K., 1995. Volume versus wiring transmission in the brain: A new theoretical frame for neuropsychopharmacology // Med. Res. Rev. V. 15. № 1. P. 33–45.
- Alberstein R., Grey R., Zimmel A., Simmons D.K., Mayer M.L., 2015. Glycine activated ion channel subunits encoded by ctenophore glutamate receptor genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 112. № 44. P. 6048–6057.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z. et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
- Anderson P.A.V., Trapido-Rosenthal H.G., 2009. Physiological and chemical analysis of neurotransmitter candidates at a fast excitatory synapse in the jellyfish *Cyanea capillata* (Cnidaria, Scyphozoa) // Invert. Neurosci. V. 9. № 3. P. 167–173.
- Anjard C., 2006. GABA induces terminal differentiation of *Dictyostelium* through a GABAB receptor // Development. V. 133. № 11. P. 2253–2261.
- Armstrong N., Gouaux E., 2000. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: Crystal structures of the GluR2 ligand binding core // Neuron. V. 28. № 1. P. 165–181.
- Bansal P., Wang S., Liu S., Xiang Y.-Y., Lu W.-Y., Wang Q., 2011. GABA Coordinates with insulin in regulating secretory function in pancreatic INS-1 β -cells // PLoS One. V. 6. № 10. Art. e26225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026225>
- Bortoli S., de Teardo E., Szabò I., Morosinotto T., Alboresi A., 2016. Evolutionary insight into the ionotropic glutamate receptor superfamily of photosynthetic organisms // Biophys. Chem. V. 218. P. 14–26.
- Bucci G., Ramoino P., Diaspro A., Usai C., 2005. A role for GABA receptors in the modulation of *Paramecium* swimming behavior // Neurosci. Lett. V. 386. № 3. P. 179–183.
- Chen G.Q., Cui C., Mayer M.L., Gouaux E., 1999. Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor // Nature. V. 402. № 6763. P. 817–821.
- Chevrot R., Rosen R., Haudecoeur E., Cirou A., Shelp B.J. et al., 2006. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 103. № 19. P. 7460–7464.
- Delmonte Corrado M.U., Ognibene M., Trielli F., Politi H., Passalacqua M., Falugi C., 2002. Detection of molecules related to the GABAergic system in a single-cell eukaryote, *Paramecium primaurelia* // Neurosci. Lett. V. 329. № 1. P. 65–68.
- Dubos C., Huggins D., Grant G.H., Knight M.R., Campbell M.M., 2003. A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors // Plant J. V. 35. № 6. P. 800–810.
- Eitel M., Francis W.R., Varoqueaux F., Daraspe J., Osigus H.-J. et al., 2018. Comparative genomics and the nature of placozoan species // PLoS Biol. V. 16. № 7. Art. e2005359. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005359>
- Feng J.-M., Xiong J., Zhang J.-Y., Yang Y.-L., Yao B. et al., 2014. New phylogenomic and comparative analyses provide corroborating evidence that Myxozoa are Cnidaria // Mol. Phylogenet. Evol. V. 81. P. 10–18.
- Ferrier D.E.K., 2016. The origin of the Hox/ParaHox genes, the Ghost Locus hypothesis and the complexity of the first animal // Brief. Funct. Genomics. V. 15. № 5. P. 333–341.
- Feuda R., Dohrmann M., Pett W., Philippe H., Rota-Stabelli O. et al., 2017. Improved modeling of compositional heterogeneity supports sponges as sister to all other animals // Curr. Biol. V. 27. № 24. P. 3864–3870.e4.
- Fortunato A., Aktipis A., 2019. Social feeding behavior of *Trichoplax adhaerens* // Front. Ecol. Evol. V. 7. Art. 19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00019>
- Furukawa H., Singh S.K., Mancusso R., Gouaux E., 2005. Subunit arrangement and function in NMDA receptors // Nature. V. 438. № 7065. P. 185–192.
- Heyland A., Moroz L.L., 2005. Cross-kingdom hormonal signaling: an insight from thyroid hormone functions in marine larvae // J. Exp. Biol. V. 208. № 23. P. 4355–4361.
- Heyland A., Hodin J., Reitzel A.M., 2005. Hormone signaling in evolution and development: A non-model system approach // Bioessays. V. 27. № 1. P. 64–75.
- Hoang D.T., Chernomor O., Haeseler A., von Minh B.Q., Vinh L.S., 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation // Mol. Biol. Evol. V. 35. № 2. P. 518–522.
- Katoh K., Standley D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability // Mol. Biol. Evol. V. 30. № 4. P. 772–780.
- Kinnersley A.M., Lin F., 2000. Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid (GABA) is a potential modulator of ion transport in plants // Plant Growth Regulation. V. 32. № 1. P. 65–76.
- Konorov E.A., Nikitin M.A., Mikhailov K.V., Lysenkov S.N., Belenky M. et al., 2017. Genomic exaptation enables *Lasius niger* adaptation to urban environments // BMC Evol. Biol. V. 17. Art. 39. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0867-x>
- Layden M.J., 2019. Origin and evolution of nervous systems // Old Questions and Young Approaches to Animal Evolution Fascinating Life Sciences / Eds Martín-Durán J.M., Vellutini B.C. Cham: Springer International Publishing. P. 151–171.
- Levy S., Brekhman V., Bakhman A., Malik A., Sebé-Pedrós A. et al., 2021. Ectopic activation of GABA B receptors inhibits neurogenesis and metamorphosis in the cnidarian *Nematostella vectensis* // Nat. Ecol. Evol. V. 5. № 1. P. 111–121.

