

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE CORSO DI LAUREA IN SCIENZE
BIOLOGICHE

LA GLOBINA E È UNA PROTEINA RESPIRATORIA CORRELATA ALLA MIOGLOBINA ALTAMENTE
ESPRESSA NEGLI OVOCITI DEI PESCI POLMONATI

Globin E is a myoglobin-related, respiratory protein highly expressed in lungfish oocytes

Anno accademico: 2019/2020

Sessione estiva: Luglio 2020

Laureanda:

Pritika Rosati

Relatore:

Chiar.mo Prof.: **Marco BARUCCA**

ABSTRACT

Lo scopo di questo studio è stato verificare la presenza e la funzione respiratoria che la globina E (GbE) riveste nell'ovaio di pesci polmonati, originariamente presente negli occhi di polli, uccelli, celacanti e tartarughe. Inoltre, le analisi filogenetiche hanno affermato che la mioglobina (Mb) sia il tipo di globina correlata più vicina a GbE nella fornitura dell'O₂ negli ovociti.

Sono stati sottoposti ad esame tre diverse specie (*Lepidosiren Paradoxa*, *Protopterus Annectens*, *Protopterus aethiopicus*) mediante metodi di analisi accurate come la qRT-PCR risaltando l'espressione genica di GbE1 nell'ovaio di ognuna di essa. La mappatura delle letture ha permesso, inoltre, di evidenziarne le sequenze di GbE cDNA nelle tre specie.

INTRODUZIONE

GLOBINE

GLOBINE DEI VERTEBRATI

- EMOGLOBINA (Hb)
- MIOGLOBINA (Mb)
- NEUROGLOBINA(Ngb)
- CITOGLOBULINA (Cygb)
- ANDROGLOBINA (Adgb)

GLOBINE PRESENTI IN DETERMINATI TAXA

- GLOBINA E (Gb E)
- GLOBINA X (Gb X)
- GLOBINA Y (Gb Y)

La Globina E (GbE):

- È espressa negli ovociti di pesci polmonati (coanoitti)
- Contribuisce a migliorare la distribuzione di O₂
- È correlata alla Mioglobina (Mb) nella fornitura dell'O₂

INTRODUZIONE

Dominio: Eukaryota

Regno: Animalia

Sottoregno: Eumetazoa

Superphylum: Deuterostomia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclasse: Ittiopsidi

Classe: Sarcopterygii

Ordine: Dipnoi



Fig. 1 *Lungfish*

6 SPECIE DI DIPNOI

METODI

CAMPIONI

L. Paradoxa è stato raccolto in Brasile

le altre specie sono state reperite in negozi di animali

METODI

Gli studi sono stati effettuati mediante:

Estrazione di RNA

Analisi di sequenza e inferenza filogenetica

Trascrizione quantitativa inversa in tempo reale PCR

L'efficienza della reazione è stata misurata dalla pendenza di una curva standard

Ibridazione in situ

Identificazione delle proteine GbE tramite spettrometria di massa

Preparazione di proteine ricombinanti di GbE di pesce polmonato

Studi spettroscopici e curve di legame con l'O₂

Attività di nitrito reduttasi

RISULTATI

IDENTIFICAZIONE DEI GENI GbE NELLE SPECIE DI PESCI POLMONATI



Fig. 2

Lepidosiren paradoxa

Geni:

2 Hb alfa, 3 Hb beta, 1
Gbx, 1 Gby, 5 sequenze

Mb cDNA

Le seq. GbE cDNA sono state verificate tramite mappatura delle letture rivelando 6 distinte trascrizioni GbE:

LpaGbE1; LpaGbE2b



Fig. 3

Protopterus annectens

5 sequenze GbE cDNA:

PanGbE1 a-b;

