

Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН  
г. Севастополь



# СВЕТОВОСПРИЯТИЕ ГРЕБНЕВИКОВ В КОНТЕКСТЕ ОБЩЕЙ ЭВОЛЮЦИИ ЗРЕНИЯ У ЖИВОТНЫХ

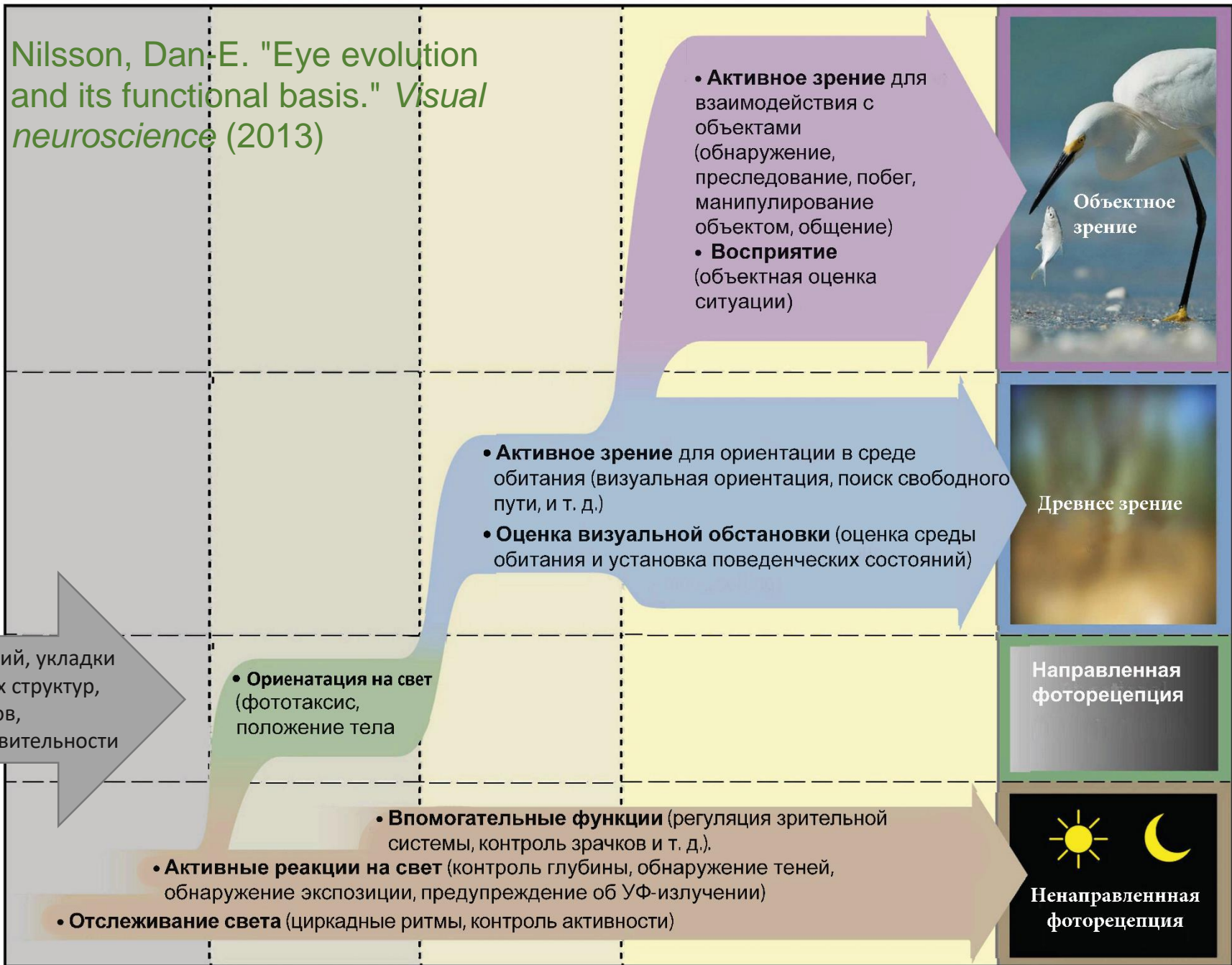
Кривенко О. В., Баяндина Ю. С., Кулешова О. Н.

Лаборатория биоразнообразия и функциональной  
геномики Мирового океана

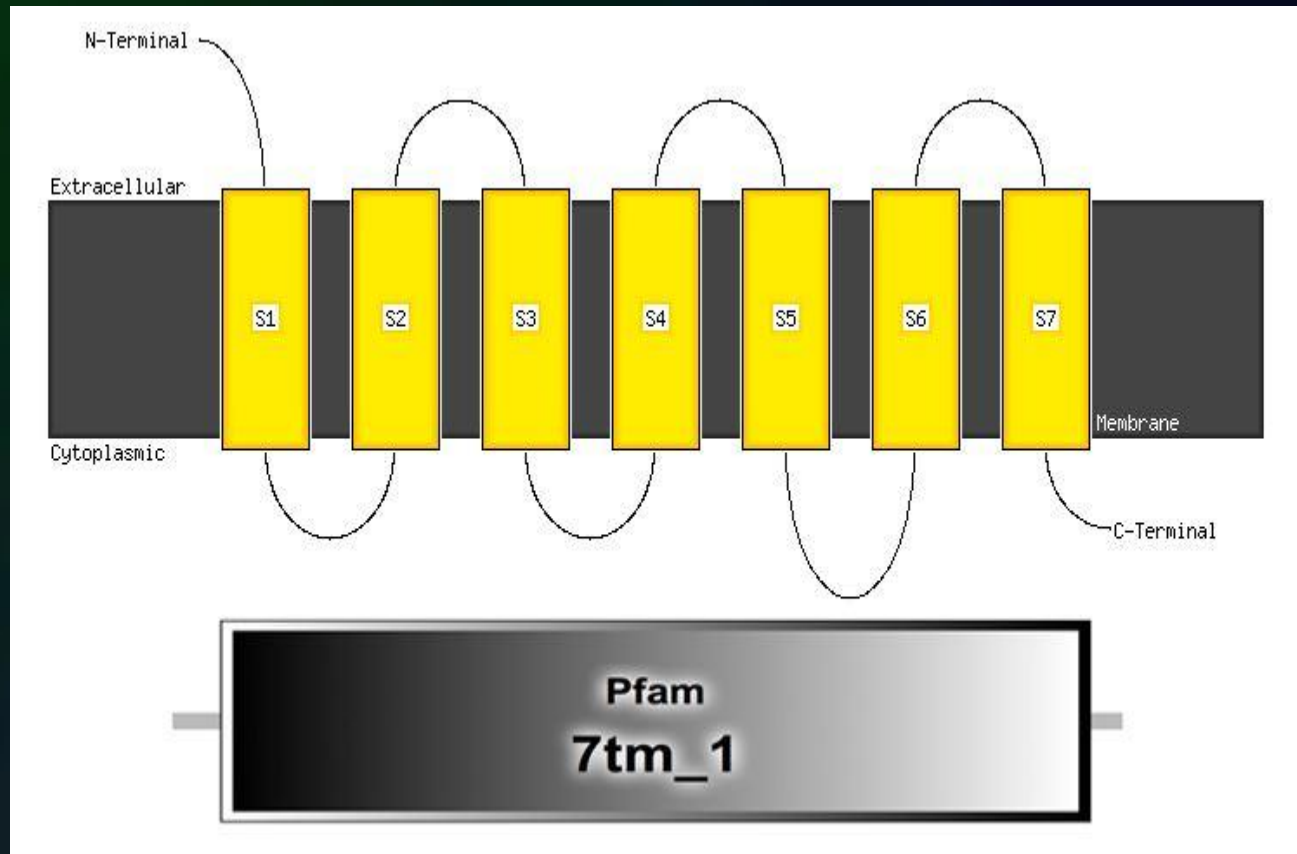
Грант Правительства РФ № 14.W03.31.0015 (2017-2019 гг)  
«Реконструкция генеалогии клеточных систем на основе анализа биоразнообразия Мирового Океана»  
Ведущий ученый – Мороз Л. Л. (Университет Флориды, США)