- Mayer M.L., 2021. Structural biology of kainate receptors // *Neuropharmacology*. V. 190. Art. 108511. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108511>
- Mayorova T.D., Smith C.L., Hammar K., Winters C.A., Pivovarova N.B. et al., 2018. Cells containing aragonite crystals mediate responses to gravity in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), an animal lacking neurons and synapses // *PLoS One*. V. 13. № 1. Art. e0190905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190905>
- Moroz L.L., Kocot K.M., Citarella M.R., Dosung S., Norekian T.P. et al., 2014. The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems // *Nature*. V. 510. P. 110–114.
- Moroz L.L., Nikitin M.A., Poličar P.G., Kohn A.B., Romanova D.Y., 2021a. Evolution of glutamatergic signaling and synapses // *Neuropharmacology*. V. 199. Art. 108740. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108740>
- Moroz L.L., Romanova D.Y., Kohn A.B., 2021b. Neural versus alternative integrative systems: molecular insights into origins of neurotransmitters // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* V. 376. № 1821. Art. 20190762. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0762>
- Moroz L.L., Romanova D.Y., Nikitin M.A., Sohn D., Kohn A.B. et al., 2020a. The diversification and lineage-specific expansion of nitric oxide signaling in Placozoa: Insights in the evolution of gaseous transmission // *Sci. Rep.* V. 10. № 1. Art. 13020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69851-w>
- Moroz L.L., Sohn D., Romanova D.Y., Kohn A.B., 2020b. Microchemical identification of enantiomers in early-branching animals: Lineage-specific diversification in the usage of D-glutamate and D-aspartate // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 527. № 4. P. 947–952.
- Naur P., Hansen K.B., Kristensen A.S., Dravid S.M., Pickering D.S. et al., 2007. Ionotropic glutamate-like receptor $\delta 2$ binds d-serine and glycine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 104. № 35. P. 14116–14121.
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., Haeseler A., von, Minh B.Q., 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* V. 32. № 1. P. 268–274.
- Nielsen C., 2019. Early animal evolution: A morphologist's view // *R. Soc. Open Sci.* V. 6. № 7. Art. 190638. <https://doi.org/10.1098/rsos.190638>
- Niimura Y., Matsui A., Touhara K., 2014. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals // *Genome Res.* V. 24. № 9. P. 1485–1496.
- Niswender C.M., Conn P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* V. 50. P. 295–322.
- Nozawa M., Nei M., 2007. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in *Drosophila* species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 104. № 17. P. 7122–7127.
- Podvyaznaya I.M., Galaktionov K.V., 2012. Morpho-functional specialization of the branching sporocyst of *Prosohynchoides borealis* Bartoli, Gibson & Bray, 2006 (Digenea, Bucephalidae) // *J. Helminthol.* V. 86. № 2. P. 173–184.