PanGbE2a-c



Fig. 4

Protopterus aethiopicus

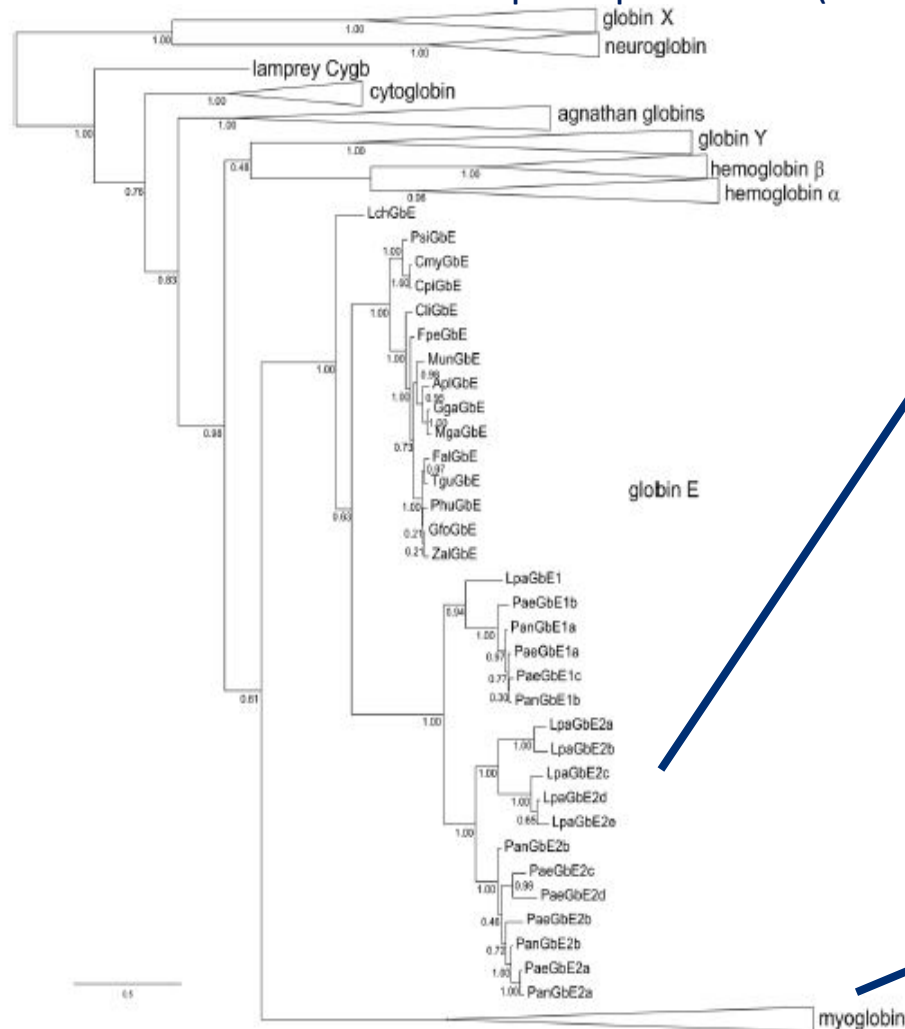
7 sequenze GbE cDNA:

PaeGbE1a-c; PaeGbE2a-d

RISULTATI

CONSERVAZIONE E AMPLIFICAZIONE SPECIFICA DEL GENE GbE DEL PESCE POLMONATO

Lo studio ha evidenziato la presenza di un totale di 18 nuovi geni GbE dalle tre specie di pesci polmonati (151 o 152 aminoacidi)



Le GbE cadono in due diversi cladi, uno formato da sequenze GbE1, l'altro da *L. Paradoxa* GbE2a-e insieme alle proteine GbE2 di *Protopterus*