Восприятие света  
лежит в основе  
формирования  
самых  
разнообразных  
поведенческих  
реакций  
животных.

Nilsson, Dan-E. "Eye evolution  
and its functional basis." *Visual  
neuroscience* (2013)

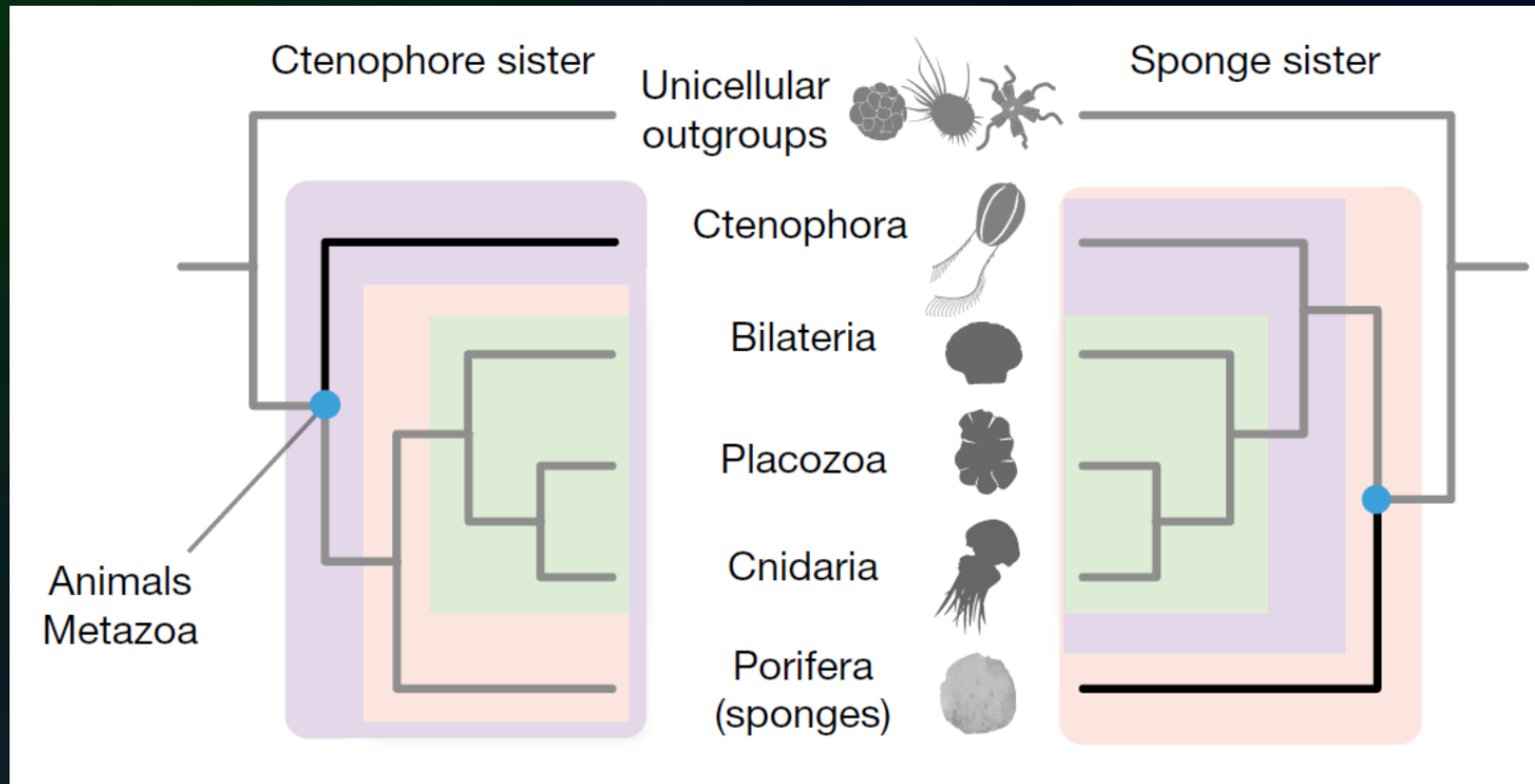


# Структура опсинов



- Пигменты на основе опсина опосредуют восприятие света и реакцию на световые раздражители у большинства многоклеточных животных.
- Опсины содержат семь трансмембранных альфа-спиральных доменов, соединенных тремя внеклеточными и тремя цитоплазматическими петлями. Многие остатки аминокислот являются эволюционно консервативными между разными группами опсинов.
- Из базальных Metazoa, помимо Cnidaria функциональные опсины обнаружены только у гребневиков.

