

Опсины гребневиков отряда Cydippida: филогения, структура и потенциальная возможность фоторецепции

Баяндина Ю.*, Кулешова О., Кривенко О.

ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», Севастополь, Россия

* sepulturka@mail.ru

Ключевые слова: фоторецепция, гребневики, Cydippida, опсины, белковые последовательности.

Мотивация и цель. Опсины – ключевой элемент зрения и фоторецепции у большинства многоклеточных организмов. Они представляют собой G-белок связывающие трансмембранные рецепторы (GPCR), содержащие ретиналь в качестве светочувствительного хромофора. Эти фоторецепторные белки появились на ранних этапах эволюции многоклеточных животных (Metazoa). В ходе дальнейшей эволюции семейство опсинов претерпело значительную диверсификацию и расширение в различных таксонах животных. Ранние этапы эволюции опсинов остаются малоизученными [1]. Особый интерес представляет исследования фоторецепции у гребневиков, поскольку у этой древней группы многоклеточных животных сохранились предковые компоненты зрения [2, 3]. До недавнего времени знания об опсинах гребневиков были весьма ограниченными: были обнаружены только три паралога опсинов у двух видов гребневиков - *Mnemiopsis leidyi* и *Pleurobrachia bachei* [3]. В геномах и транскриптомах *Beroe* мы обнаружили три опсина, гомологичных опсинам *M. leidyi* и *P. bachei* [4]. Однако этих данных недостаточно для однозначного определения положения опсинов гребневиков на общем эволюционном древе.

В данном исследовании мы провели анализ транскриптомных данных, доступных в базе NCBI, для различных видов гребневиков отряда Cydippida. одного из широко распространенных отрядов гребневиков. Целью анализа было выявление и идентификация белок-кодирующих последовательностей, которые могут быть связаны с восприятием света и фоторецепцией у этих морских животных.

Методы и алгоритмы. Мы проанализировали данные SRA для 24 транскриптомов Cydippida, найденных в NCBI: Cydippida sp. LM-2017 (SRR6074511), Cydippida sp. UF-2017 (SRR5892578), *Callianira antarctica* (SRR5892575), *Pleurobrachia pileus* (SRR6074514, SRR789901), *Pleurobrachia* sp. (SRR6074519, SRR6074520, SRR6074517, SRR5892573), *Pukia falcata* (SRR5892572), *Dryodora glandiformis* (SRR3048699, SRR777788), *Mertensiidae* sp. (SRR786492), *Euplokamis dunlapae* (SRR777663, SRR3048351), *Hormiphora californensis* (SRR10237136, SRR1992642), *Hormiphora palmata* (SRR6074513), *Lampea pancerina* (SRR3407163), *Lampea lacteal* (SRR3048349), *Bathytена chuni* (SRR3048487), *Haeckelia rubra* (SRR3048520), *Haeckelia beehleri* (SRR3048894), *Aulacoctena acuminata* (SRR3049024), а также собственные данные транскриптома *Pleurobrachia pileus* (SRR26700624). Предварительную обработку данных, сборку транскриптома *de novo*, предсказание белковых последовательностей и автоматическую аннотацию проводили с помощью следующих программных средств: fastP v0.23.2, Trinity v2.13.2, TransDecoder v5.5.0, BLAST v.2.12.0, HMMER 3.2.1. SwisProt (11/17/2021) и Pfam-A (11/15/2021). Набор данных, полученный по запросу «Opsin» от SwisProt

и TrEMBL, был использован для поиска белков, участвующих в фоторецепции у *Cydippida*. Выравнивание последовательностей и филогенетический анализ мы проводили с помощью программ MAFFT v.7.48, IQ-TREE 1.6.12 с использованием набора последовательностей опсинов, представленных в работе Shettigar и соавторов в 2021 г. [5].

