

**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE**

**BIOLUMINESCENZA NEGLI SQUALI LANTERNA: RUOLO DEI RECETTORI ORMONALI**

**BIOLUMINESCENCE IN LANTERNSHARKS: INSIGHT FROM HORMONE RECEPTOR LOCALIZATION**

Tesi di Laurea di:  
Elisabetta Biancofiore

**Sessione Autunnale  
Dicembre 2019/2020**

Docente Referente:  
Dott.ssa Maura Benedetti



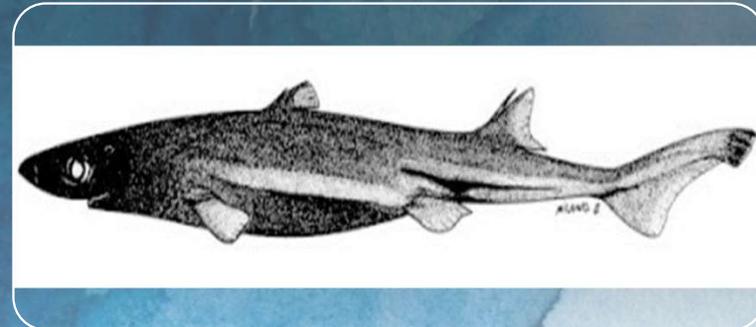
# ABSTRACT

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse per alcuni esemplari di squali di profondità capaci di emettere bioluminescenza, in particolare per la famiglia degli *Etmopteridae*. Le due specie di interesse sono *Etmopterus spinax* e *Etmopterus molleri*. Questi squali mesopelagici producono luce grazie a un controllo ormonale, che coinvolge gli ormoni della melatonina, adrenocorticotropi e  $\alpha$ -melanotropi. Gli ormoni sono controllati da recettori, rispettivamente il recettore della melatonina, della melacortina che fanno parte dei recettori accoppiati a proteine G per i processi di trasduzione, che attraverso tecniche di biologia molecolare e immunofluorescenza evidenziano così la localizzazione specifica dei recettori nonché delle proteine G associate all'interno dei fotofori. I risultati hanno evidenziato, dalle immunofluorescenze di sezioni di pelle delle due specie di squali esaminate, che i recettori della melatonina e della prolattina associate a specifiche proteine G agiscono come attivatori dell'emissione della luce, mentre i recettori della melacortina e gli  $\alpha$ -melanociti associate ad altre specifiche proteine G agiscono come inibitori sull'emissione della luce, provocando quindi il fenomeno della bioluminescenza in particolare nella zona ventrale del corpo sia in *E. spinax* che in *E. molleri*.



# INTRODUZIONE

Allo stato attuale le uniche due specie di *Etmopteridae* capaci di emettere luminescenza sono:



## ***Etmopterus spinax:***

squalo abissale della famiglia Etmopteridae.

- Dimensioni: può arrivare ad una lunghezza di soli 50 cm
- vive principalmente tra i 2000 metri di profondità.
- Distribuzione geografica: Mar Mediterraneo occidentale e Oceano Atlantico tra Islanda e Africa tropicale.

<http://www.colapisci.it/Pescltalia/pisces/elasmobranchi/Squaliformes/etmopteridae/sagrinerio.htm>