# Положение гребневиков на филогенетическом дереве.



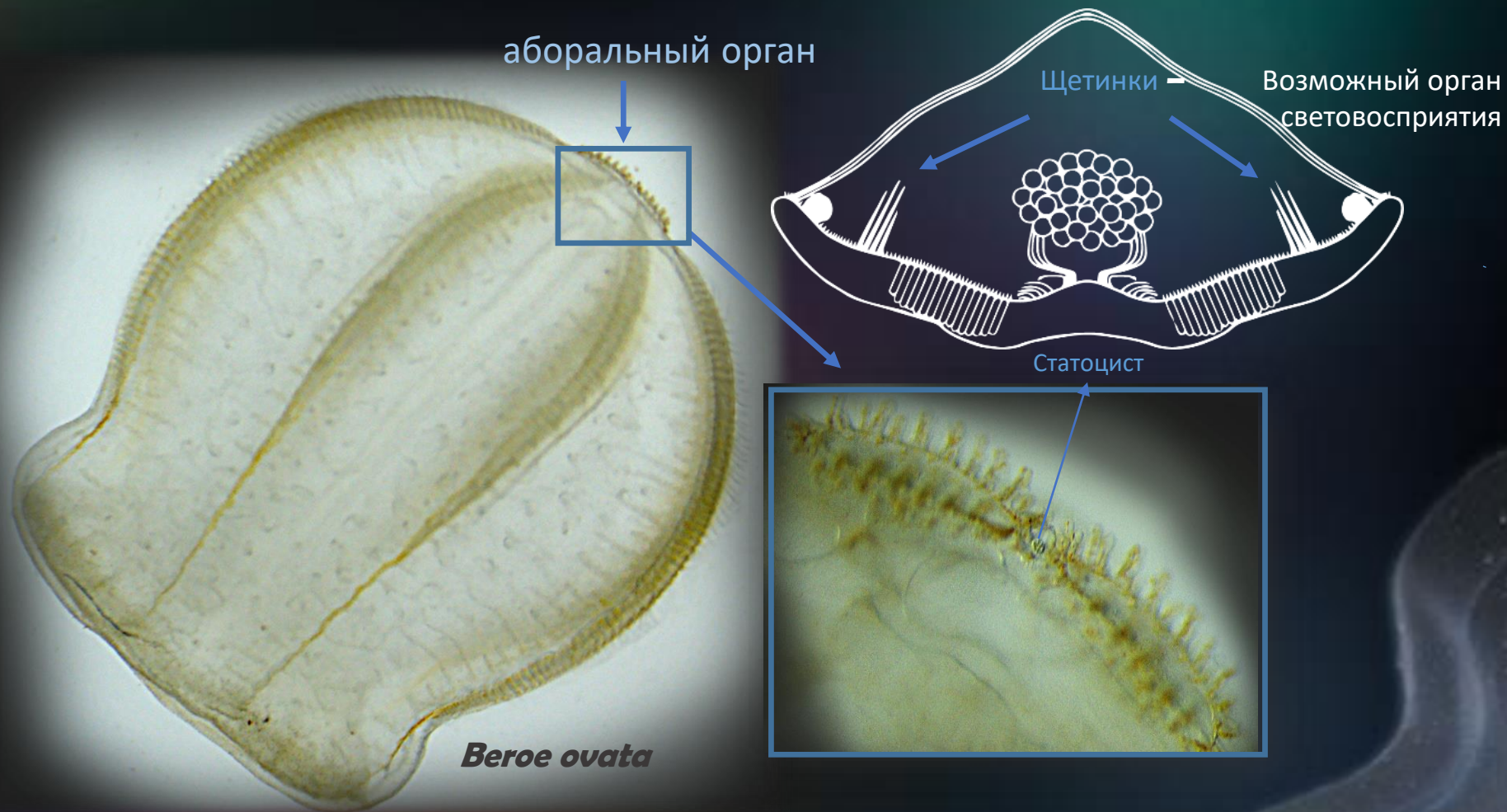
Schultz, D.T., Haddock, S.H.D., Bredeson, J.V. et al. Ancient gene linkages support ctenophores as sister to other animals. *Nature* 618, 110–117 (2023)

- В эволюции Cnidaria, выявлено как минимум 8 событий независимого возникновения глаз.
- Общий предок Cnidaria должен был обладать механизмами световосприятия направленной фоторецепции.
- Переход к направленной фоторецепции – первый шаг к появлению истинного зрения.

**Когда впервые появилась направленная фоторецепция?!**

# Строение абсорбального органа гребневиков

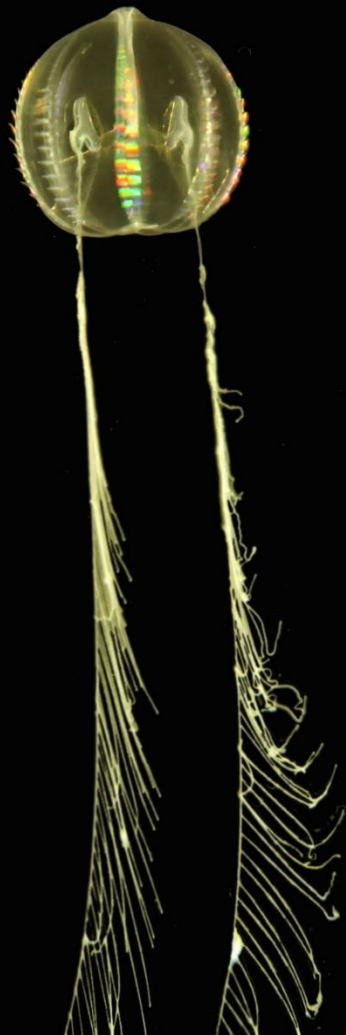
Гребневики являются древнейшей линией многоклеточных животных, в эволюции которых впервые могли быть реализованы общие для **Metazoa** предковые механизмы световосприятия.



*Beroe ovata*

# Черноморские гребневики

*Pleurobrachia pileus*



*Mnemiopsis leidyi*



*Beroe ovata*



Фото: Баяндина Ю. С.

# Задачи:

- Проведение экспериментов по определению наличия реакций различных видов гребневиков на световое излучение.
- Идентификация генов, ответственных за синтез опсинов.
- На основе анализа структуры белковых последовательностей опсинов, определение возможности их участия в процессах фоторецепции.
- Разработка праймеров к последовательностям опсинов (на примере *Beroe ovata*) и проверка их экспрессии в теле взрослых особей.
- Определение положения опсинов гребневиков на общем филогенетическом древе **Metazoa**.

# Компьютерные методы определения характеристик движения гребневиков

Видеозапись и анализ

Davinci Resolve  
видеоредактор

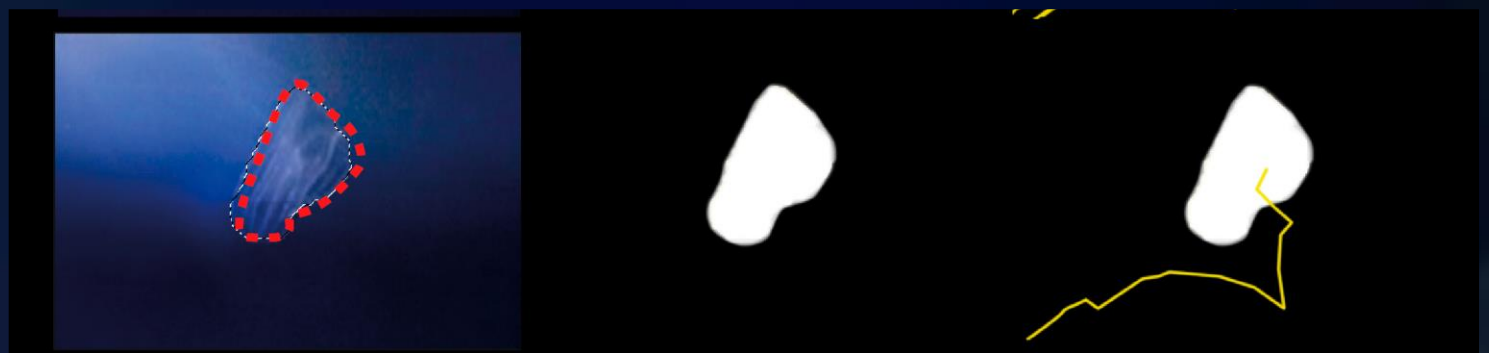
ImageJ  
программа анализа  
образов  
(wrMTrck\_Batch plug-in)

