



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

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

TITOLO TESI (Italiano)

**ADATTAMENTI GENOMICI DEI PESCI GHIACCIO
(CHANNICHTHYDAE) ALLE BASSE TEMPERATURE**

TITOLO TESI (Inglese)

**GENOMIC ADAPTATIONS OF ICEFISH
(CHANNICHTHYDAE) TO LOW TEMPERATURES**

Tesi di Laurea di:
MARCO MARIA NEGRI



Docente Referente
Chiar.mo Prof. **VINCENZO CAPUTO BARUCCHI**



Sessione Autunnale 2020

Anno Accademico 2019-2020

Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Scienze
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Tesi di Laurea

ADATTAMENTI GENOMICI DEI PESCI GHIACCIO (CHANNICHTHYDAE) ALLE BASSE TEMPERATURE

Relatore:

Ch.mo Prof. Vincenzo Caputo Barucchi

Laureando:

Marco Maria Negri

Anno Accademico 2019-20

CARATTERISTICHE PRINCIPALI DEI PESCI GHIACCIO

Appartenenza

Sottordine Notothenoidei

Famiglia Cannichthydae

Separazione
oceanografica
per correnti
circumpolari
ACC

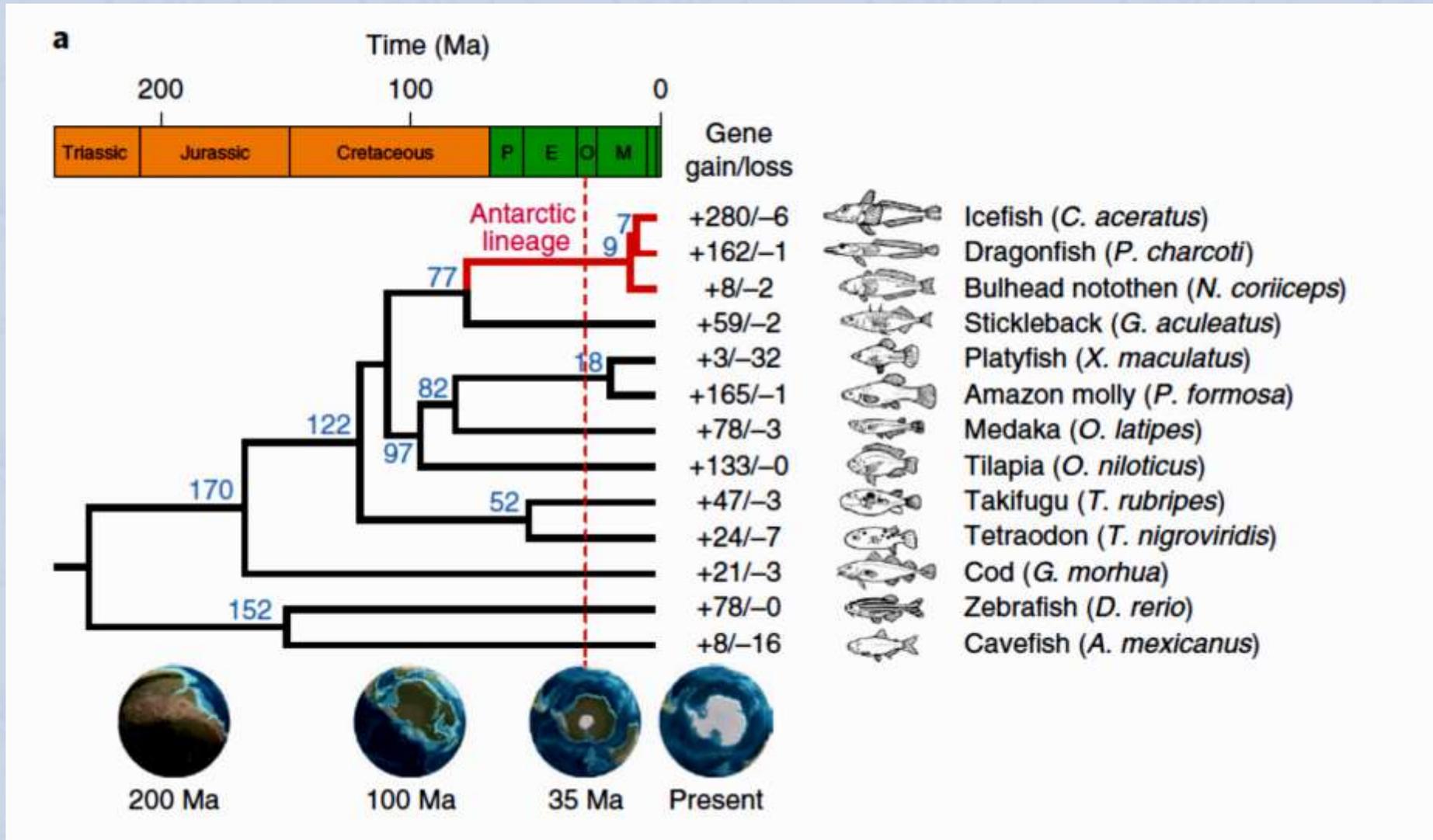
Divergenza dei
Notothenoidei
da Stickleback
circa 77 Ma