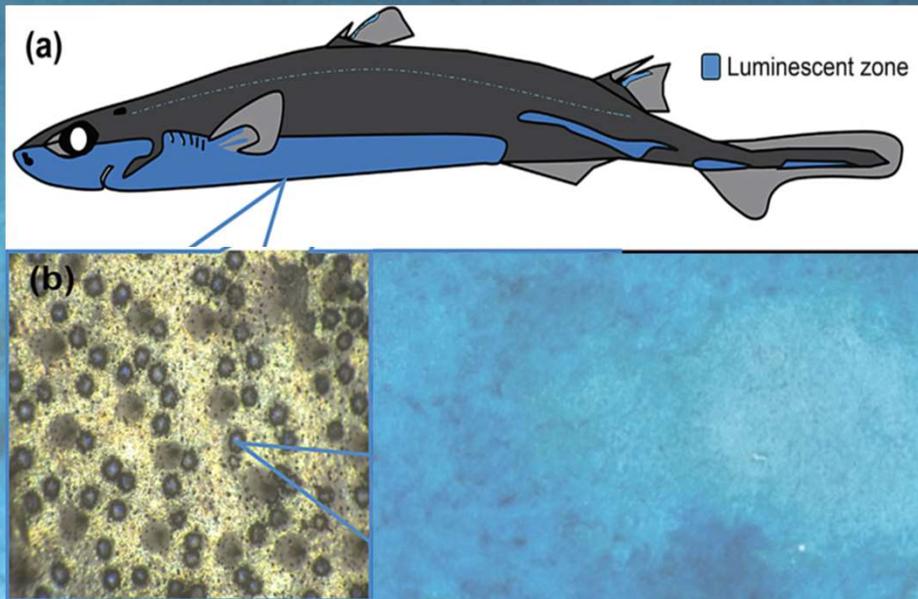
## ***Etmopterus molleri:***

squalo lanterna a coda slanciata della famiglia Etmopteridae.

- riproduzione ovovivipara.
- Distribuzione geografica: Oceano Indiano occidentale a una profondità compresa tra 250 e 860 m.

<https://fishesofaustralia.net.au/Home/species/2012>

# SCOPO DEL LAVORO



- Questi squali di profondità hanno mostrato degli organi luminescenti nella zona ventrale del corpo, gli organi in questione sono i fotofori, costituiti da cellule emittenti la luce ovvero i fotociti.
- Il controllo dell'emissione della luce avviene attraverso gli ormoni: melatonina e prolattina che stimolano l'emissione di luce, mentre gli ormoni alfa-melanociti e adrenocorticotropi la inibiscono.
- Dal trascrittoma cutaneo di *E. spinax* sono stati riscontrati recettori simili ad altri vertebrati.

Fig. 1. L'organo leggero dell'*Etmopterus spinax*. (a). Vista schematica delle zone luminescenti. (b). Area luminosa ventrale che mostra i fotofori.

# MATERIALI E METODI

## 1. CAMPIONI SPERIMENTALI

Norvegia 2017, a  
250 m di  
profondità sono  
stati catturati  
esemplari di *E.  
spinax*



Giappone 2016, a  
500 m di  
profondità sono  
stati catturati  
esemplari di *E.  
molleri*.



1. Entrambe le specie, conservate in acquari e sacrificate secondo le normative previste. Di seguito sono stati pesati, ed è stata determinata la lunghezza e il sesso.
2. Porzioni di tessuto cutaneo 3 cm<sup>2</sup> sono state prelevate dalla zona luminosa del ventre
3. Campioni fissati in soluzione salina tampone fosfato contenente formaldeide 4% per 12 ore a 4°C e poi trasferite in PBS a 4°C fino all'uso.

# MATERIALI E METODI

## 2. RICERCA DELLE SEQUENZE

Utilizzando il trascrittoma di *E. spinax*.

- Utilizzando due metodi online BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) e ExPASy ([expasy.org](http://expasy.org)), si è svolta una ricerca sulle sequenza dei recettori MT, PRL e  $\alpha$ -MSH.
- Utilizzando lo strumento online MEMSAT ([www.chemogenomix.com/memsat](http://www.chemogenomix.com/memsat)) che ha permesso di confermare la sequenza degli allineamenti e predire la struttura secondaria.

*BLAST: può essere utilizzato per aiutare a identificare i membri delle famiglie geniche.*

*ExPASy è un portale che fornisce accesso a database scientifici e strumenti software in diverse aree proteomica, genomica, filogenesi.*



# MATERIALI E METODI

## 3. Inferenza filogenetica del recettore

Le sequenze MTNR e MCR dei metazoi sono state raccolte grazie al database NCBI. Per entrambi i recettori un allineamento multiplo è stato fatto utilizzando l'algoritmo MAFFT.

- Il recettore oppioide è stato selezionato come outgroup per la filogenesi MTNR
- Il recettore del neuropeptide Y è stato selezionato per la filogenesi di MCR dall'*Homo sapiens*



# MATERIALI E METODI



## 3. Inferenza filogenetica del recettore

Dalle sequenze metazoiche si è rilevata la presenza di recettori per la melatonina e melacortina che sono presenti anche in altre specie di vertebrati: -quattro recettori per la melatonina e cinque recettori per la melacortina.