CtenophoraTrack  
Программа обработки  
полученных данных

Фильтр Threshold



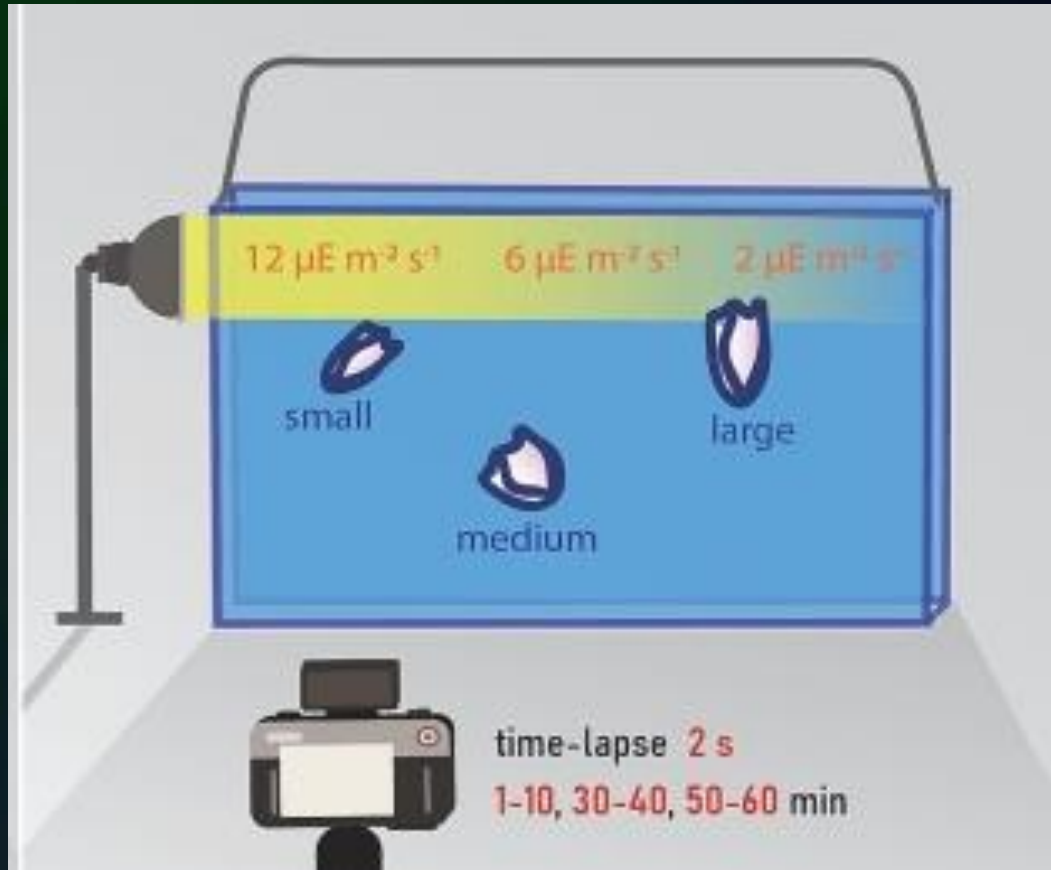
Предложенный метод «следеющей маски»



Baiandina, Iu S., and O. N. Kuleshova. "Computer methods for determining Mnemiopsis leidyi motility characteristics" Marine Biological Journal (2022)



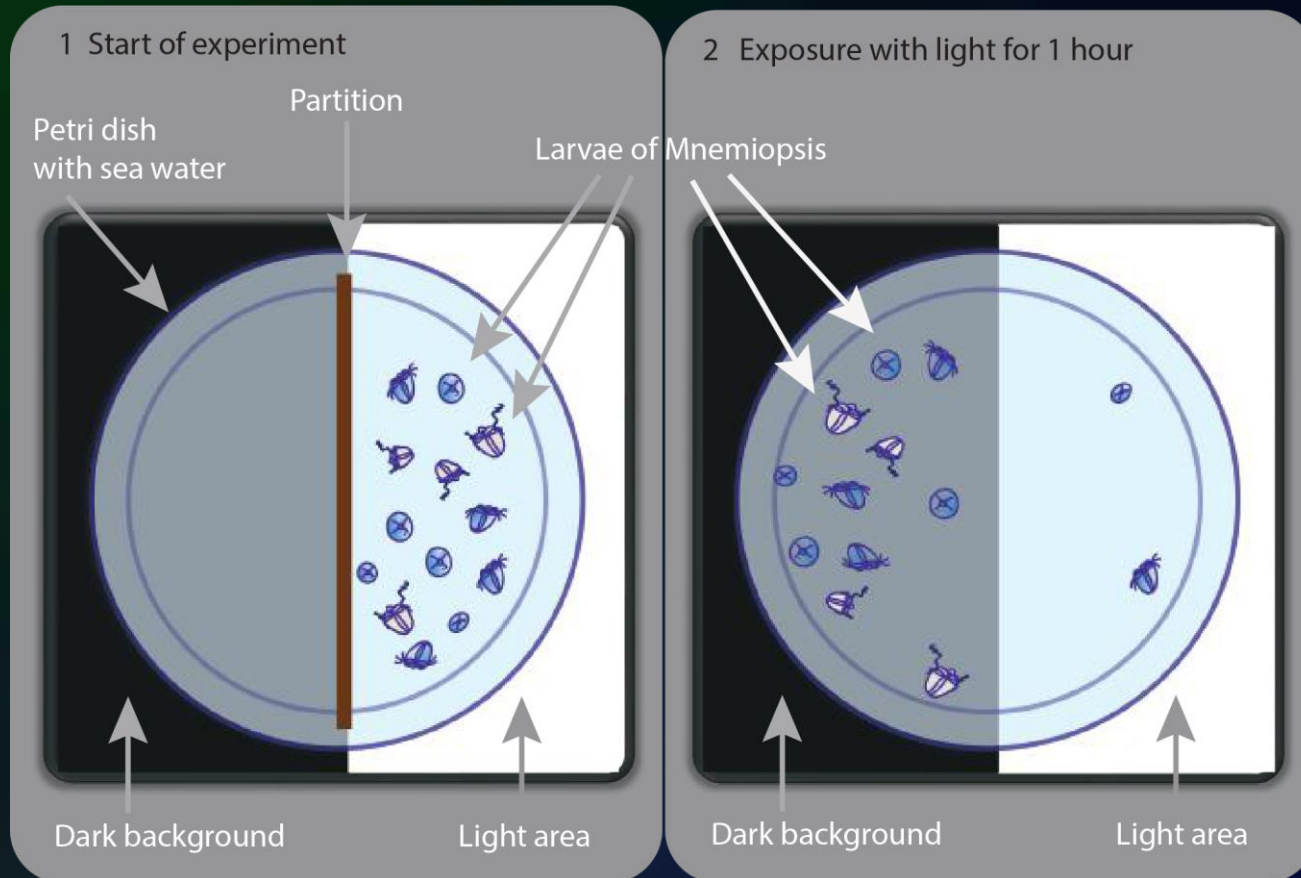
# Движение гребневиков в градиенте освещенности



- Направленное движение в градиенте освещенности у взрослых *Mnemiopsis leidyi* отсутствует.
- Адаптированные к темноте гребневики *M. leidyi* реагируют на включение света резким кратковременным увеличением скорости движения.
- Мелкие особи *M. leidyi* в среднем более активны, чем крупные.