Serie di
modifiche
genetiche
(duplicazioni e
delezioni)

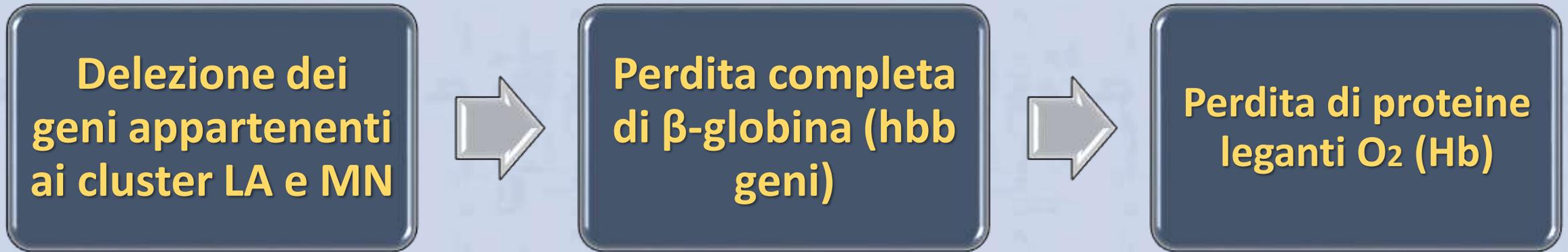
Acquisizione di
caratteristiche
uniche

Costituiscono il
35% delle specie
e il 90% della
biomassa della
zona antartica

ALBERO FILOGENETICO DEI PESCI GHIACCIO



MODIFICHE DEL SISTEMA DI TRASPORTO DI OSSIGENO



- La mutazione dei geni per l'espressione di Hb è avvenuta con la divergenza dai Notothenoidei avvenuta tra 5 – 2 Ma
- 15 specie di pesci ghiaccio su 16 conosciute hanno mantenuto 3 frammenti di hba