- Preston R.R., Usherwood P.N.R., 1988. L-Glutamate-induced membrane hyperpolarization and behavioural responses in *Paramecium tetraurelia* // *J. Comp. Physiol.* V. 164. № 1. P. 75–82.
- Quillin S.J., Tran P., Prindle A., 2021. Potential roles for gamma-aminobutyric acid signaling in bacterial communities // *Bioelectricity*. V. 3. № 2. P. 120–125.
- Ramoino P., Candiani S., Pittaluga A.M., Usai C., Gallus L., et al., 2014. Pharmacological characterization of NMDA-like receptors in the single-celled organism *Paramecium primaurelia* // *J. Exp. Biol.* V. 217. № 3. P. 463–471.
- Ramoino P., Fronte P., Beltrame F., Diaspro A., Fato M. et al., 2003. Swimming behavior regulation by GABAB receptors in *Paramecium* // *Exp. Cell Res.* V. 291. № 2. P. 398–405.
- Ramoino P., Milanese M., Candiani S., Diaspro A., Fato M. et al., 2010. γ -Amino butyric acid (GABA) release in the ciliated protozoan *Paramecium* occurs by neuronal-like exocytosis // *J. Exp. Biol.* V. 213. № 8. P. 1251–1258.
- Ramos-Vicente D., Grant S.G.N., Bayés À., 2021. Metazoan evolution and diversity of glutamate receptors and their auxiliary subunits // *Neuropharmacology*. V. 195. Art. 108640. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108640>
- Ramos-Vicente D., Ji J., Gratacòs-Batlle E., Gou G., Reig-Viader R. et al., 2018. Metazoan evolution of glutamate receptors reveals unreported phylogenetic groups and divergent lineage-specific events // *eLife*. V. 7. Art. e35774. <https://doi.org/10.7554/eLife.35774>
- Romanova D.Y., Heyland A., Sohn D., Kohn A.B., Fasshauer D. et al., 2020. Glycine as a signaling molecule and chemoattractant in *Trichoplax* (Placozoa): Insights into the early evolution of neurotransmitters // *NeuroReport*. V. 31. № 6. P. 490–497.
- Ronquist F., Teslenko M., Mark P., van der, Ayres D.L., Darling A. et al., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* V. 61. № 3. P. 539–542.
- Ryan J.F., Pang K., Schnitzler C.E., Nguyen A.-D., Moreland R.T. et al., 2013. The genome of the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its implications for cell type evolution // *Science*. V. 342. № 6164. Art. 1242592. <https://doi.org/10.1126/science.1242592>
- Sakharov D.A., 1974. Evolutionary aspects of transmitter heterogeneity // *Neurovegetative Transmission Mechanisms* / Eds Csillik B., Kappers J.A. Vienna: Springer. P. 43–59.
- Senatore A., Reese T.S., Smith C.L., 2017. Neuropeptidergic integration of behavior in *Trichoplax adhaerens*, an animal without synapses // *J. Exp. Biol.* V. 220. № 18. P. 3381–3390.
- Simion P., Philippe H., Baurain D., Jager M., Richter D.J., et al., 2017. A large and consistent phylogenomic dataset supports sponges as the sister group to all other animals // *Curr. Biol.* V. 27. № 7. P. 958–967.
- Slyusarev G.S., Nesterenko M.A., Starunov V.V., 2019. The structure of the muscular and nervous systems of the male *Intoshia linei* (Orthonectida) // *Acta Zool.* V. 100. № 4. P. 451–458.
- Smith C.L., Pivovarova N., Reese T.S., 2015. Coordinated feeding behavior in *Trichoplax*, an animal without syn-

