

ПРИСВАИВАНИЕ ФУНКЦИЙ ОПСИНАМ ТРИХОПЛАКСОВ *TRICHOPLAX ADHAERENS* И *TRICHOPLAX SP. H2*

Хавронюк И.С.¹, Мамонтов А.А.¹, Булков В.А.¹, Воронин Д.П.¹, Кузнецов А.В.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: havronuk.1994@gmail.com

² Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию: 07.08.2021

Аннотация. В геноме трихоплекса *Trichoplax sp. H2* присутствует 10 генов, кодирующих светочувствительные белки-опсины, из них 7 аннотированы как светочувствительные опсины, от зелёного до ультрафиолетового. В свою очередь, в геноме трихоплекса *Trichoplax adhaerens* также обнаружены 10 опсино-подобных генов. Для половины из этих полипептидов восстановлены полные аминокислотные последовательности. В силу того, что опсины *Trichoplax adhaerens* (гаплотип H1) охарактеризованы неполно, представляло интерес провести дополнительное исследование опсинов трихоплекса гаплотипа H1. Для этого были осуществлены множественные выравнивания 20 аминокислотных последовательностей опсинов обоих штаммов трихоплекса и построены деревья родства опсинов. С помощью гомологического сравнения были созданы структурные модели исследуемых протеинов и осуществлён докинг хромофора ретиналя. На основании проведённых расчётов 3 полным гипотетическим белкам: EDV19328.1 длиной 465 аа, EDV22726.1 длиной 365 аа и EDV22897.1 длиной 319 аа из *Trichoplax adhaerens* была присвоена функция чувствительности к голубому свету. С меньшим правдоподобием чувствительность к голубому свету может быть присвоена 4 неполным гомологичным белкам: EDV22727.1 длиной 287 аа, EDV19349.1 – 188 аа, EDV19891.1 – 161 аа и EDV18601.1 длиной 137 аа из штамма H1. Присутствие множественных генов опсинов в геномах трихоплексов гаплотипов H1 и H2 позволяет предположить, что Placozoa способны различать оттенки голубого цвета, а это, возможно, позволяет им ориентироваться в тоще морской воды.

Ключевые слова: аннотация, биологические функции, гомология, структурное моделирование, опсины, Placozoa

ВВЕДЕНИЕ

Опсины – это функционально разнообразная группа белков массой около 35-55 кДа от светозависимых протонных насосов у микроорганизмов, как бактериородопсин (BRh), до фоторецепторов, обеспечивающих восприятие света в органах зрения у многоклеточных животных, в том числе включая меланопсин, который участвует в циркадных ритмах, но не в формировании изображения [1]. Встречается множество опсинов вне областей скопления зрительных фоторецепторов в сетчатке глаза, о которых известно очень мало. С трудом осознаётся, что многие новшества, такие как приписываемая хордовым фоторецепция, были сформированы очень давно, ещё у общего предка хоанофлагеллят, пластинчатых, губок, гребневиков и стрекательных [2-5]. В частности, опсины обнаружены в геноме трихоплексов [6,7], которые являются простейшими многоклеточными животными и одновременно удобным базовым лабораторным объектом для изучения простых поведенческих реакций [8].

Белки-опсины подразделяют на два типа – первый и второй [9,10], т.е. опсины бактериального и животного происхождения, последние из которых делятся на два класса: «Rod» и «Cone» опсины. Опсины «R-типа» находятся в рабдомерных фоторецепторах, как глаза членистоногих и головоногих моллюсков. Опсины «R-типа» обычно бистабильны, сохраняя хромофор как в естественном (тёмном), так и в фотоактивированном (светлом) состоянии. Напротив, опсины «C-типа» находятся в цилиарных фоторецепторах, например, палочках и колбочках позвоночных, которые реагируют на свет гиперполяризацией. Опсины «C-типа» обесцвечиваются после фотоактивации, теряя связанный хромофор [11]. Следует отметить, что природное разнообразие опсинов намного больше и сложнее, чем описывается этими двумя группами [12]. Примечательно, что опсины способны участвовать не только в светорецепции, но иногда являются, например, сенсорами вкуса [13].

У человека имеется следующий набор зрительных белков: родопсин (Rh1, OPN2, RHO), который экспрессируется в палочках и участвует в ночном зрении, а также четыре типа фотопсинов, которые экспрессируются в колбочках и участвуют в цветовом зрении. К ним принадлежат опсины чувствительные к красному свету (LWS – Long Wavelength Sensitive), опсины функционирующие в зелёной части спектра (MWS – Middle Wavelength Sensitive), опсины работающие в синем диапазоне (SWS2 – Short Wavelength Sensitive 2), опсины работающие в фиолетовой и ультрафиолетовой части спектра (SWS1) [1]. Животные имеют другие наборы фоторецепторных белков. Их спектры поглощения отличаются от человеческих белков-опсинов. Поэтому восприятие света и изображений у человека и животных должно отличаться. Так, некоторые насекомые могут видеть в ультрафиолетовом диапазоне [14], а животные с одним типом опсинов, вероятно, видят окружающий мир монохромным.