MODIFICHE DEL MUSCOLO SCHELETRICO

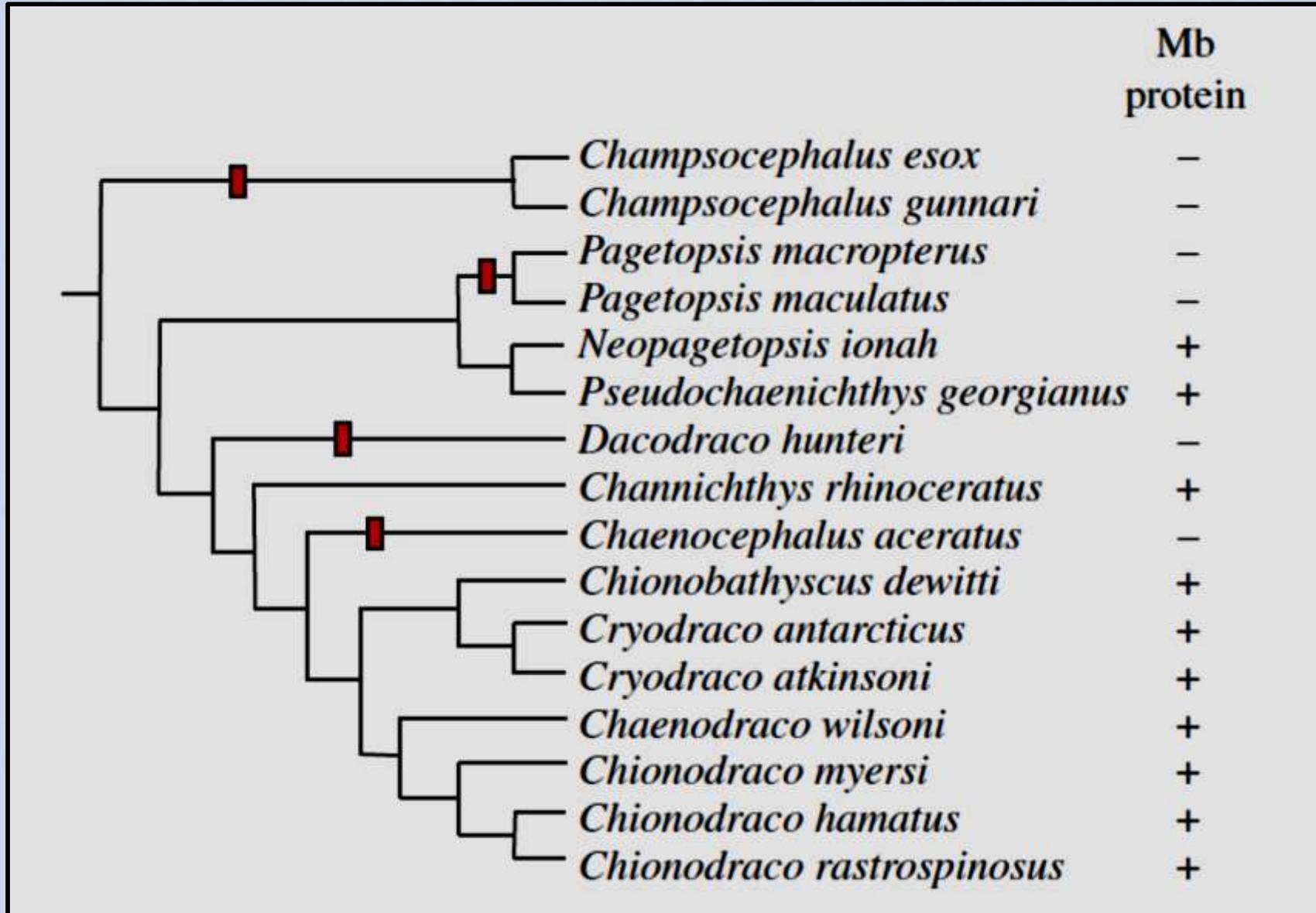
Mancata espressione di mioglobina (Mb) nei muscoli scheletrici ossidativi