<b>Melatonin receptor type</b>	<b>Species</b>	<b>Accession number on NCBI</b>	<b>Melanocortin receptor type</b>	<b>Species</b>	<b>Accession number on NCBI</b>
Melatonin receptor 1A	<i>Homo sapiens</i>	NP_005949.1	Melanocortin receptor 1	<i>Homo sapiens</i>	NP_002377.4
Melatonin receptor 1A	<i>Gallus gallus</i>	NP_990693.1	Melanocortin receptor 1	<i>Ovis aries</i>	CBI69758.1
Melatonin receptor 1A	<i>Danio rerio</i>	NP_571468.1	Melanocortin receptor 1	<i>Felis catus</i>	CAQ86663.2
Melatonin receptor 1B	<i>Danio rerio</i>	NP_571469.1	Melanocortin receptor 1	<i>Sciurus vulgaris</i>	AGV54901.1
Melatonin receptor 1B	<i>Danio rerio</i>	NP_571470.1	Melanocortin receptor 1	<i>Gallus gallus</i>	NP_001026633.1
Melatonin receptor 1B	<i>Esox lucius</i>	AAG17109.1	Melanocortin receptor 1	<i>Meleagris gallopavo</i>	ADT78505.1
Melatonin receptor 1B	<i>Xenopus laevis</i>	XP_018105845.1	Melanocortin receptor 5	<i>Gallus gallus</i>	NP_001026186.1
Melatonin receptor 1B	<i>Takifugu niphobles</i>	BAI39599.1	Melanocortin receptor 5	<i>Danio rerio</i>	NP_775386.1
Melatonin receptor 1B	<i>Callorhinchus milii</i>	XP_007901736.1	Melanocortin receptor 5	<i>Dicentrarchus labrax</i>	CAZ69796.1
Melatonin receptor 1C	<i>Xenopus laevis</i>	NP_001081388.1	Melanocortin receptor 5	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AAS45133.1
Melatonin receptor 1C	<i>Takifugu niphobles</i>	BAI39600.1	Melanocortin receptor 5	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	AAQ55179.1
Melatonin receptor 1D	<i>Danio rerio</i>	NP_001153381.1	Melanocortin receptor 5	<i>Cyprinus carpio</i>	CAH04350.1
Melatonin receptor-like	<i>Callorhinchus milii</i>	XP_007891233.1	Melanocortin receptor 5	<i>Takifugu rubripes</i>	NP_001027937.1
Melatonin receptor-like	<i>Etmopterus spinax</i>	Unigene11557	Melanocortin receptor 5	<i>Callorhinchus milii</i>	XP_007893314.1
Melatonin-related receptor	<i>Homo sapiens</i>	Q13585.3	Melanocortin receptor 5	<i>Squalus Acanthias</i>	AAS67890.1
<b>mu-type opioid receptor</b>	<i>Danio rerio</i>	NP_571782.2	<b>Neuropeptide Y receptor type 1</b>	<i>Homo sapiens</i>	P25929.1

Dati supplementari S3: Sequenze metazoiche di riferimento raccolte nei database NCBI per la filogenesi (A) MTNR e (B) MCR.

# MATERIALI E METODI

## 4. Preparazione delle sezioni di cute

La pelle di squalo precedentemente conservata in PBS, è stata poi inclusa in Tissue tek e successivamente congelata a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Successivamente sono state effettuate delle sezioni di  $10\ \mu\text{m}$  di spessore che sono state posizionate su vetrini da microscopia «SuperFrost» e lasciate ad asciugare tutta la notte.



Le sezioni sono state poi incubate con anticorpi primari scelti sulla base di elevata omologia delle proteine investigate con *E. spinax*.



Dopo un'ora di incubazione con anticorpo primario, per osservare i legami tra anticorpo, recettori e proteina sono stati utilizzati anticorpi secondari coniugato con diversi enzimi; osserverò quindi un colore rosso per MTNR e le subunità della proteina G, e un colorante giallo per MCR.

I vetrini sono stati poi esaminati con microscopio confocale dotato di software.