Результаты. Мы идентифицировали три гомолога белка семейства опсинов (обозначенных как Opsin1, 2, 3) в 13 из 16 проанализированных транскриптомов отдельных видов *Cydippida*. В транскриптоме *Cydippida* sp. UF-2017 обнаружен только гомолог Opsin1. В транскриптомах глубоководных видов *Bathycтена chuni* и *Aulacoctena acuminata*, обитающих на глубинах до 5000 метров, обнаружены только гомологи опсина третьей группы. Идентичность выровненных фрагментов опсинов *Cydippida* каждой группы, при сравнении с гомологичной последовательностью *Mnemiopsis leidyi* и *Pleurobrachia bachei*, по данным BlastP варьировала от 21 до 99% при покрытии от 47 до 99%.

На основе набора данных работы [5], дополненных последовательностями *Beroidea* и *Cydippida*, мы реконструировали филогенетическое дерево опсинов животных с использованием метода максимального правдоподобия. Были идентифицированы две монофилетические группы опсинов гребневи́ков (или ктенопсинов).

Одна из монофилетических групп включает две сестринские клады: Ктенопсин1 и Ктенопсин2. По-видимому, они разошлись после дупликации гена опсина, присутствовавшего у общего предка *Lobata*, *Cydippida* и *Beroidea*. В настоящее время нет свидетельств дальнейшего расширения семейства генов опсина в эволюции гребневи́ков. Согласно нашему филогенетическому анализу, группа, включающая ктенопсины 1 и 2, может быть сестринской по отношению ко всем другим опси́нам многоклеточных животных, за исключением так называемых опсинов *Anthozoan*II. Ктенопсин3 образует монофилетическую кладу вне основных групп опсинов животных, которая могла первой отделиться от общего дерева эволюции этих белков у *Metazoa*.

Опсины *Cydippida* соответствуют стандартной 7-трансмембранной топологии GPCR. Анализ их структуры подтвердил особенности их структуры, выявленные ранее в опсинах *Beroe* и *Mnemiopsis*. В частности, все ктенопсины второго типа имеют большую вставку между пятой и шестой трансмембранными альфа-спиралями. В результате в области третьей цитоплазматической петли формируется две дополнительные спирали, отсутствующие в опсинах других животных. Эта область имеет решающее значение для взаимодействия между опси́ном и G-белком, и поэтому дополнительные цитоплазматические структуры могут влиять на особенности функционирования рецептора. Ктенопсины третьей группы имеют уникальную вставку из 13 аминокислотных остатков, следующих сразу за остатком Lys(K)296, через который ретиналь связывается с апопротеином у всех животных опсинов. Поскольку это может вызвать существенные изменения в структуре 7-ТМ и нарушать общую форму хромофорного кармана, способность Ктенопсинов3 связывать свет представляется мало вероятной.

Аминокислотные последовательности опсинов гребневи́ков сравнили с другими визуальными опсинами животных, чтобы оценить возможность их участия в фоторецепции. В Ктенопсине 1 и Ктенопсине 2 мы идентифицировали ключевые консервативные остатки и мотивы, необходимые для связывания с ретиналем и стабилизации конформационных состояний апопротеина. Уникальные консервативные мотивы были обнаружены в областях, обеспечивающих связь

опсина с G-белком. В последовательностях Ктенопсина3, отсутствовали консервативные остатки, отвечающие за поглощение фотона света в других животных опсинах и присутствовали некоторые консервативные мотивы, связанные со связыванием G-белка, характерные для других опсинов животных и отсутствующие в Ктенопсинах 1 и 2.

Заключение. Филогенетический анализ показал, что у гребневиков существует три типа опсинов. По-видимому, только два из них способны участвовать в фоторецепции, поскольку содержат все необходимые молекулярные компоненты для связывания с ретиналом и способность поддерживать конформационные изменения в различных световых условиях. Эти опсины образуют монофилетическую группу, и разошлись после дупликации гена опсина, общего для предков Lobata, Cydippida и Beroidea. Нет никаких свидетельств дальнейшего расширения семейства генов опсина в эволюции гребневиков.

Финансирование: Работа выполнена в рамках Государственного задания ФИЦ ИнБЮМ «Биоразнообразие как основа устойчивого функционирования морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения» № 124022400148-4.