Eventi verificatisi in tutte le famiglie di Notothenoidei

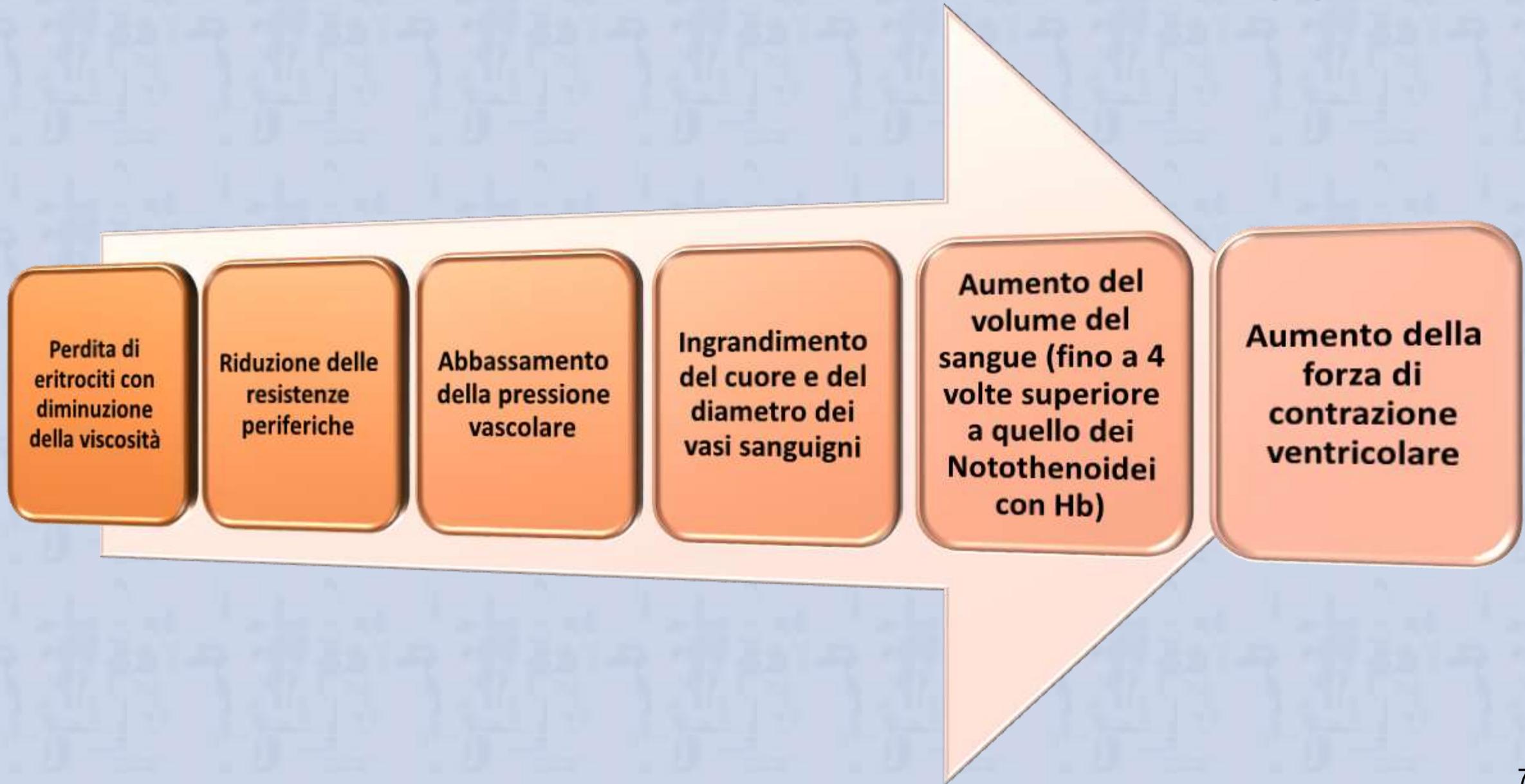
4 eventi mutazionali indipendenti con perdita dell'espressione di geni per Mb nel muscolo cardiaco