Black Sea *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora) adult locomotion and light-induced behavior in laboratory experiments Iu S Baiandina, M P Kirin, O V Krivenko  
Journal of Sea Research, (2022)

# Реакция на свет у цидиппидных особей гребневииков



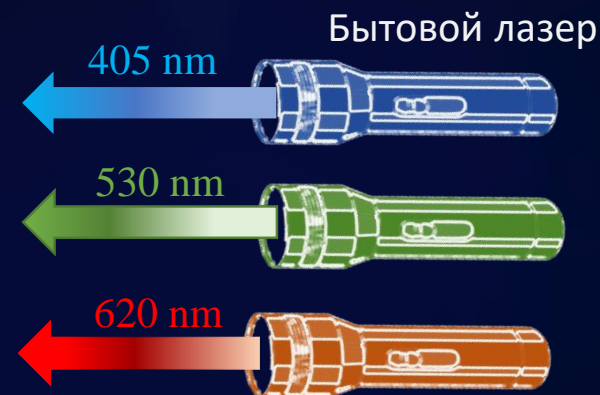
- Отрицательный фототаксис проявляется только у цидиппид *M. leidyi* на самых ранних стадиях развития (первые дни после вылупления).

Baiandina, Iu S. "Response of Mnemiopsis leidyi larvae to light intensity changes" Marine Biological Journal (2020)

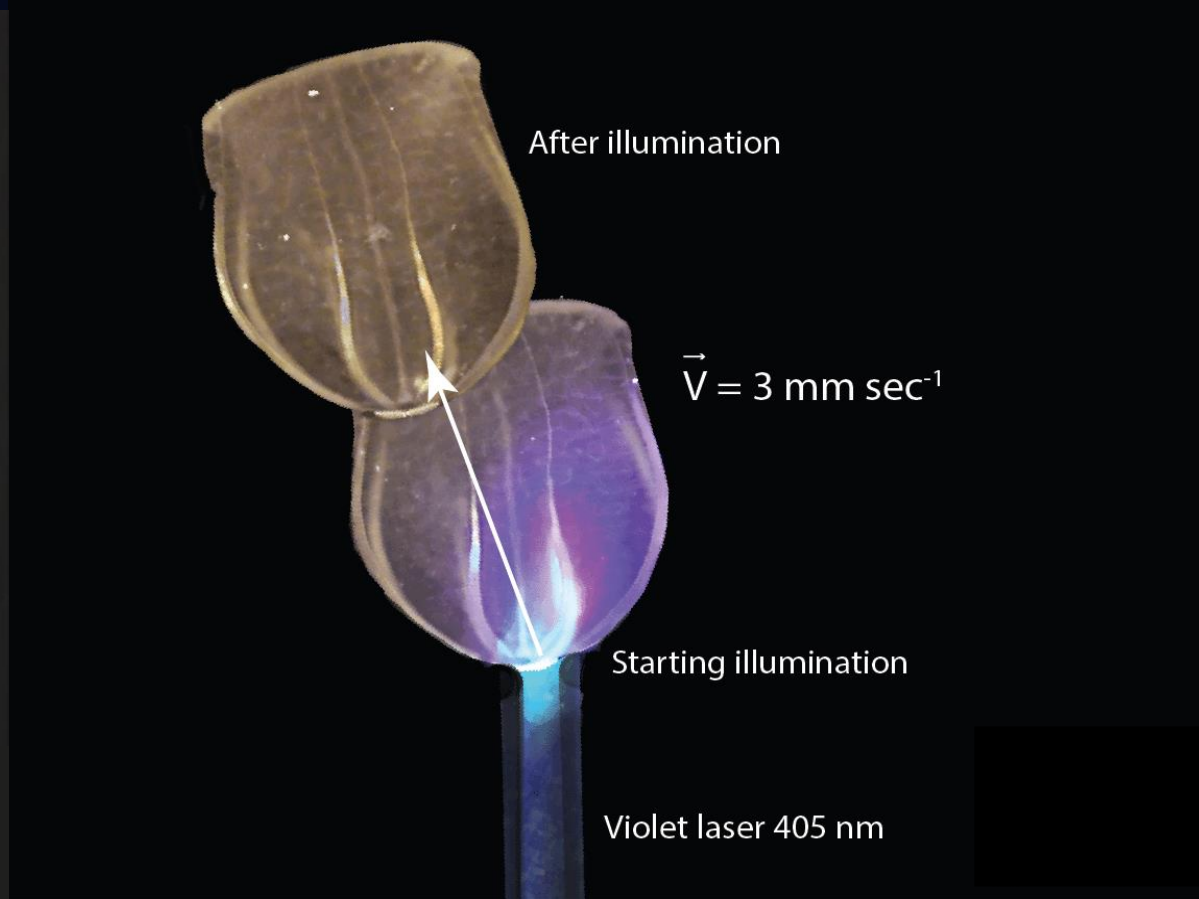
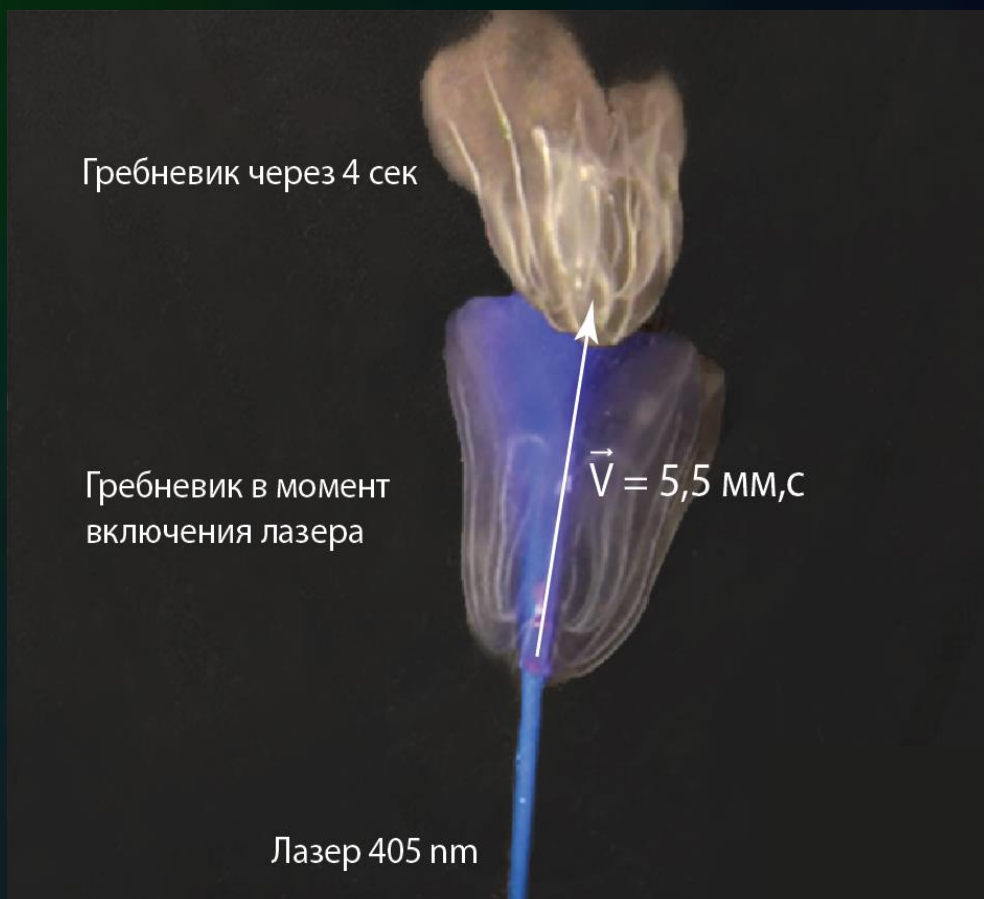
# Реакции гребневиков на высокоинтенсивное световое излучение