Несмотря на огромное разнообразие белков-опсинов, встроенных в мембрану, все они состоят из семи трансмембранных α -спиралей, которые обычно связывают в качестве хромофора ретиналь – альдегидную форму витамина А. Взаимодействие происходит через конденсацию альдегидной группы ретиналя с ϵ -аминогруппой остатка лизина в седьмой α -спирали с образованием основания Шиффа [15]. Опсин, ковалентно связавший хромофор, приобретает светочувствительность. Поглощение фотона влечёт изменение конформации хромофора [16,17]. Фотоизомеризация вызывает конформационные изменения в опсине и активирует G-протеины, что приводит к фототрансдукции [18,19].

Таким образом, опсины имеют древнюю эволюционную историю и играют ключевую роль в зрении, выполняя функцию сенсоров фотонов и преобразуя свет в электрохимический сигнал для передачи зрительной информации между клетками [10]. Фундаментальное значение опсинов и фоторецепции, помогающих животным обнаруживать и использовать свет для разных биологических функций, привлекает пристальное внимание молекулярных биологов, физиков и инженеров, которые надеются применить знания о молекулярных биологических процессах в искусственных конструкциях, как например, биосенсоры, опторегуляторы, оптический компьютер, устройства оптической памяти и голографии [20-23].

Целью настоящей работы было детально охарактеризовать набор белков-опсинов из трихоплекса *Trichoplax* sp. H2 (гаплотип/штамм H2) и присвоить биологические функции гомологичным протеинам в трихоплексе *Trichoplax adhaerens* (гаплотип/штамм H1). Для этого аннотированные аминокислотные последовательности опсинов из *Trichoplax* sp. H2 сравнивали с опсинами из *Trichoplax adhaerens* и строили направляющие деревья [24,25], потом методом гомологического выравнивания создавали пространственные структуры белков-опсинов [26] и путём стыковки/докинга определяли положение молекулы ретиналя в канале опсина [27], что в сумме позволяет теоретически предсказать функцию белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходные аминокислотные последовательности опсинов трихоплексов *Trichoplax* sp. H2 и *Trichoplax adhaerens* были найдены в базе данных NCBI – *National Center for Biotechnology Information* [6,7].

Манипулирование последовательностями и парные выравнивания выполняли с помощью пакета программ SMS – *Sequence Manipulation Suite* [28].

Множественные выравнивания и построение деревьев гомологий аминокислотных последовательностей опсинов осуществляли на EMBL-EBI-сервере – *European Bioinformatics Institute*, в частности, использовали программу Clustal Omega (1.2.4) [29].

Построение пространственных моделей опсинов проводили на Phyre2-сервере методом сравнения гомологичных последовательностей с известными пространственными структурами белков. Оценивали достоверность и степень покрытия исследуемых аминокислотных последовательностей [26].

Стыковка лиганда с белками. Полученные 3D-модели опсинов и пространственные координаты ретиналя со всеми атомами водорода в формате mol2 загружали на SwissDock-сервер и исследовали стыковку. Для этого просматривали все возвращённые конформации связанного с белком лиганда и оценивали величину ΔG (ккал/моль), определяемую как разность свободной энергии Гиббса конечного состояния (в составе комплекса) и начального состояния (в свободном виде) [27].

Визуализацию молекулярных структур выполняли с использованием программы RasMol [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В геноме трихоплекса *Trichoplax* sp. H2 (гаплотип H2) присутствует десять генов, кодирующих опсины, из них семь аннотированы как светочувствительные опсины от зелёного до ультрафиолетового. В геноме трихоплекса *Trichoplax adhaerens* (гаплотип H1) также обнаружено десять опсино-подобных генов, из них для половины белков восстановлены полные аминокислотные последовательности. Так как опсины трихоплекса *Trichoplax adhaerens* охарактеризованы лишь частично, имело смысл провести углублённую аннотацию опсинов данного штамма.

Для этого были осуществлены множественные выравнивания аминокислотных последовательностей двадцати предполагаемых опсинов обоих штаммов трихоплекса и построены направляющие деревья опсинов на основании которых трём полным белкам: EDV19328.1 (TRIADDRAFT_62230) длиной 465 аминокислотных остатка (aa), EDV22726.1 (TRIADDRAFT_58590) длиной 365 aa и EDV22897.1 (TRIADDRAFT_28157) длиной 319 aa из *Trichoplax adhaerens* была присвоена функция чувствительности к голубому свету. С меньшей долей уверенности чувствительность к голубому свету может быть присвоена ещё четырём неполным белкам: EDV22727.1 (TRIADDRAFT_951) длиной 287 aa, EDV19349.1 (TRIADDRAFT_5463) – 188 aa, EDV19891.1 (TRIADDRAFT_6397) – 161 aa и EDV18601.1 (TRIADDRAFT_9679) – 137 aa из штамма H1 (Рис. 1).

Кроме того, было обнаружено высокое сходство между родопсином 6 с идентификатором RDD35784.1 длиной 272 aa и древним опсином позвоночных RDD44611.1 – 352 aa (оценка выравнивания: 406), между чувствительным к голубому свету опсином RDD39212.1 – 265 aa и УФ-опсином RDD39214.1 – 354 aa (оценка выравнивания: 465), а также между чувствительным к фиолетовому свету опсином RDD38879.1 – 355 aa и