Ctenophore opsins from Cydippida: phylogeny, structure, and potential ability for photoreception

Baiandina Iu.*, Kuleshova O., Krivenko O.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russia

* sepulturka@mail.ru

Key words: photoreception, ctenophores, *Cydippida*, opsins, protein sequences.

Motivation and Aim: Motivation and Aim: Opsins form the basis of vision in most multicellular animals. Opsins are G-protein-coupled receptors (GPCRs) that contain a retinal chromophore. The opsin family originated early in animal evolution and expanded significantly across many different animal lineages. The early evolution of opsins remains poorly understood [1]. In this regard, light reception of ctenophores is important, as ancestral components of vision may have been conserved during the evolution of this ancient animal group [2, 3]. Until recently, knowledge of ctenophore opsins was limited to three paralogs in the *Mnemiopsis leidyi* and *Pleurobrachia bachei* [3]. Additionally, in the genomic and transcriptomic data from *Beroe*, we found three opsins that are homologous to those in *M. leidyi* and *P. bachei* [4]. However, the available data do not provide enough information to unambiguously determine the position of ctenophore opsins on the metazoan evolutionary tree or classify them into any known opsin group. In this study, we conducted an analysis of transcriptomic data available in the NCBI for various species of cydippid ctenophores, one of the most widespread orders of ctenophores. The aim of the analysis was to identify and characterize protein-coding sequences that may be associated with light perception and photoreception in these marine animals.

Methods and Algorithms We analyzed 24 samples of *Cydippida* SRA transcriptome data available at NCBI: *Cydippida* sp. LM-2017 (SRR6074511), *Cydippida* sp. UF-2017 (SRR5892578), *Callianira antarctica* (SRR5892575), *Pleurobrachia pileus*

(SRR6074514, SRR789901), *Pleurobrachia* sp. (SRR6074519, SRR6074520, SRR6074517, SRR5892573), *Pukia falcata* (SRR5892572), *Dryodora glandiformis* (SRR3048699, SRR777788), *Mertensiidae* sp. (SRR786492), *Euplokamis dunlapae* (SRR777663, SRR3048351), *Hormiphora californensis* (SRR10237136, SRR1992642), *Hormiphora palmata* (SRR6074513), *Lampea pancerina* (SRR3407163), *Lampea lacteal* (SRR3048349), *Bathytена chuni* (SRR3048487), *Haeckelia rubra* (SRR3048520), *Haeckelia beehleri* (SRR3048894), *Aulacoctena acuminata* (SRR3049024), as well as own transcriptome data on *Pleurobrachia pileus* (SRR26700624). Data pre-preprocessing, *de novo* transcriptome assembling, prediction of protein sequences, and automatic annotation were carried out using the following programs: fastP v0.23.2, Trinity v2.13.2, TransDecoder v5.5.0, BLAST v.2.12.0, HMMER 3.2.1. SwisProt (11/17/2021) and Pfam-A (11/15/2021). The dataset established by the "Opsin" query from SwisProt and TrEMBL was used to search for proteins involved in photoreception in cydippids. We performed sequence alignment and phylogenetic analysis using programs MAFFT v.7.48, IQ-TREE 1.6.12 using a set of opsin sequences analyzed by Shettigar and co-authors in 2021 [5].

Results: We have identified three homologous opsin family proteins (noted as Opsin1, 2, 3) in the transcriptomes of 13 out of 16 species of Cydippida that were analyzed. In the transcriptome of Cydippida sp. UF-2017, only a homolog of Opsin1 was found. In the transcriptomes of *Bathytена chuni* and *Aulacoctena acuminata*, which inhabit depths of 1,000 meters, homologs for Opsins 3 were only found. The identities of the aligned fragments of Opsin 1, 2 and 3 from Cydippida with the similar sequence of *Mnemiopsis leidyi* and *Pleurobrachia bachei*, according to BlastP, varied from 21% to 99%, with coverage ranging from 47 to 99%.