## 5. Immunolocalizzazione di recettori e proteine G.

1. anti-MCR,
2. anti-MTNR,
3. anti-G $\alpha$ s,
4. anti-G $\alpha$ i,
5. anti-G $\alpha$ o,
6. anti-G $\alpha$ t.



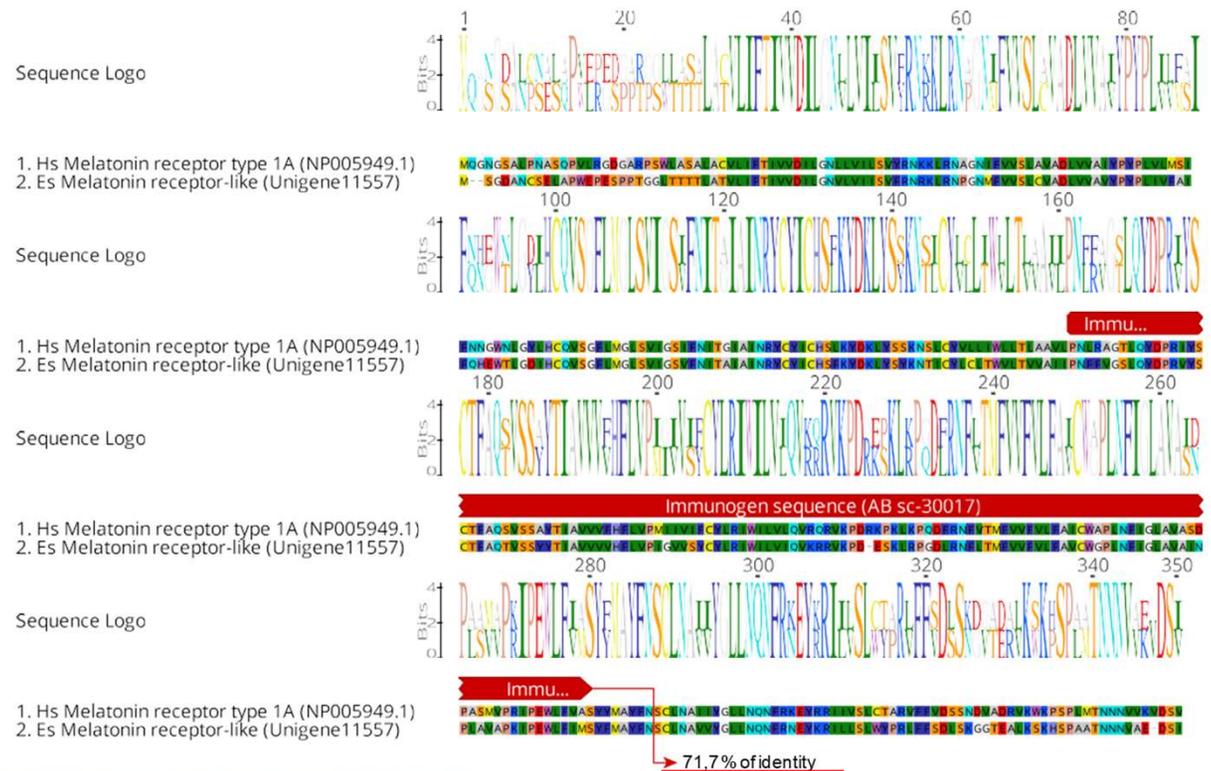
# MATERIALI E METODI

## 5. Immunolocalizzazione del recettore MTNR.

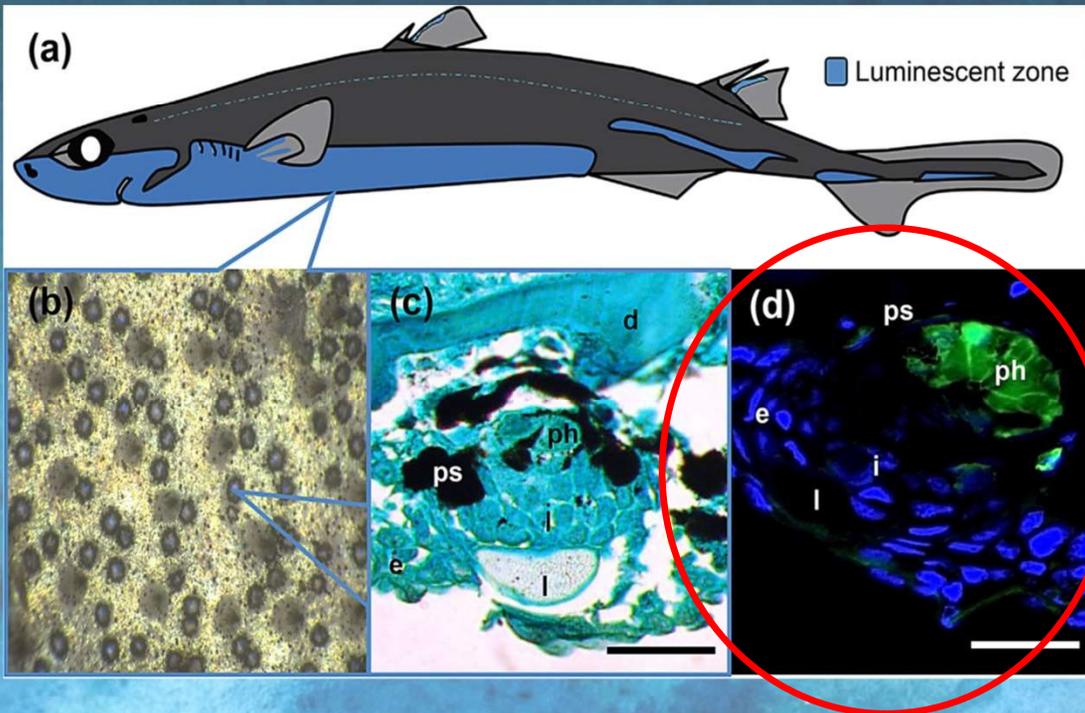
ESEMPIO di immunolocalizzazione del recettore della melatonina con anticorpo commerciale primario, compatibile nella sequenza amminoacidica di *E. spinax* al 71,1%.

**Supplementary data S4** Amino acid alignments of *E. spinax* (A) Melatonin receptor-like (Es MTNR-like; MK923747) (A) Melatonin receptor type 1A (Hs MTNR1A; NP005949.1).

(A)



# RISULTATI



I fotofori presenti quindi nella sezione ventrale del corpo delle due specie di squali, sono state sottoposte a colorazione DAPI per evidenziare i nuclei delle cellule. Questo è quello che si ottiene dalla sezione cutanea osservata al microscopio senza l'incubazione con anticorpi.

Fig. 1. Organo luminoso di *Etmopterus spinax*. (a) Vista schematica delle zone luminescenti. (b) Fotofori dell'area luminosa ventrale. (c) sezione istologica di un fotoforo. (d) Autofluorescenza verde dei fotociti con colorazione nucleare blu (DAPI) delle sezioni del controllo (senza anticorpo primario).

# RISULTATI

- Tecnica di immunoistofluorescenza che si ottiene incubando le sezioni con gli anticorpi primari e secondari per i singoli recettori della melatonina e melancortina e per ogni subunità della proteina G.
- I recettori MTNR e proteina G $\alpha$ i sono state localizzati nella membrana dell'ILS.
- Mentre i recettori MCR e proteina G $\alpha$ s sono stati localizzati sotto la membrana dell'ILS.