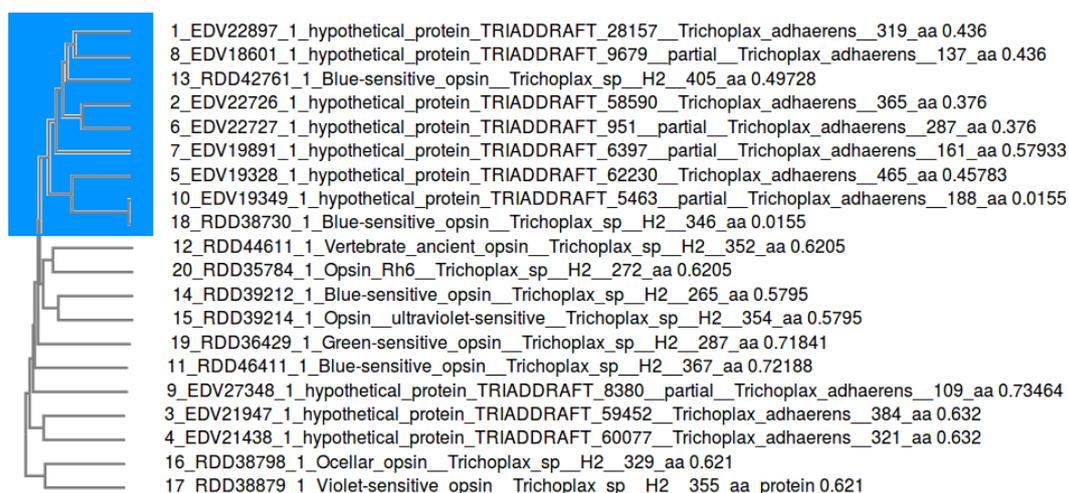


Рисунок 1. Направляющее дерево опсинов трихоплаксов *Trichoplax adhaerens* и *Trichoplax* sp. H2, цифры обозначают порядковый номер и идентификаторы протеинов, а также длины аминокислотных последовательностей (aa) и редакционные расстояния между концами ветвей (парные расстояния между не выровненными последовательностями), голубое окрашивание указывает на кластер опсинов предположительно чувствительных к голубому свету

зрительным опсином RDD38798.1 – 329 aa (оценка выравнивания: 494) у *Trichoplax* sp. H2. Помимо этого, близкое родство установлено между гипотетическими опсинами EDV21947.1 и EDV21438.1 из *Trichoplax adhaerens* длиной 384 aa и 321 aa, соответственно (оценка выравнивания: 449).

С целью увеличить надёжность суждений, была проведена трёхмерная реконструкция всех двадцати исследуемых протеинов. Учитывались длина полипептида, достоверность модели и доля покрытия моделью аминокислотной последовательности (табл. 1, 2). Все полученные полные 3D-модели имели схожие структуры, включающие семь антипараллельных α -спиралей, которые образуют канал, что позволяет уверенно отнести их к классу белков-опсинов (рис. 2, 3). Доля неполных структурных моделей, т.е. моделей с числом α -спиралей менее семи, составила 2 из 10 для трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 (табл. 3) и половину для трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (табл. 4).

В следующей части исследования была предпринята попытка изучить взаимодействие опсинов с низкомолекулярным хромофором ретиналем. Для этого проводили стыковку изучаемых белков и низкомолекулярного лиганда на SwissDock-сервере [27], подсчитывали число областей связывания внутри канала и на поверхности белка, а также определяли максимальное значение $-ΔG$ среди отдельных сайтов связывания внутри исследуемой области. Следует отметить, что под областью связывания мы понимаем компактный кластер из отдельных сайтов связывания низкомолекулярного лиганда, который выглядит как «облако» при суперпозиции отдельных конформаций лиганда (рис. 2б, 3б).

Таблица 1. Оценка качества 3D моделей опсинов *Trichoplax* sp. H2

Опсин	Аннотированная цветовая чувствительность	Длина, aa	Масса, кДа	Достоверность модели, %	Покрытие, %	Полнота модели
RDD36429.1	зелёный	287	32,34	100	94	да
RDD42761.1	голубой	405	46,50	100	70	да
RDD46411.1	голубой	367	41,30	100	95	да
RDD38730.1	голубой	346	39,07	100	92	да
RDD39212.1	голубой	265	30,64	100	86	нет
RDD38879.1	фиолетовый	355	40,69	100	83	да
RDD39214.1	УФ	354	40,80	100	90	да
RDD35784.1	родопсин 6	272	31,31	>90	96	нет
RDD38798.1	зрительный опсин	329	37,98	100	88	да
RDD44611.1	древний опсин позвоночных	352	41,44	100	88	да

Таблица 2. Оценка качества 3D моделей опсинов *Trichoplax adhaerens*

Опсин	Предполагаемая цветовая чувствительность	Длина, аа	Масса, кДа	Доверительность модели, %	Покрытие, %	Полнота модели
EDV19328.1	голубой	465	53,35	100	62	да
EDV21947.1	?	384	42,79	100	84	да
EDV22726.1	голубой	365	42,38	100	85	да
EDV21438.1	?	321	36,64	100	88	да
EDV22897.1	голубой	319	37,19	100	92	да
EDV22727.1	голубой	287	33,22	100	98	нет
EDV19349.1	голубой	188	21,25	100	93	нет
EDV19891.1	голубой	161	17,98	100	99	нет
EDV18601.1	голубой	137	15,42	100	99	нет
EDV27348.1	?	109	12,77	99.9	99	нет

Анализ взаимодействий ретиналя с полными моделями опсинов показал, что например, для зелёного (RDD36429.1) и одного голубого (RDD46411.1) опсинов из *Trichoplax* sp. H2 характерны как внутренние положения связывания ретиналя, так и внешние, а для одного голубого опсина (RDD38730.1), фиолетового (RDD38879.1) и УФ-опсина (RDD39214.1) только внешние положения молекулы хромофора (табл. 3), что объективно связано с качеством моделей. Наиболее интересным по результатам выравнивания с другими белками (рис. 1 и 4) следует считать полный голубой опсин RDD42761.1 длиной 405 аминокислотных остатка и массой 46,50 кДа с доверительностью модели 100% и покрытием 70% (табл. 1). В отличие от других белков-опсинов из трихоплакса *Trichoplax* sp. H2, опсин RDD42761.1 связывал ретиналь только в одной компактной области внутри канала (рис. 2), причём с достаточно высоким значением $-\Delta G$ равным 8,54 ккал/моль (табл. 3).