GbE è correlata con la mioglobina

Grafico 1: Albero filogenetico bayesiano delle globine dei vertebrati

RISULTATI

ESPRESSIONE DI GbE NELL'OVAIO DEI PESCI POLMANATI

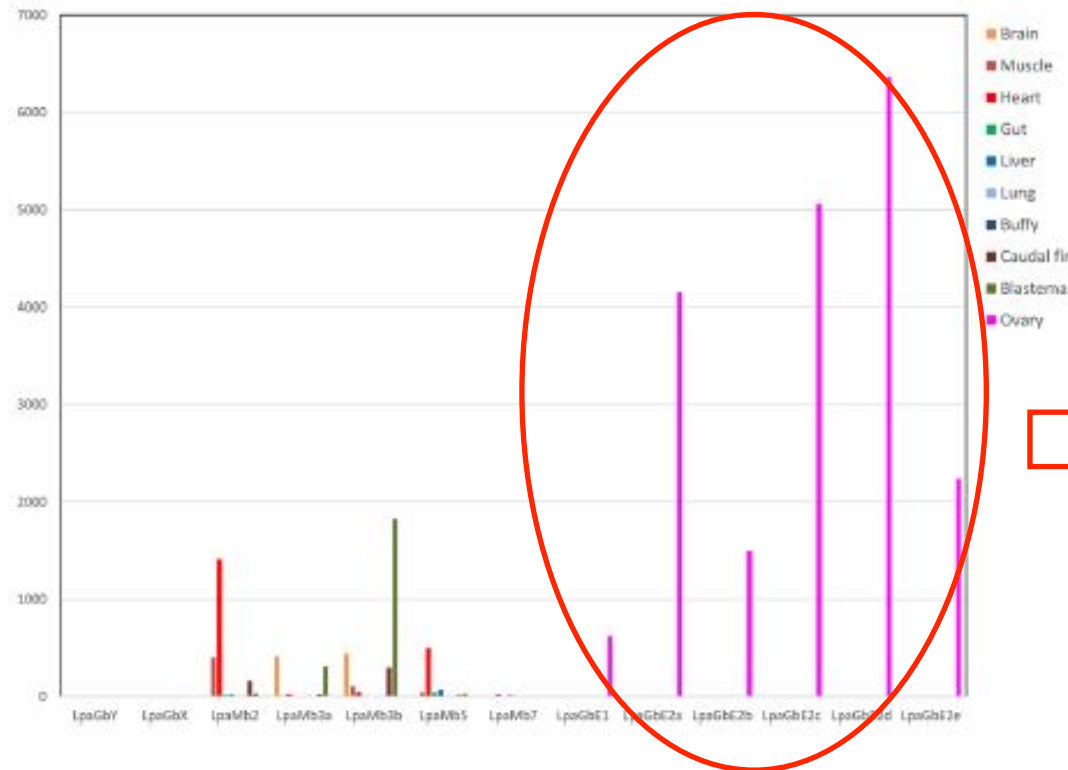


Grafico 2: Espressione dei geni Mb e GbE in tessuti di *L. Paradoxa*

P. Annectens e *P. aethiopicus*: stessi risultati

- In *L. Paradoxa* tutti e sei i geni GbE sono concentrati nell'ovaio
- L'analisi in qRT-PCR conferma la presenza nell'ovaio della GbE1

RISULTATI

LOCALIZZAZIONE DEL GbE mRNA NEGLI OVOCITI PREVITELLOGENICI

Ibridazioni in situ
nelle gonadi di un
adulto femmina
del pesce
sudamericano

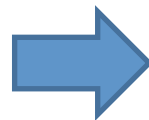
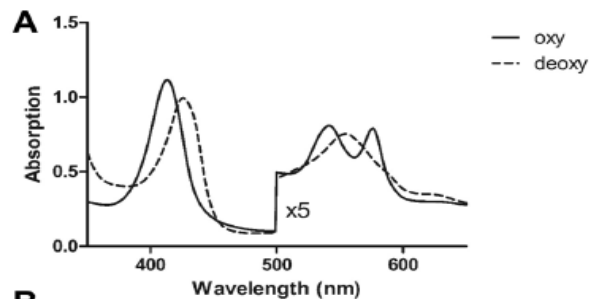


Segnale della
sonda antisenso
LpaGbE1

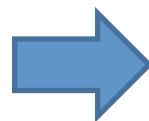
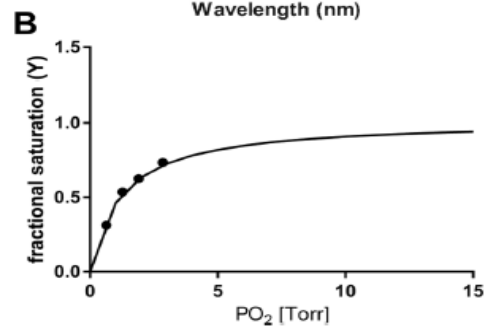