Proteine Mb-simili localizzate nei tessuti scheletrici glicolitici

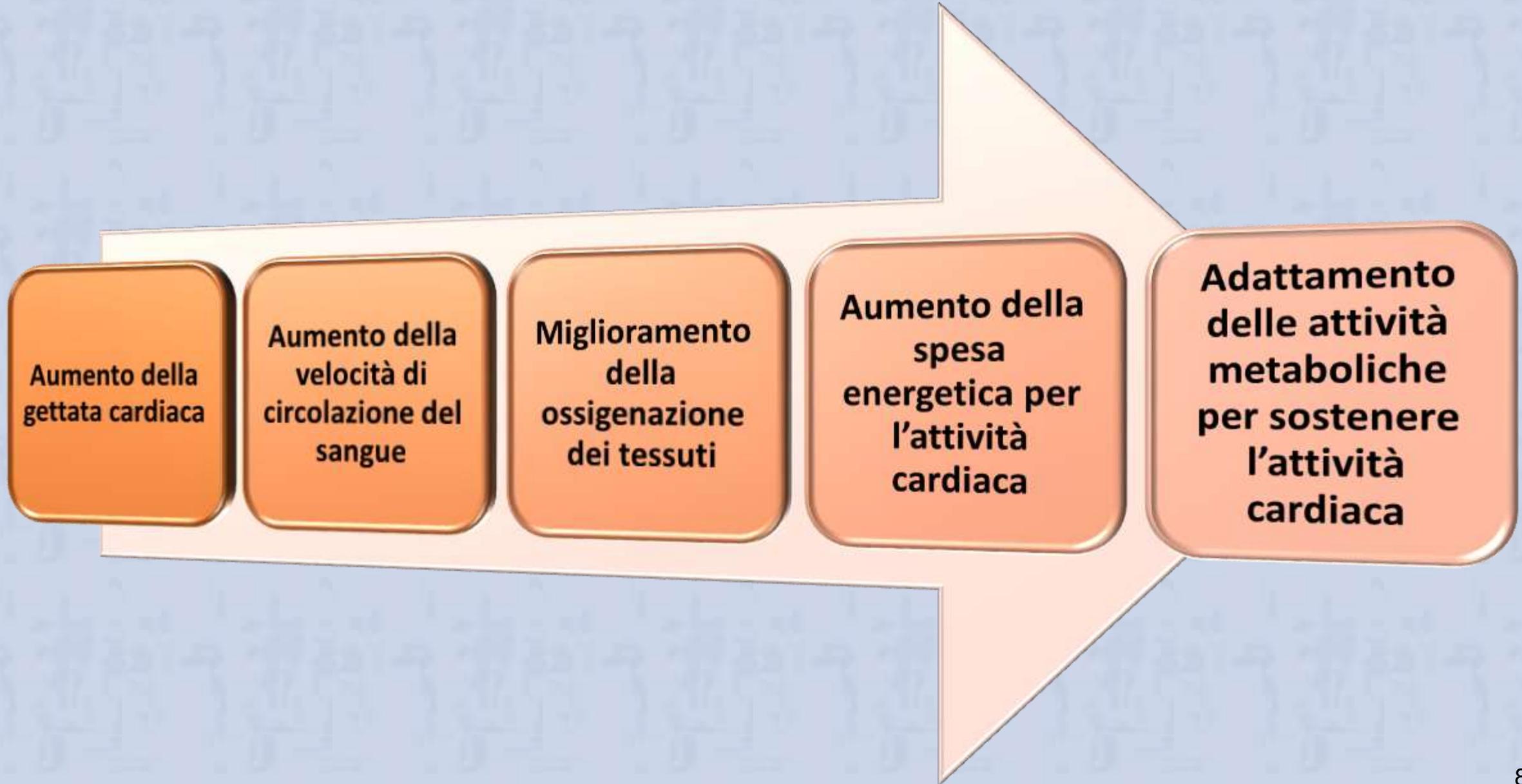
PERDITA DELL'ESPRESSIONE DEL GENE DELLA MIOGLOBINA



MODIFICHE DEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE (1)



MODIFICHE DEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE (2)



ENZIMA OSSIDO NITRICO SINTETASI (NOS)

Presente in tre isoforme (eNOS, nNOS e iNOS)

eNOS, nNOS e iNOS sono espresse nei pesci (zebrafish)

nNOS è maggiormente espressa nei muscoli scheletrici dei pesci ghiaccio rispetto ai pesci a sangue rosso

eNOS e iNOS sono espresse nei miociti del ventricolo

eNOS è inoltre presente nell'endotelio epicardico dei ventricoli

AZIONI DELL'OSSIDO NITRICO

Vasodilatazione periferica

Effetto inotropo positivo (aumento forza di contrazione e riduzione residuo telesistolico)

Aumento della gettata sistolica

Potenziamento attività del fattore di crescita dei vasi sanguigni (VEGF)

Aumento della densità mitocondriale intracellulare

Modifica morfologica dei mitocondri con aumento di attività ossidativa

SUSCETTIBILITA' ALLO STRESS OSSIDATIVO NEI PESCI GHIACCIO

Aumento di circa 2 volte del volume dei mitocondri, ricchi di acidi grassi insaturi, presenti nelle cellule scheletriche (rete lipidica che aumenta l'ossigenazione a basse concentrazioni)