Для полных опсинов из *Trichoplax adhaerens* (EDV19328.1, EDV21947.1, EDV22726.1, EDV21438.1 и EDV22897.1) выявлено более размытое распределение сайтов связывания ретиналя на поверхности белка-опсина по сравнению с полными опсинами из *Trichoplax* sp. H2 (рис. 3б, табл. 4). Отмечено много изолированных сайтов связывания, не принадлежащих компактным кластерам, что указывает на возможные вращения α -спиралей в моделях, приводящие к снижению эффективности связывания лиганда в канале макромолекулы. Подтверждением тому могут служить низкие индивидуальные и усреднённые показатели $-\Delta G$ для внешнего неспецифического связывания лиганда по сравнению с внутренним специфическим: $7,56 \pm 0,44$ ккал/моль против $8,33 \pm 0,21$ ккал/моль для штамма H2 (табл. 3) и $7,68 \pm 0,28$ ккал/моль против $8,17 \pm 0,33$ ккал/моль для штамма H1 (табл. 4). Интересно также незначительное ослабление связывания хромофора в канале опсинов трихоплакса

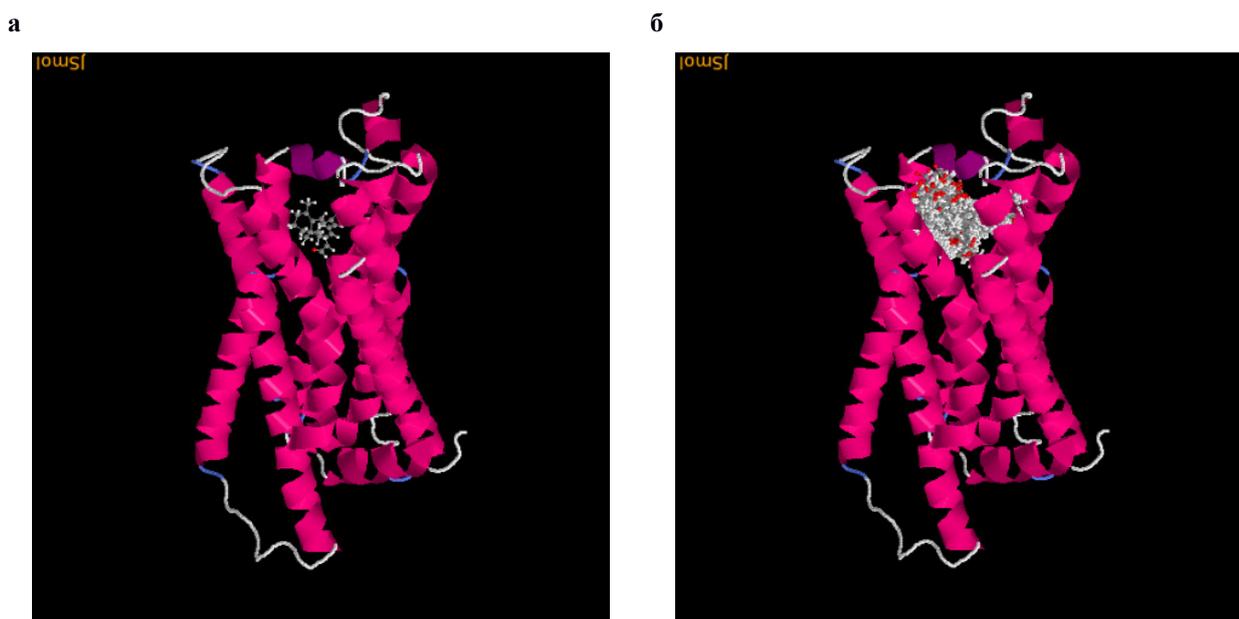


Рисунок 2. Положение ретиналя в пространственной модели голубого опсина RDD42761.1 из трихоплакса *Trichoplax* sp. H2, а) единичная молекула хромофора в предпочтительной конформации с $\Delta G = -8,54$ ккал/моль внутри канала опсина, б) суперпозиция всех возможных положений хромофора в области связывания