- apses // PLoS One. V. 10. № 9. Art. e0136098.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136098>
- Smith C.L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Azzam R.N., Cooper B. et al., 2014. Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens* // Curr. Biol. V. 24. № 14. P. 1565–1572.
- Špírková A., Kovaříková V., Šeříčková Z., Pisko J., Kšíňanová M. et al., 2022. Glutamate can act as a signaling molecule in mouse preimplantation embryos // Biol. Reprod. V. 107. № 4. P. 916–927.
- Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U. et al., 2008. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans // Nature. V. 454. № 7207. P. 955–960.
- Syed T., Schierwater B., 2002. *Trichoplax adhaerens*: Discovered as a missing link, forgotten as a hydrozoan, re-discovered as a key to metazoan evolution // Vie Milieu. V. 52. P. 177–187.
- Szathmáry E., Smith J.M., 1995. The major evolutionary transitions // Nature. V. 374. № 6519. P. 227–232.
- Terunuma M., 2018. Diversity of structure and function of GABAB receptors: A complexity of GABAB-mediated signaling // Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. V. 94. № 10. P. 390–411.
- Tiedje K.E., Stevens K., Barnes S., Weaver D.F., 2010. Beta-alanine as a small molecule neurotransmitter // Neurochem. Int. V. 57. № 3. P. 177–188.
- Tikhonenkov D.V., Mikhailov K.V., Hehenberger E., Karpov S.A., Prokina K.I. et al., 2020. New lineage of microbial predators adds complexity to reconstructing the evolutionary origin of animals // Curr. Biol. V. 30. № 22. P. 4500–4509.
- Ueda T., Koya S., Maruyama Y.K., 1999. Dynamic patterns in the locomotion and feeding behaviors by the placozoan *Trichoplax adhaerens* // Biosystems. V. 54. № 1. P. 65–70.
- Varoqueaux F., Williams E.A., Grandemange S., Truscello L., Kamm K. et al., 2018. High cell diversity and complex peptidergic signaling underlie placozoan behavior // Curr. Biol. V. 28. № 21. P. 3495–3501.e2.
- Vicens A., Borziak K., Karr T.L., Roldan E.R.S., Dorus S., 2017. Comparative sperm proteomics in mouse species with divergent mating systems // Mol. Biol. Evol. V. 34. № 6. P. 1403–1416.
- Wu J.-Y., Prentice H., 2010. Role of taurine in the central nervous system // J. Biomed. Sci. V. 17. Suppl 1. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-S1-S1>
- Yao Y., Harrison C.B., Freddolino P.L., Schulten K., Mayer M.L., 2008. Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors // EMBO J. V. 27. № 15. P. 2158–2170.
- Zverkov O.A., Mikhailov K.V., Isaev S.V., Rusin L.Y., Popova O.V. et al., 2019. Dicyemida and Orthonectida: Two stories of body plan simplification // Front. Genet. V. 10. Art. 443. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00443>

Glutamate and GABA receptors in non-neural animals (Placozoa): Preadaptation to neural transmission

M. A. Nikitin^{a, *}, S. I. Borman^b

^a*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University
Leninskiye gory, 1, bld. 40, Moscow, 119992 Russia*

^b*Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS
Vavilov st., 26, Moscow, 119334 Russia*

*e-mail: nikitin.fbb@gmail.com

Origins of neural system is one of the major transitions in planetary evolution. Many details of these transitions are still unknown. In particular, high diversity of neurotransmitters lacks convincing explanation so far. We analyze homologues of neuronal glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors of Placozoa – animal phyla lacking neurons but displaying motility and complex behaviour. Phylogenetic analysis and comparison of amino acids in ligand-binding pockets show that glutamate and GABA-like receptors of Placozoa are surprisingly numerous, diverse and fast-evolving. All these traits are characteristic of odorant rather than neurotransmitter receptors of higher animals. We argue that chemoreception system was an important source of diverse receptors for emerging nervous system to recruit, and that amino acid neurotransmitters (glutamate, GABA, glycine) were relevant external stimuli for early animals before the emergence of nervous system.