Osservata nel
citoplasma degli
ovociti basofilici
previtellogenici

STUDI SPETTROSCOPICI E EQUILIBRI DI LEGAME DELL'O₂ CON GbE1 DI *L. paradoxa*



Lo spettro di adsorbimento di deossi-Lpa-GbE1 assomiglia a quello di Mb e Hb



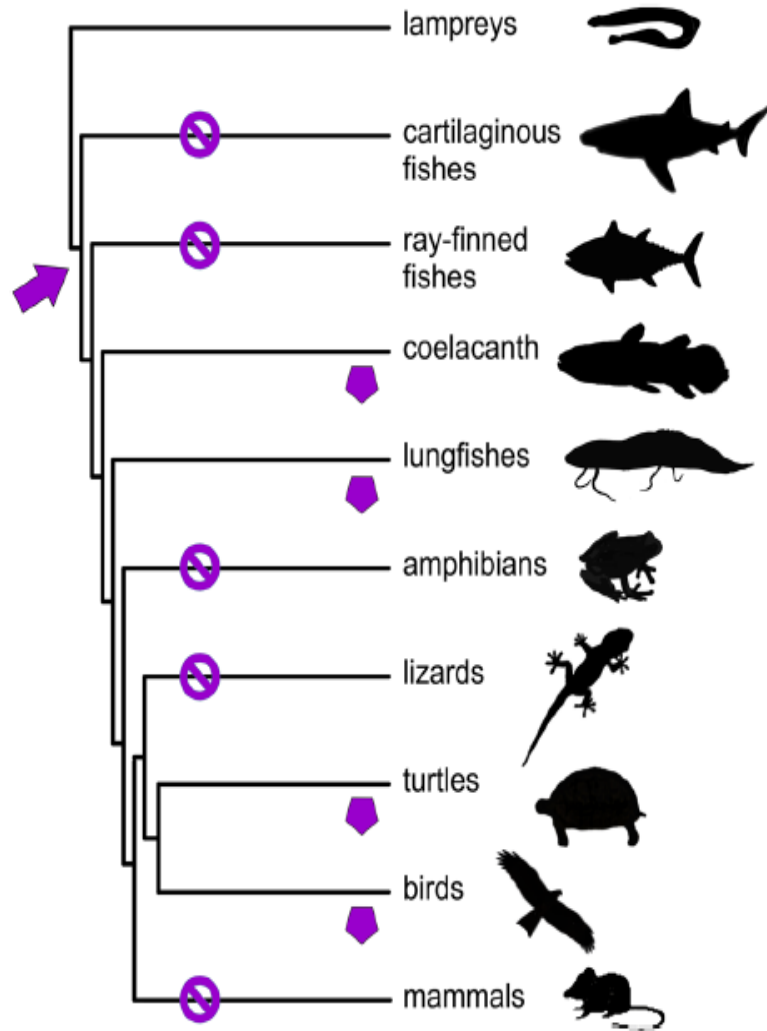
- Curva di equilibrio dell'O₂ mostra che LpaGbE1 si lega in modo reversibile all'O₂
- La curva di legame dell'O₂ mostra alcuni gradi di cooperatività

Grafico 3: Coordinazione dell'eme ed equilibri di O₂ di GbE1 ricombinante di *L. Paradoxa*

DISCUSSIONI

- Gli studi di sequenze RNA e di qRT-PCR hanno mostrato che GbE è quasi esclusivamente espressa nell'ovaio di pesci polmonati
- Ibridazione in situ evidenzia come LpaGbE1 mRNA è espresso negli ovociti previtellogeni non maturi
- GbE mRNA è altamente depositato nell'ovocita e tradotto in proteina GbE (come suggerito dai dati spettroscopici di massa)
- GbE può avere funzione respiratoria nell'ovocita
- GbE aiuta ad estrarre l'O₂ dall'acqua per supportare lo sviluppo dell'embrione
- I dati riscontrano che GbE ha un ruolo simile a Mb e contribuisce all'apporto di O₂ negli ovociti. Ipotesi supportata dalla curva di equilibrio legante l'O₂
- GbE del pesce polmonato svolge una funzione nell'ovaio simile a quella che la Mb svolge nel cuore e nei muscoli scheletrici

DISCUSSIONI



GbE è stata persa in tutti i cladi dei vertebrati ad eccezione di uccelli, tartarughe, pesci polmonati e celacanti

Grafico 4: Presenza di GbE nei vertebrati

In futuro il Celacanto potrebbe essere il punto di svolta nell'evoluzione
ma non ci sono ancora i trascrittomi disponibili



GRATA PER L'ATTENZIONE RISERVATAMI

FONTI BIBLIOGRAFICHE E SITOGRAFIA

Lüdemann J., Verissimo K. M., Dreger K., Fago A., Schneider I., & Burmester, T. (2019). Globin E is a myoglobin-related, respiratory protein highly expressed in lungfish oocytes. *Scientific reports*, 9(1), 1-11

Fig. 1 Toraldo Serra M.L., Le stranezze della fisiologia animale- i Dipnoi, pesci ma non troppo. Bioterra, (2018) (<https://www.bioterra.it/stranezze-fisiologia-animale-dipnoi-pesci/>)

Fig. 2 <https://eol.org/pages/988107/media>

Fig. 3 Lüling K.H., Enciclopedia Britannica (2017) (<https://www.britannica.com/animal/lungfish>)

F i g . 4
<https://www.globalbioticinteractions.org/?interactionType=interactsWith&sourceTaxon=NCBI%3A7886>

Grafici 1- 2 - 3 - 4 sono stati presi dall'articolo (vedi in alto)