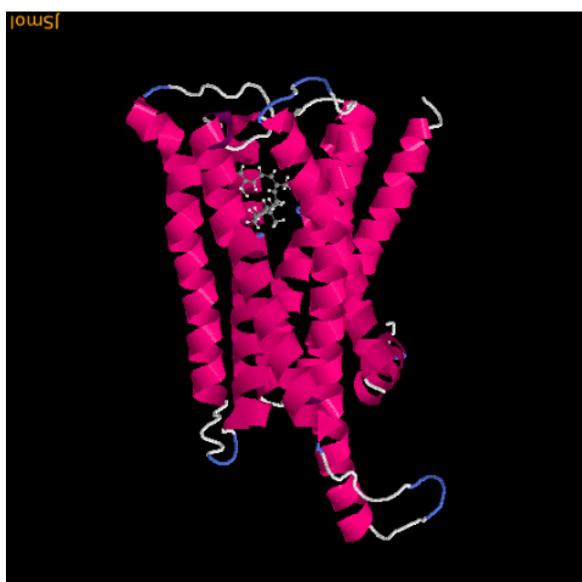
Таблица 3. Анализ взаимодействий ретиналя с моделями опсинов *Trichoplax* sp. H2

Опсин	Цвет	Модель	Связывание ретиналя			
			снаружи канала		внутри канала	
			число областей	-ΔG, ккал/моль	число областей	-ΔG, ккал/моль
RDD36429.1	зелёный	полная	6	7,41	2	8,33
RDD42761.1	голубой	полная	-	-	1	8,54
RDD46411.1	голубой	полная	4	7,51	2	8,15
RDD38730.1	голубой	полная	1	6,56	-	-
RDD39212.1	голубой	неполная	1	7,60	1	8,41
RDD38879.1	фиолетовый	полная	4	7,73	-	-
RDD39214.1	УФ	полная	3	7,52	-	-
RDD35784.1	родопсин 6	неполная	5	7,62	-	-
RDD38798.1	зрительный опсин	полная	3	8,04	1	8,03
RDD44611.1	древний опсин позвоночных	полная	1	8,04	1	8,54
Среднее значение			3,1±1,8	7,56±0,44	1,3±0,5	8,33±0,21

Trichoplax adhaerens ($8,17 \pm 0,33$ ккал/моль) по сравнению с опсинами *Trichoplax* sp. H2 ($8,33 \pm 0,21$ ккал/моль). Тем не менее, опираясь на анализ последовательностей белков-опсинов (рис. 1), изучение их структурных моделей и докинг ретиналя (рис. 3, табл. 4), можно с некоторой долей осторожности присвоить функции чувствительности к голубому свету опсином EDV19328.1, EDV22726.1 и EDV22897.1, созданные нами 3D-модели которых обладают полной структурой; а также весьма условно предположить аналогичную функцию для неполных опсинов EDV22727.1, EDV19349.1, EDV19891.1 и EDV18601.1 у *Trichoplax adhaerens* (табл. 4).

Учитывая все вышеперечисленные аргументы, имело смысл провести добавочные парные выравнивания между подходящими белками кандидатами на присвоение биологических функций. Оказалось, что достаточно высоким сходством обладают чувствительный к голубому свету опсин RDD42761.1 длиной 405 аа из *Trichoplax* sp. H2 (штамм H2) и предполагаемый белок EDV22897.1 длиной 319 аа из *Trichoplax adhaerens* (штамм H1) с величиной оценки выравнивания 515 (рис. 4). Следовательно, по аналогии с голубым опсином RDD42761.1 из *Trichoplax* sp. H2, функцию чувствительности к голубому свету можно достаточно надёжно присвоить гомологичному ему белку-опсину EDV22897.1 из *Trichoplax adhaerens*.

а



б



Рисунок 3. Положение ретиналя в пространственной модели гипотетического голубого опсина EDV22897.1 из трихоплакса *Trichoplax adhaerens*, а) единичная молекула хромофора в предпочтительной конформации с $\Delta G = -8,22$ ккал/моль внутри канала опсина, б) суперпозиция всех возможных положений хромофора внутри канала и на поверхности белка

Таблица 4. Анализ взаимодействий ретиналя с моделями опсинов *Trichoplax adhaerens*

Опсин	Цвет	Модель	Связывание ретиналя			
			снаружи канала		внутри канала	
			число областей	-ΔG, ккал/моль	число областей	-ΔG, ккал/моль
EDV19328.1	голубой	полная	4	7,69	1	7,80
EDV21947.1	?	полная	6	7,69	2	8,51
EDV22726.1	голубой	полная	3	7,36	1	8,04
EDV21438.1	?	полная	5	7,79	1	8,60
EDV22897.1	голубой	полная	2	7,45	1	8,22
EDV22727.1	голубой	неполная	4	8,24	1	7,86
EDV19349.1	голубой	неполная	4	7,59	-	-
EDV19891.1	голубой	неполная	3	7,87	-	-
EDV18601.1	голубой	неполная	2	7,80	-	-
EDV27348.1	?	неполная	3	7,29	-	-
Среднее значение			3,6±1,3	7,68±0,28	1,2±0,4	8,17±0,33

Наличие в геноме трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 генов, которые кодируют опсины чувствительные к зелёному (RDD36429.1), голубому (RDD38730.1, RDD39212.1, RDD42761.1 и RDD46411.1), фиолетовому (RDD38879.1) и УФ-свету (RDD39214.1) согласуется с недавно открытыми поведенческими реакциями трихоплакса штамм H2 на воздействие лазерами с разной длиной волны, такими как зелёный (532 нм, 1 Вт) и фиолетовый (405 нм, 5 мВт), а также на ультрафиолетовый и белый направленные источники света [31-33]. Таким образом, присутствие многообразных светочувствительных опсинов у трихоплакса позволяет ему реагировать на разные световые раздражители. В особенности, существование четырёх опсинов чувствительных к голубому свету (RDD38730.1, RDD39212.1, RDD42761.1 и RDD46411.1) связано с закономерностями проникновения солнечного света в морскую воду на глубину и, возможно, необходимо для ориентации животных по вертикали [32]. Тем не менее, полученные результаты не являются однозначными, а зависят от собственного биоритма животного [33]. Кроме того, кванты внешнего источника света могут восприниматься не только белками-опсинами, но и пока неизвестными светочувствительными системами.