Интенсивность светового луча лазеров разной длины волны в толще воды,  $\mu\text{Э м}^{-2} \text{сек}^{-1}$

	3–5 см	15–20 см	35–40 см
<b>Красный (620 nm)</b>	<b>1100</b>	<b>800</b>	<b>700</b>
<b>Зеленый (532 nm)</b>	280	270	230
<b>Фиолетовый (405 nm)</b>	300	250	200



# Реакции гребневиков на облучение абсорбального органа высокоинтенсивным световым излучением



# Поиск последовательностей белков, которые могут иметь отношение к фоторецепции в NCBI

## Транскриптом

Name	BioSample	SRA
<i>Beroe forskalii</i>	SAMN07658075	SRR6074515
<i>Beroe ovata</i>	SAMN07658076	SRR6074516
<i>Beroe</i> sp. UF-2017 (Australia)	SAMN07426145	SRR5892577
<i>Beroe</i> sp. UF-2017 (Antartica)	SAMN07426140	SRR5892576

Name	Total Sequences	Sequence length	%GC
<i>Beroe ovata</i> (Black Sea)	11712387	35-151	45

## Геном

<i>Beroe forskalii</i>	GCA_011033025.1
<i>Beroe ovata</i>	GCA_900239995.1

## У *Beroidea* обнаружены три гена опсинов, как и у лобатных *M. leidy*

*Beroidea* и *Mnemiopsis leidy* опсины (BLASTP)

	Name	Query cover	Per. Ident	Acc. Len
<i>Beroe forskalii</i>	Opsin1	90%	73.39%	345
	Opsin3	42%	54.35%	404
<i>Beroe forskalii</i> (Genome)	Opsin1	92%	77.11%	345
	Opsin3	88%	52.86%	404
<i>Beroe ovata</i> (BlackSea)	Opsin1	86%	78.59%	345
	Opsin2	98%	57.30%	399
	Opsin3	86%	49.60%	404
<i>Beroe ovata</i> (Genome)	Opsin1	89%	78.59%	345
	Opsin2	97%	60.15%	399
	Opsin3	37%	43.48%	404
<i>Beroe ovata</i>	Opsin3	99%	52.80%	404
Beroe sp. Antartica ( <i>Beroe abyssicola</i> )	Opsin1	100%	76.16%	345
	Opsin3	96%	57.44%	404
Beroe sp. Australia ( <i>Beroe forskalii</i> )	Opsin2	43%	70.97%	416
	Opsin3	83%	54.07%	404

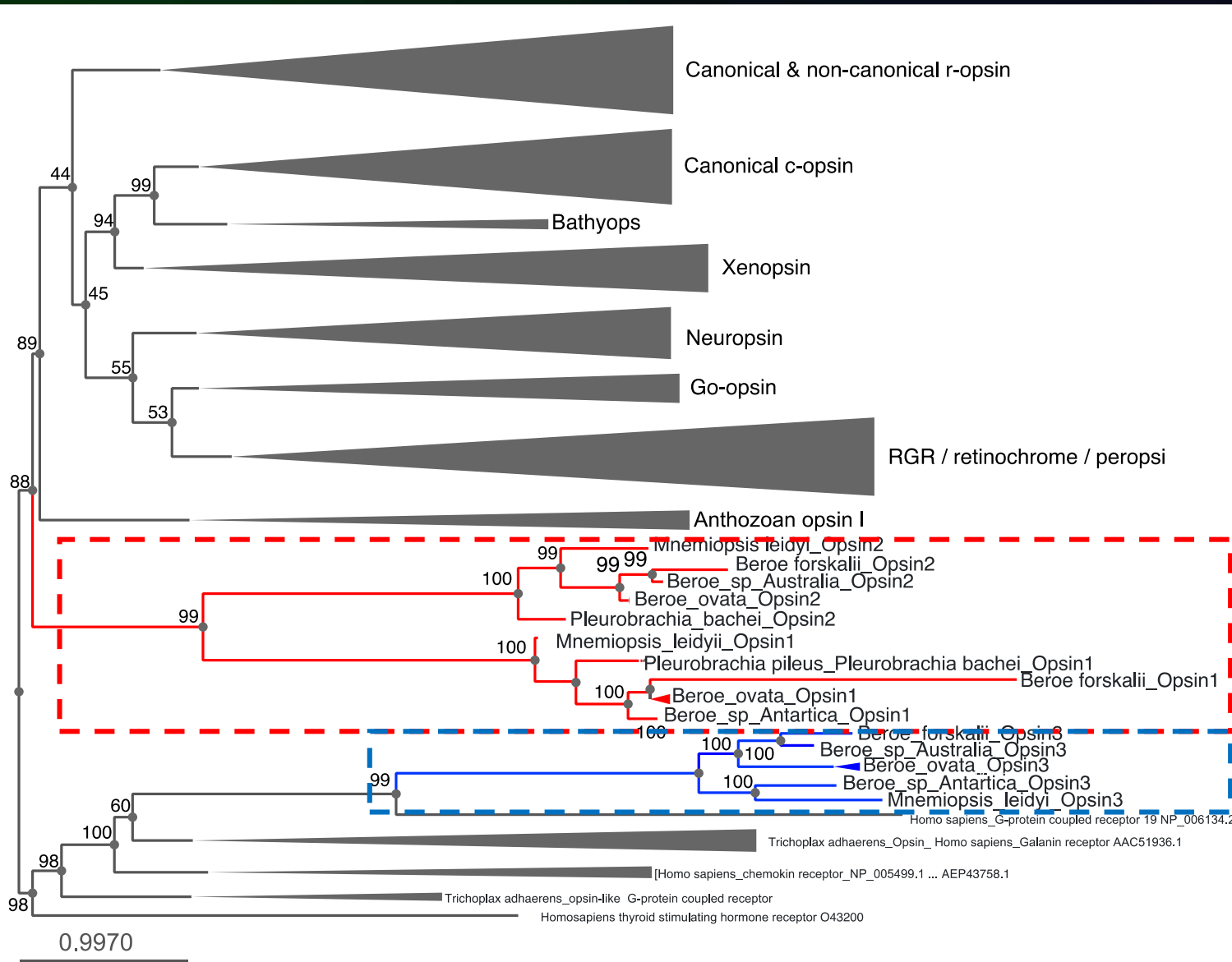
## Разработаны универсальные праймеры для каждого гена опсина *Beroe*