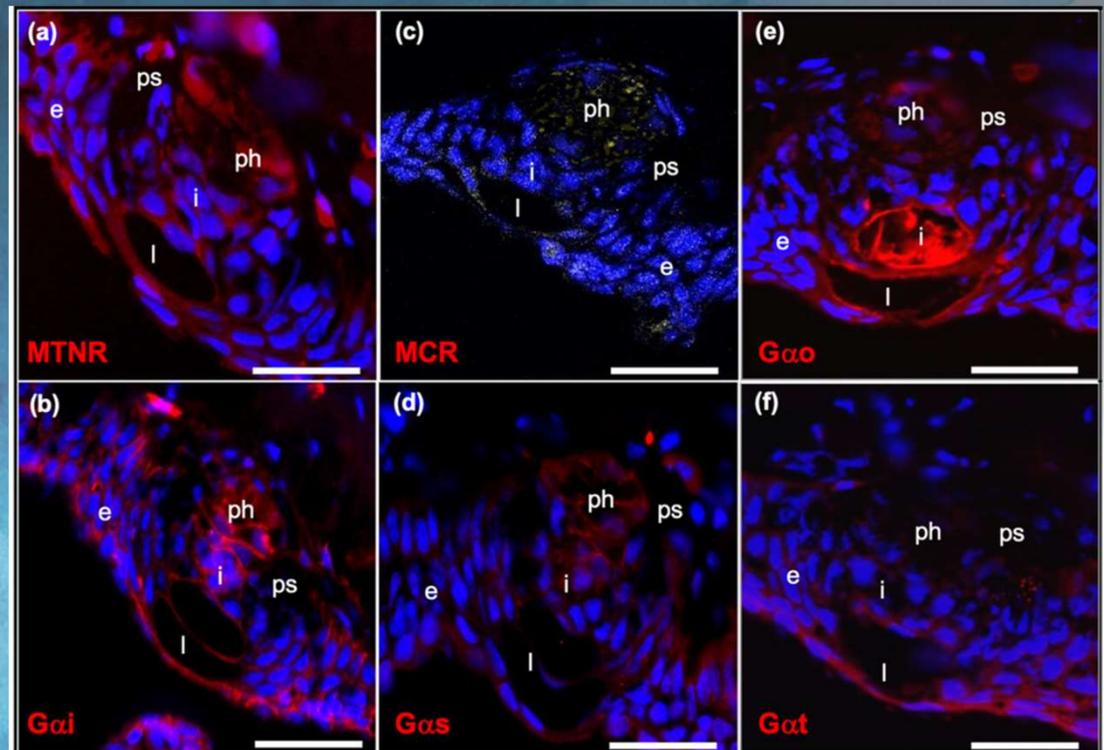
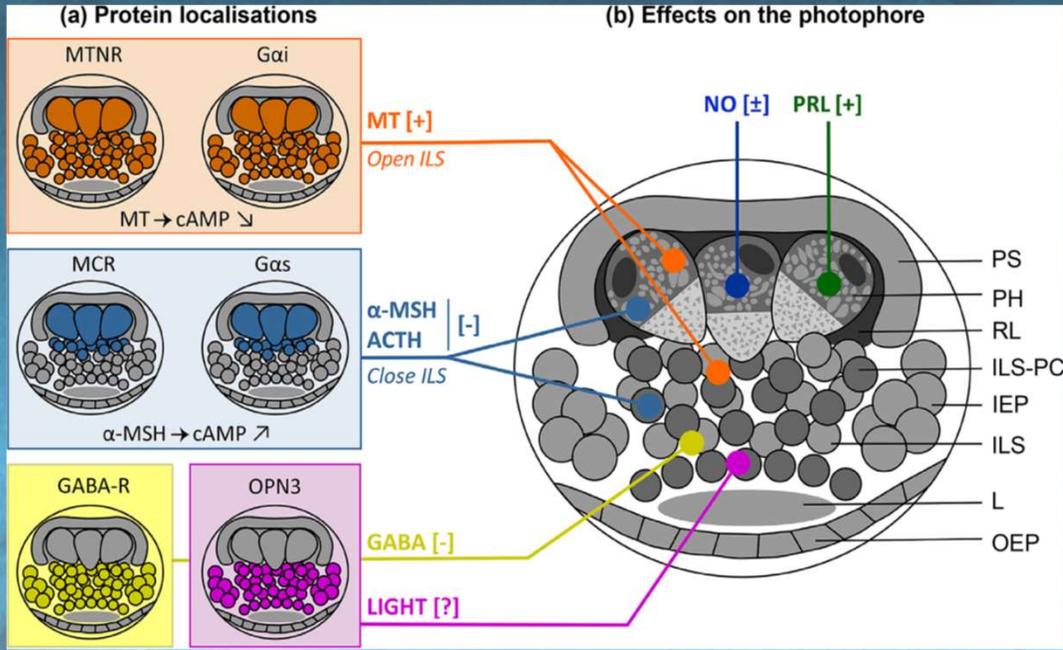