RDD42761.1	---MNDSSNKALPLSELL--VIGYCI MELTTIIFNVTLFIFRYRPLRIPINYILINL	55
EDV22897.1	MADHDHAI VNN SNLPLGNAIIRSSVYCLLFITGFFGNLIFLVIFAKCPYMRIPINYFLVNL	60
	: *:: ***.: : **:: * : * : * . ** : * : *****:***	
RDD42761.1	TINNLLYGFLILPFKIVSVLTQTWPFHPRICLLSGFINVVGFLVAVFSILAISVRYLAI	115
EDV22897.1	AIVDITATIFRELALIIGYFNCQWLYNYHTCNLFGFMRNICCAVTIFTLAISVCRYLVI	120
	:* : : : : * . : . * : : * * * . : : * : : : ***** * . *	
RDD42761.1	VRSQKRAISKRRVLF SIGFIWFGSAISAMLPVGVGSVYVYIPSAYMCPDPYNYLFI TLF	175
EDV22897.1	CQHKGRRMTRHAVL CIIAFVWFYTI L VCLCP I F G W N R Y I Y H Q N Q Y V C S I D W S Y Q P S Y I R Y	180
	: : * : : : ** * . * : : : : : * : . * . * : * . * : * * : : :	
RDD42761.1	FSTTSFILPVIFSGVLNWRLLVTVNKHSKRMQVT-----HQSCSFVRKDKGLTKAIL	227
EDV22897.1	IIIVDVFLPTIITIIICYTFIYIVVHRHSRIQDILRMSGSLSSAQYNRIAREKKVTKIMF	240
	: . . : ** . * : : : : : : * : : * : * : * : * . . . : : * : * : :	
RDD42761.1	SIYVGFFICFMPIGIVAYILLPLVYVPRSVIISSFMITIHSTTFPLICGLMHEKFKIC	287
EDV22897.1	AVYINFLICYLPFSIITAILIPSGIKPPAELFFVGTFMIDLNSSINPMLYPFIYRRCKEA	300
	: : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * .	
RDD42761.1	YKQCLSDLVGGKLYRRSGSLKSKSSFIRRTSTIRDFRCPDIQVHQASENHRSNYFMRSPM	347
EDV22897.1	YCEVLC-----CHRSQTSPTSNCY-----	319
	* : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * .	
RDD42761.1	SMDNITSLLSKRRHSTNIWRHKTFPVVQSPLPLDRAKKYSIPNTELELEDLTPSTVS	405
EDV22897.1	-----	319

Рисунок 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей RDD42761.1 и EDV22897.1, которые являются опсинами из трихоплаксов штаммов H2 и H1, соответственно, Clustal Omega (1.2.4)

В дополнение к предыдущим исследованиям, нами было проведено сравнение опсинов трихоплаксов с тремя опсинами гребневика *Mnemiopsis leidy*: опсином 1 (MleiOpsin1, ML13055a, AFK83788.1) длиной 345 аа и массой 38.97 кДа, опсином 2 (MleiOpsin2, ML12047a, AFK83789.1) длиной 399 аа и массой 43.96 кДа, а также опсином 3 (MleiOpsin3, ML215412a, AFK83790.1) длиной 404 аа и массой 45.97 кДа [35]. Мы обнаружили парное родство опсина 3 из *Mnemiopsis leidy* с голубым опсином RDD39212.1, УФ-опсином RDD39214.1, древним опсином позвоночных RDD44611.1 и родопсином 6 RDD35784.1 из трихоплакса *Trichoplax* sp. H2 (оценки выравнивания: 261, 342, 368 и 260, соответственно). Филогенетическое родство установлено между аннотированным нами неполным голубым опсином EDV19891.1 длиной 161 аа из трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (Таб. 4) с опсинами 1 и 2 гребневика (оценка выравнивания: 271 и 241, соответственно). Теоретическое предсказание существования у *Mnemiopsis leidy* опсинов чувствительных к голубому свету согласуется с данными по пикам поглощения клонированного опсина 2 при 500 нм или 380 нм [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая близость редакционного расстояния со значением 0,49728 (рис. 1) и высокую оценку выравнивания со значением 515 (рис. 4) между голубым опсином RDD42761.1 длиной 405 аа из *Trichoplax* sp. H2 (штамм H2) и предполагаемым белком EDV22897.1 длиной 319 аа из *Trichoplax adhaerens* (штамм H1), полноты построения структурных моделей, достоверности 100% и существенного покрытия аминокислотных последовательностей (70% и 92%, соответственно), а также высоких значений связывания $-\Delta G$ ретиналя внутри каналов (8,54 ккал/моль и 8,22 ккал/моль, соответственно), можно с достаточной степенью уверенности предположить, что гипотетический протеин EDV22897.1 выполняет функцию чувствительности к голубому свету у трихоплакса *Trichoplax adhaerens* (штамм H1). Практическая проверка данного теоретического предсказания может быть осуществлена в прямых опытах на культуре *Trichoplax adhaerens*.