BerOp1 F; GCCGCTCATAGACCAAAGAA  
 BerOp1 R; GGGTGACCAACAGAAGAAGAA  
 BerOp2 F; AGAGGGAGAGTTGCCTAGTT  
 BerOp2 R; CTTGAGTTTGGACAGGGTCTT  
 BerOp3 F; GCACTCTACTACGGCAGATTT  
 BerOp3 R; CCCGAGGATATGGCGATTATG

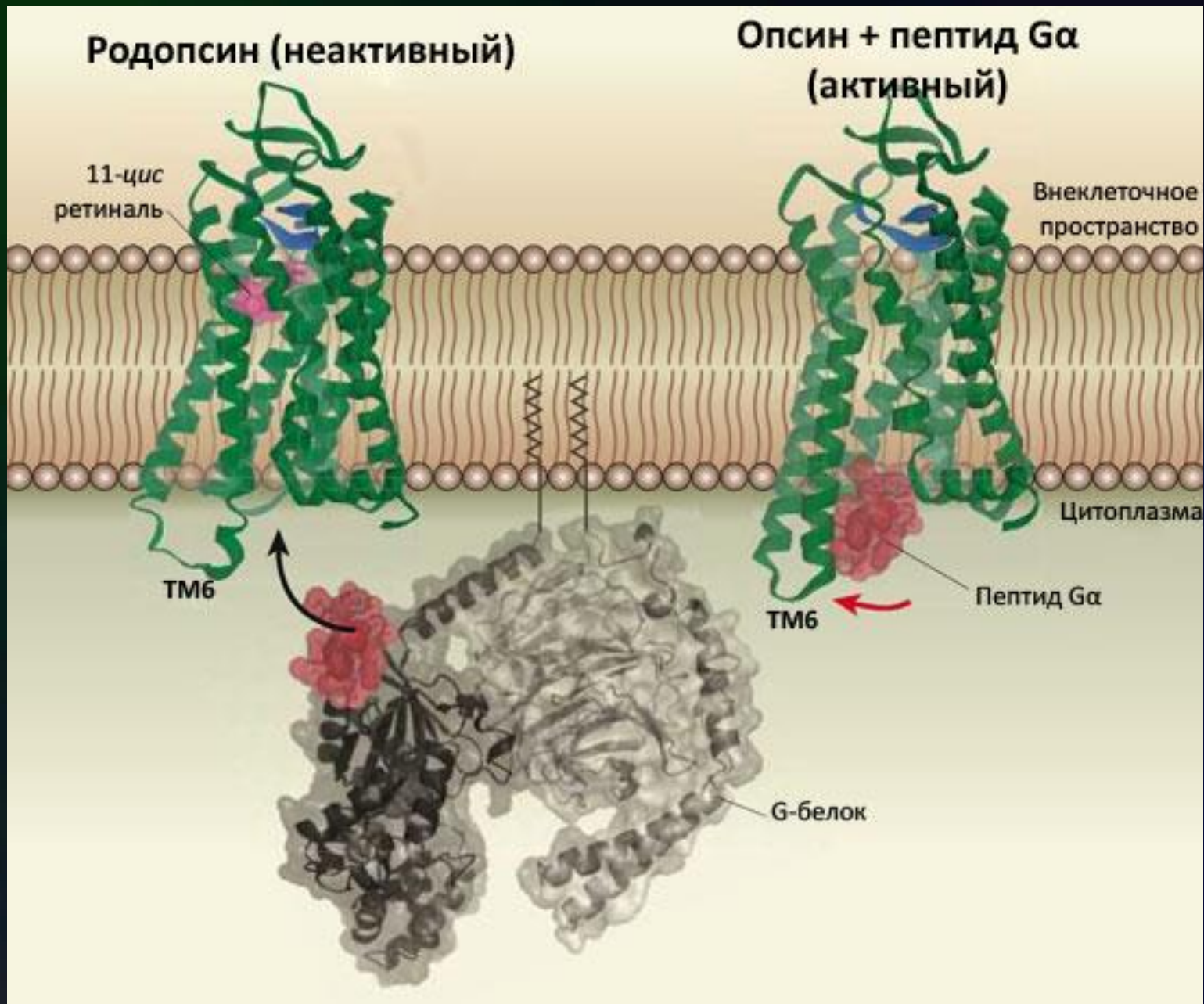
Подтверждена экспрессия всех трех генов в теле взрослых особей черноморских *Beroe ovata*



# Филогенетическое дерево опсинов Metazoa



- Каждый тип ктенопсинов представлен отдельным кластером на филогенетическом дереве.
- Эволюция каждого типа опсина шла независимо в различных филогенетических линиях гребневиков.
- Наиболее древним типом является Stenopsin3, функции которого в организме напрямую не связаны с фоторецепцией.
- Stenopsin 1 и 2 могли разойтись в результате дупликации гена у общего предка гребневиков, но дальнейшего расширения семейства опсинов в эволюции Stenophora не наблюдалось.



Ключевым элементом восприятия света являются опсины – G-белок связывающие трансмембранные рецепторы, в которых ретиналь выступает в качестве хромофора, поглощающего квант света.



# Ключевые аминокислоты и консервативные мотивы опсинов *Stenophora*

Консервативные мотивы

	BerOp1	BerOp2	BerOp3	MleOp1	MleOp2	MleOp3	PIOp1	PleOp2
<b>Соединение с ретиналем - поглощение фотона света</b>								
Основание Шиффа <b>K</b> <sup>7.43</sup> Lys296 TMVII (294-296)	FAK	LAK	(D/FAK)/NVR	FAK	LAK	FAK	FAK	LAK
Ротамерный «переключатель» ионного замка <b>W</b> <sup>6.48</sup> Trp 265 TMVI	W	W	H	W	W	H	W	W
Противоионы <b>E</b> <sup>3.28</sup> , <b>E</b> <sup>4.??</sup> (Glu113, Glu181)	E, E	E, E	V/L, E/D/K/Q	E, E	E, E	V, E	E, E	E, E
<b>Стабилизация состояний («ионный замок»)</b>								
Ионный замок <b>E</b> <sup>3.49</sup> <b>R</b> <sup>3.50</sup> <b>Y</b> <sup>3.51</sup> TMIII (Glu134–Arg135–Tyr136)	EQY	ERY	RRA	EQY	ERY	RRA	EQY	ERY
<b>Y</b> <sup>5.58</sup> (Tyr223)	Y	Y	S	Y	Y	S	Y	Y
<b>E</b> <sup>6.30</sup> (Glu247)	E	E	E	E	E	E	E	E
<b>K</b> <sup>5.66</sup> (Lys231)	Q	K	H/Q	Q	K	S	Q	K
<b>LxxxD</b> <sup>2.50</sup>	LxxxN	LxxxN	LxxxD	LxxxN	LxxxN	LxxxD	LxxxN	LxxxN
<b>Взаимодействие с G-белком – запуск каскада фототрансдукции</b>								
<b>N</b> <sup>7.49</sup> <b>P</b> <sup>7.50</sup> <b>xxY</b> <sup>7.53</sup> TMVII (Asn301-Pro302 xx Tyr305)	WV <sub>xx</sub> Y	SP <sub>xx</sub> Y	NP <sub>xx</sub> Y	WI <sub>xx</sub> Y	SP <sub>xx</sub> Y	NP <sub>xx</sub> Y	WI <sub>xx</sub> Y	SP <sub>II</sub> Y
Трипептид (G-protein binding) (pos 310–312)	DSR	NGE	S(N/K)(K/Q)	DKR	NGE	SKK	DVR	NGE