Fig. 3. Immunodeterminazioni del recettore della melatonina (MTNR), del recettore della melanocortina (MCR), della proteina G subunità  $\alpha$ i, s, o e t all'interno dei fotofori di *Etmopterus spinax*. (a) colorazione per immunoistofluorescenza (IHF) del fotoforo ottenuto con l'anticorpo anti-MTNR; (b) con l'anticorpo della subunità anti-G $\alpha$ i. Una colorazione simile è osservata nella membrana cellulare delle cellule ILS, cellula del cristallino e fotociti. (c) colorazione IHF del fotoforo ottenuto con l'anticorpo anti-MCR; (d) con gli anti-G $\alpha$ s anticorpo della subunità. Si osserva una chiara co-localizzazione della colorazione della subunità MCR e G $\alpha$ s all'interno della membrana cellulare dei fotociti e delle cellule ILS. (e) colorazione IHF ottenuta con l'anticorpo della subunità anti-G $\alpha$ o. Si osserva una forte immunoreattività del cristallino; (f) Colorazione IHF ottenuta con l'anticorpo della subunità anti-G $\alpha$ t che mostra un debole immunoreattività del primo strato di epidermide. La colorazione DAPI con blu nucleare è stata applicata a tutte le sezioni; è stato utilizzato un anticorpo secondario accoppiato con fluorocromo rosso per tutte le sezioni ad eccezione dell'etichettatura MCR in cui è stato utilizzato un anticorpo secondario accoppiato con fluorocromo giallo. e, epidermide; i, cellule con struttura simile all'iride; l, cellula della lente; ph, fotociti; ps, guaina pigmentata. Barra della scala: 50  $\mu$ m.

# RISULTATI



- Melatonina e proteina  $G\alpha_i$  associata sono localizzate tra i fotociti e nelle cellule pigmentate simile all'iride indicate con il segno '+' poiché sono attivatori.
- Melacortina e proteina  $G\alpha_s$  associata sono localizzate rispettivamente negli stessi punti ma indicate con segno '-' in quanto sono inibitori dell'emissione della luce.
- Neuromodulatore GABA e Opn3, ovvero l'ospina, con ulteriore funzione di attivatori e inibitori del controllo dell'emissione di luce.

Fig. 5. Vista schematica della localizzazione e del controllo di noti attori coinvolti nella bioluminescenza negli squali lanterna. (a) Localizzazioni dei diversi GPCR coinvolti nel controllo dell'emissione di luce e implicazioni note sul livello di concentrazione di cAMP intracellulare. (b) Effetti dei ligandi GPCR noti sul controllo dell'emissione di luce a livello di fotoforo. [+] attivatore, [±] modulatore, [-] inibitore e [?] effetti sconosciuti sull'emissione di luce. IEP, strato interno dell'epidermide; ILS, cellule con struttura simile all'iride; ILS-PC, cellule pigmentate con struttura simile all'iride; L, cellula della lente; OEP, strato esterno dell'epidermide; PH, fotociti; PS, guaina pigmentata; RL, strato riflettente.



# CONCLUSIONI

- L'immunoistofluorescenza effettuata su *E. spinax* e *E. molleri* ha evidenziato che in entrambe le specie agiscono gli stessi fattori ormonali per la regolazione dell'emissione della luce.
- La melatonina e prolattina agiscono come attivatori sull'emissione della luce invece il recettore melacortina e gli  $\alpha$ -melanociti agiscono da inibitori. Tutto ciò avviene all'interno dell'ILS, ovvero la struttura cellulare simile all'iride, che funge da organo otturatore della luce.
- In più sono stati riscontrati altri due fattori:
  - OPN3 è in grado di rilevare la luce, quindi in grado di percepire la luminescenza dello squalo e potenzialmente funge da regolatore di emissione della luce.
  - Il neuromodulatore GABA che è un inibitore.



# Bibliografia:

Duchatelet L., Delroisse J., Mallefet J. 2020. Bioluminescence in lanternsharks: Insight from hormone receptor Localization. *General and Comparative Endocrinology*. 294-113488

# Sitografia:

<http://www.colapisci.it/Pescltalia/pisces/elasmobranchi/Squaliformes/etmopteridae/sagrinero.htm>

<https://fishesofaustralia.net.au/Home/species/2012>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

[http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/software\\_downloads/memsat/](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/software_downloads/memsat/)

<https://www.expasy.org/>

<http://www.chemogenomix.com/memsat>