Наличие большого числа генов опсинов в геномах трихоплаксов гаплотипов H1 и H2 позволяет сделать предположение, что Placozoa обладают развитой системой восприятия световых сигналов и способны различать оттенки голубого цвета, что позволяет им ориентироваться в тоще морской воды. Остаются открытыми вопросы – к какому типу принадлежат опсины трихоплакса, какова молекулярная динамика взаимодействия ретиналя с каналом опсинов, какова функция внешних полипептидных петель, полностью исключённых из настоящего исследования. Полученные данные демонстрируют изначальную сложность «простейшего» многоклеточного организма трихоплакса и являются вызовом для молекулярных биологов и специалистов по молекулярной бионике, ориентированных на конструирование функциональных наносистем будущего.

Список литературы / References:

1. Terakita A. *The opsins*. *Genome Biol.*, 2005, vol. 6, no. 3, 213 p.
2. Schierwater B., Eitel M., Jakob W., Osigus H.J., Hadrys H., Dellaporta S.L., Kolokotronis S.O., Desalle R. Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis. *PLoS Biol.*, 2009, vol. 7, no. 1, p. e20.
3. Feuda R., Hamilton S.C., McInerney J.O., Pisani D. Metazoan opsin evolution reveals a simple route to animal vision. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2012, vol. 109, no. 46, pp. 18868-72.
4. Erwin D.H. Early metazoan life: divergence, environment and ecology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2015, vol. 370, no. 1684, p. 20150036.
5. Paps J., Holland P.W.H. Reconstruction of the ancestral metazoan genome reveals an increase in genomic novelty. *Nat Commun.*, 2018, vol. 9, no. 1, p. 1730.
6. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M.L., Signorovitch A.Y., Moreno M.A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I.V., Buss L.W., Schierwater B., Dellaporta S.L., Rokhsar D.S. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*, 2008, vol. 454, no. 7207, pp. 955-960.
7. Kamm K., Osigus H.J., Stadler P.F., DeSalle R., Schierwater B. *Trichoplax* genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Sci Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, p. 11168.
8. Kuznetsov A.V., Halaimova A.V., Ufimtseva M.A., Chelebieva E.S. Blocking a chemical communication between *Trichoplax* organisms leads to their disorderly movement. *International Journal of Parallel, Emergent and Distributed Systems*, 2020, vol. 35, no. 4, pp. 473-482.
9. Fernald R.D. Casting a genetic light on the evolution of eyes. *Science*, 2006, vol. 313, no. 5795, pp. 1914-1918.
10. Oakley T.H., Plachetzki D.C. The Evolution of Opsins. *Encyclopedia of the Eye*, 2010, pp 82-88.
11. Porter M.L., Blasic J.R., Bok M.J., Cameron E.G., Pringle T., Cronin T.W., Robinson P.R. Shedding new light on opsin evolution. *Proc Biol Sci.*, 2012, vol. 279, no. 1726, pp. 3-14.
12. Leung N.Y., Montell C. Unconventional roles of opsins. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 2017, vol. 33, pp. 241-264.
13. Leung N.Y., Thakur D.P., Gurav A.S., Kim S.H., Di Pizio A., Niv M.Y., Montell C. Functions of Opsins in *Drosophila* Taste. *Curr Biol.*, 2020, vol. 30, no. 8, pp. 1367-1379.
14. Henze M.J., Dannenhauer K., Kohler M., Labhart T., Gesemann M. Opsin evolution and expression in arthropod compound eyes and ocelli: insights from the cricket *Gryllus bimaculatus*. *BMC Evol Biol.*, 2012, vol. 12, p. 163.
15. Ходонов А.А., Беликов Н.Е., Лукин А.Ю., Петровская Л.Е., Чупин В.В., Демина О.В. Исследование селективности окружения хромофор-связывающего сайта молекулы бактериородопсина с помощью аналогов