# Реконструкция 3D структуры опсинов

## *Beroe ovata*



a)

BerOpsin1



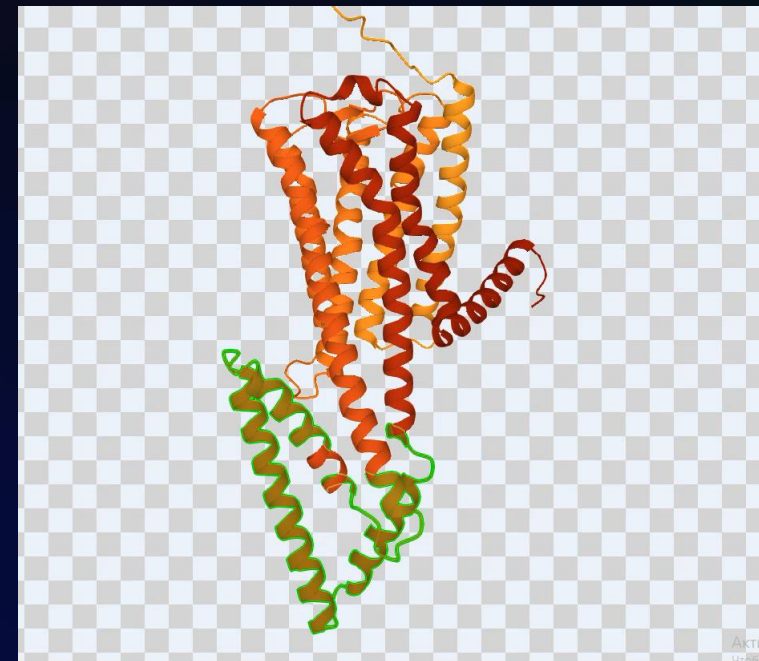
б)

BerOpsin2



В)

BerOpsin3



BerOpsin2

Beroe ovata BlackSea Opsin1  
 Beroe ovata Opsin1 Genome UOYG01244042.1  
 Beroe sp. Antartica Opsin1  
 Mnemiopsis leidyi Opsin1 K9LK83  
 Pleurobrachia bachei Opsin1 S4TMC8  
 Beroe ovata BlackSea Opsin2  
 Beroe ovata Opsin2 UOYG01162000.1  
 Mnemiopsis leidyi Opsin2 K9LLF4  
 Pleurobrachia bachei Opsin2 S4TLJ1  
 Beroe forskalii Opsin3 Genome WPMF01000209.1  
 Beroe ovata BlackSea Opsin3  
 Beroe ovata Opsin3 Genome UOYG01261565.1  
 Beroe ovata Opsin3 Genome CAMPET010000184.1  
 Beroe sp. Antartica\_Opsin3  
 Beroe sp. Australia Opsin3  
 Mnemiopsis leidyi Opsin3 K9LKS7  
 NP\_001014890.1/294-306

	10	20
FAK	-----	SSTLWV VVLY
FAK	-----	SSTLWV VVLY
FAK	-----	SSTLWV VVLY
FAK	-----	SSTLWV IIVY
FAK	-----	SSTLWV IIVY
LAK	-----	TSTLWV IIVY
LAK	-----	TSTLWV IIVY
LAK	-----	TSTLWV IIVY
LAK	-----	TSTLWV IIVY
LAK	-----	TSTLWV IIVY
MAK	-----	TSTLWV IIVY
DAKH	YVDLISHFV LSTLN	SAINP FVY
NVR	DYVK IVAHF ILE	TIN SCINP FVY
NVR	DYVK IVAHF ILE	TIN SCINP FVY
NVR	DYVK IVAHF ILE	TIN SCINP FVY
FTM	H YTKM IFHFV LSV	IN SAINP FVY
DAKH	YVSLIAHF ILSTFN	SAVNP FVY
FAKH	YINMLFHFV LLT LN	SCANP LY
FAK	-----	TSAVY NPV IY

## Выводы:

- Гребневики обладают направленной фоторецепцией.
- В геноме *Beroidea* обнаружены три гена, кодирующих белки опсинов, гомологичных опсинам *Lobate (M. leidy)* и *Cydippida (Pleurobrachia)*.
- Положение консервативных аминокислот в белковых последовательностях Veropsin 1 и 2 свидетельствуют о том, что они являются визуальными опсинами. Veropsin 3 вероятно выполняет другие функции.
- Эволюция отдельных типов опсинов шла независимо в различных филогенетических линиях гребневиков.
- Опсины 1 и 2 группы могли возникнуть в результате дупликации гена у общего предка гребневиков. В дальнейшем в эволюции гребневиков расширение семейства опсинов не происходило.



КУЛЕШОВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА  
младший научный сотрудник



КРИВЕНКО ОЛЬГА ВАЛЕРЬЕВНА  
заведующая лабораторией  
к.б.н.



БАЯНДИНА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА  
научный сотрудник, к.б.н.

# Лаборатория БиФГМО



КИРИН МАКСИМ ПЕТРОВИЧ  
инженер 1 категории



## Фоторецепция гребневиков в свете эволюции молекулярных механизмов световосприятия.

- Реконструкция эволюции опсинов у гребневиков. Расширение спектров рассматриваемых видов гребневиков.
- Реконструкция возможных каскадов фототрансдукции в фоторецепторах гребневиков.
- Идентификация структур, вне аборального органа гребневиков, ответственных за их реакцию на свет. Лабораторные эксперименты дополнить физиологией.



- 1 - Lys296 Основание Шиффа
- 2 - Trp 265 Ротамерный «переключатель» ионного замка
- 3 - Glu113, Glu181 - Противоионы
- 4 - E/D RY – ионный замок (стабилизация конформации неактивного состояния белка)
- 5 - Tyr223 – стабилизация конформации ионного замка
- 6 - Glu247 - стабилизация конформации ионного замка
- 7 - LxxxD2.50 TMII (79–83)
- 8 - NP xxY TMVII (301–305) - стабилизация активной конформации белка
- 9 – Трипептид (310–312) – взаимодействие с G-белком