Based on the dataset from [5], expanded by Beroida and Cydippida sequences, we have reconstructed a phylogenetic tree of animal opsins using the maximum likelihood method. Two monophyletic groups of ctenophore opsins, or Ctenopsins, were identified. One of the monophyletic groups includes two sister clades: Ctenopsin1 and Ctenopsin2. These appear to have diverged after the duplication of an opsin gene shared by the common ancestor of Lobata, Cydippida, and Beroida. There is no evidence of further expansion of the opsin gene family during the evolution of ctenophores nowadays. According to our phylogenetic analysis, the Ctenopsins1-2 group may be a sister to all other metazoan opsins, except for the so-called AnthozoanII opsins, whose position on the phylogenetic tree of animal opsins needs clarification. Ctenopsin3 forms a monophyletic group that may be a basal clade outside the main animal groups.

Cydippida opsins conform to the standard 7-transmembrane topology of GPCRs. The analysis of their structure revealed specific features that had been identified in previous studies of opsins in *Beroe* and *Mnemiopsis*. Particularly, all Ctenopsin2 have a large insertion between the transmembrane alpha helices TM5 and TM6. It results in two extracytoplasmic helices, absent in other animal opsins. This region is crucial for the interaction between the opsin and the G-protein, and extra cytoplasmic structures may therefore influence the specificity of photoreceptor function. Ctenopsin3 homologues have a unique insertion of 13 amino acid residues just behind Lys(K)296, through which retinal binds to apoprotein in all animal opsins. It can cause substantial changes to the 7-TM structure and disrupt the overall shape of the chromophore pocket. This raises questions about the photoreceptor functionality of Ctenopsin3.

The amino acid sequences of three types of ctenophore opsins were compared to those of other animal opsins to assess the possibility of their involvement in photoreception.

In Ctenopsin 1 and Ctenopsin 2, we identified all the key conserved residues and motifs essential for retinal binding and the stabilization of conformational changes in the apoprotein. Unique conserved motifs were found in regions mediating opsin binding to the G-protein. In contrast, the Ctenopsin3 sequences lack conserved residues responsible for light absorption in other animal opsins. At the same time, there are some conserved motifs associated with G-protein binding that are characteristic of other animal opsins and absent in Ctenopsins 1 and 2.

Conclusion: A phylogenetic analysis revealed that there are three types of opsins shared among different species of ctenophores. Apparently, only two of them are capable of participating in photoreception, since they contain all the necessary molecular components for binding to retinal and the ability to maintain conformational changes under different light conditions. These opsins form a monophyletic group that diverged after the duplication of an opsin gene shared by the ancestors of Lobata, Cydippida, and Beroida. There is no evidence of further expansion of the opsin gene family during ctenophore evolution.

Funding: The study is supported by IBSS GA (No. 124022400148-4).

Список литературы/References

1. Hofmann K.P., Lamb T.D. Rhodopsin, light-sensor of vision. *Prog Retin Eye Res.* 2023;93:101116. doi 10.1016/j.preteyeres.2022.101116
2. Fleming J.F. et al. A novel approach to investigate the effect of tree reconstruction artifacts in single-gene analysis clarifies opsin evolution in nonbilaterian metazoans. *Genome Biol Evol.* 2020;12(2):3906-3916. doi 10.1093/gbe/evaa015
3. Schnitzler C.E. et al. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore photocytes. *BMC Biol.* 2012;10:107. doi 10.1186/1741-7007-10-107
4. Baiandina I., Kuleshova O., Krivenko O. Light perception in Beroidae ctenophores: evidence from laboratory experiments and genomics data. In: *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022)*. Novosibirsk, 2022;29-30. doi 10.18699/SBB-2022-005
5. Shettigar N., Chakravarthy A., Umashankar S., Lakshmanan V., Palakodeti D., Gulyani A. Discovery of a body-wide photosensory array that matures in an adult-like animal and mediates eye-brain-independent movement and arousal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021;118(20):e2021426118. doi 10.1073/pnas.2021426118