- ретиноидов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 1, с. 91-100. [Khodonov A.A., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Petrovskaya L.E., Chupin V.V., Demina O.V. Investigation of the selectivity of the environment of the chromophore-binding site of the bacteriorhodopsin molecule using retinoid analogs. *Topical issues of biological physics and chemistry*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 91-100. (In Russ.)]
16. Wanko M., Hoffmann M., Frauenheim T., Elstner M.J. Computational photochemistry of retinal proteins. *Comput Aided Mol Des.*, 2006, vol. 20, no. (7-8), pp. 511-8.
17. Rupenyan A., van Stokkum I.H., Arents J.C., van Grondelle R., Hellingwerf K., Groot M.L. Characterization of the primary photochemistry of proteorhodopsin with femtosecond spectroscopy. *Biophys J.*, 2008, vol. 94, no. 10, pp. 4020-4030.
18. Scheerer P., Park J.H., Hildebrand P.W., Kim Y.J., Krauss N., Choe H.W., Hofmann K.P., Ernst O.P. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 2008, vol. 455, no. 7212, pp. 497-502.
19. Wang T., Duan Y. Retinal release from opsin in molecular dynamics simulations. *J Mol Recognit.*, 2011, vol. 24, no. 2, pp. 350-8.
20. Li Y.T., Tian Y., Tian H., Tu T., Gou G.Y., Wang Q., Qiao Y.C., Yang Y., Ren T.L. A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices. *Sensors (Basel)*, 2018, vol. 18, no. 5, p. 1368.
21. Simon C.J., Sahel J.A., Duebel J., Herlitze S., Dalkara D. Opsins for vision restoration. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2020, vol. 527, no. 2, pp. 325-330.
22. Xu X., Mee T., Jia X. New era of optogenetics: from the central to peripheral nervous system. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 2020, vol. 55, no. 1, pp. 1-16.
23. Berglund K., Stern M.A., Gross R.E. Bioluminescence-Optogenetics. Berglund K, Stern MA, Gross RE. *Adv Exp Med Biol.*, 2021, vol. 1293, pp. 281-293.
24. Nelesen S., Liu K., Zhao D., Linder C.R., Warnow T. The effect of the guide tree on multiple sequence alignments and subsequent phylogenetic analyses. *Pac Symp Biocomput.*, 2008, pp. 25-36.
25. Sievers F., Hughes G.M., Higgins D.G. Systematic exploration of guide-tree topology effects for small protein alignments. *BMC Bioinformatics*, 2014, vol. 15, no. 1, p. 338.
26. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.*, 2015, vol. 10, no. 6, pp. 845-58.
27. Bitencourt-Ferreira G., de Azevedo W.F. Jr. Docking with SwissDock. *Methods Mol Biol.*, 2019, vol. 2053, pp. 189-202.
28. Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 2000, vol. 28, pp. 1102-1104.
29. Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 47, (W1), pp. W636-W641.
30. Sayle R., Milner-White E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci.*, 1995, vol. 20, no. 9, p. 374.
31. Капцов В.А., Дейнего В.Н., Козырицкий Д.В. Rgb-таксис trichoplax (placozoa), как новый метод гигиенических исследований. *Медицина труда и экология человека*, 2021, т. 1, с.6-22. [Kaptsov V.A., Deinogo V.N., Kozyrtsky D.V. Rgb taxis trichoplax (placozoa) as a new method of hygienic research. *Occupational medicine and human ecology*, 2021, vol. 1, pp. 6-22. (In Russ.)]
32. Мамонтов А.А., Хавронюк И.С., Рыбакова К.А., Кузнецов А.В. Поведение трихоплакса в зависимости от действия света на опсины в соответствии с глубиной обитания животного: анализ и модельные опыты. *Материалы XVI Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021»*, Севастополь, 2021, с. 217-218. [Mamontov A.A., Khavronyuk I.S., Rybakova K.A., Kuznetsov A.V. Trichoplax behavior depending on the effect of light on opsins in accordance with the depth of the animal's habitat: analysis and model experiments. *Proceedings of XVI International Scientific Conference «Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2021»*, Sevastopol, 2021, pp. 217-218. (In Russ.)]
33. Хавронюк И.С., Воронин Д.П., Кузнецов А.В. Поведенческий ритм Trichoplax sp. H2: реакции на световое излучение различной длины волны. *Материалы XVI Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021»*, Севастополь, 2021, с. 226-228. [Khavronyuk I.S., Voronin D.P., Kuznetsov A.V. Behavioral rhythm of Trichoplax sp. H2: reactions to light radiation of different wavelengths. *Proceedings of XVI International Scientific Conference «Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2021»*, Sevastopol, 2021, pp. 226-228. (In Russ.)]
34. Schnitzler C.E., Pang K., Powers M.L., Reitzel A.M., Ryan J.F., Simmons D., Tada T., Park M., Gupta J., Brooks S.Y., Blakesley R.W., Yokoyama S., Haddock S.H., Martindale M.Q., Baxevanis A.D. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in Mnemiopsis leidyi: a new view of ctenophore photocytes. *BMC Biol.*, 2012, vol. 10, p. 107.

ASSIGNMENT OF FUNCTIONS TO OPSINS OF *TRICHOPLAX ADHAERENS* AND *TRICHOPLAX* SP. H2Khavronyuk I.S.¹, Mamontov A.A.¹, Bulkov V.A.¹, Voronin D.P.¹, Kuznetsov A.V.²¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: havronuk.1994@gmail.com

Abstract. The genome of *Trichoplax* sp. H2 has 10 genes encoding opsin, of which 7 ones are annotated as color-sensitive opsins, from green to ultraviolet. In turn, 10 opsin-like genes were also found in the genome of *Trichoplax adhaerens*. Full amino acid sequences were inferred for a half of these proteins. Due to the opsins of *Trichoplax adhaerens* haplotype H1 have been incompletely characterized, it was of special interest to investigate those opsins. For this purpose, multiple sequence alignments of the all 20 opsins from both trichoplax strains were performed, and guide trees were constructed. Structural models of the 20 proteins were created using homologous comparison and then the docking of retinal chromophore was performed. Based on these calculations, 3 complete hypothetical proteins, such as EDV19328.1 of length 465 aa, EDV22726.1 of length 365 aa, and EDV22897.1 of length 319 aa from *Trichoplax adhaerens* were assigned a blue light sensitivity function. With less chance, the blue light sensitivity could be assigned to 4 incomplete homologous proteins, such as EDV22727.1 (287 aa), EDV19349.1 (188 aa), EDV19891.1 (161 aa), and EDV18601.1 (137 aa) from strain H1. The being of multiple opsin genes in the genomes of haplotypes H1 and H2 suggests that Placozoa are capable of distinguishing shades of blue, and this possibly allows them to navigate in the seawater.

Key words: annotation, biological functions, homology, structural modeling, opsins, Placozoa.