Ridotta sintesi di specie molecolari a funzione antiossidante

Concentrazione di citocromo c invariata tra specie a sangue bianco e rosso

Alcune specie di pesci ghiaccio, incluso *C. Acerantus*, sono maggiormente suscettibili allo stress dovuto a specie reattive derivate dall'ossigeno (RSO) rispetto ad altri Notothenoidei a sangue rosso

ESPANSIONE DEI SISTEMI ENZIMATICI DI PROTEZIONE DALLO STRESS OSSIDATIVO

Sistema della superossido dismutasi (SOD)

5 geni (tipicamente 3 nei Teleostei)

Sistema della NADPH:chinone reduttasi (NQO)

33 geni (tipicamente 2-10) + 3 loci per il gene NQO1

Sistema della 8-oxoguanina DNA glicosilasi

2 copie in tandem

MODIFICA DEL RITMO CIRCADIANO

Fluttuazioni notevoli
tipiche delle regioni
polari della differenza di
lunghezza tra il dì e la
notte

Delezione parziale di
alcuni geni CRY coinvolti
nella regolazione del
ritmo circadiano

Alterazione della
regolazione omeostatica
del ritmo circadiano

GLICOPROTEINE ANTI-CONGELAMENTO (AFGP) - CARATTERISTICHE

Abbassano il punto di congelamento dell'acqua

Meccanismo non colligativo di adsorbimento-inibizione

Esprese in tutte le 16 specie di pesci ghiaccio

Presenti negli individui adulti

Identificabili in quasi tutti i liquidi corporei

Assenti nella endolinfa, nei liquidi oculari e nell'urina

Assenti negli embrioni

GLICOPROTEINE ANTI-CONGELAMENTO (AFGP) - GENETICA

**Geni codificanti
per Tripsinogeno**

**Duplicazione in
tandem**

**11 copie di geni per
AFPG adiacenti a
10 copie di geni per
Tripsinogeno**

BIBLIOGRAFIA

- Kim B. et al: Antarctic blackfin icefish genome reveals adaptations to extreme environments
Nat. Ecol. Evol., 2019(3): 469-478
- Sidell BD, O'Brien K: When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes
J. Exp. Biol., 2006: 209, 1791-1802
- I pesci ghiaccio e la storia del sangue
Le Scienze, vol. Aprile 2019
- DeVries A.: The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of antarctic fishes
Comp. Biochem. Physiol., 1988: 90B, 611-621
- DeVries A., Cheng C.: The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the survival of cold-water fishes
Water and Life 1992 Springer Verlag Berlin: 301-315

Università Politecnica delle Marche

Facoltà di Scienze - Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Tesi di Laurea

Adattamenti genomici dei pesci ghiaccio (Channichthyidae) alle basse temperature

Relatore: Ch.mo Prof. Vincenzo Caputo Barucchi

Laureando: Marco Maria Negri

Anno Accademico 2019-20

INTRODUZIONE

I Channichthyidae, conosciuti anche come pesci ghiaccio, sono una famiglia di pesci appartenente al sottordine dei Notothenioidea (ordine Perciforma). La separazione oceanografica ad opera delle correnti circumpolari ACC ha portato alla divergenza dei Notothenioidei dal ramo dei Stickleback circa 77 milioni di anni (Ma). L'abbassamento della temperatura delle acque antartiche fino a -1.9 C° alle alte latitudini (avvenimento accaduto tra i 10 – 14 Ma) ha portato alla formazione di nicchie ecologiche che hanno permesso ai notothenioidi ancestrali di diversificarsi in 8 Taxa. Il loro adattamento ha portato all'acquisizione di caratteristiche genotipiche e fenotipiche uniche tra le quali glicoproteine anti-congelamento (AFGP), perdita della mioglobina nei muscoli scheletrici e diminuzione della densità dei minerali contenuti negli elementi ossei e scaglie. Oggigiorno costituiscono il 35% delle specie e il 90% della biomassa delle acque antartiche.

PROTEINE LEGANTI OSSIGENO MOLECOLARE

La caratteristica peculiare dei pesci ghiaccio è l'assenza completa di eritrociti nel sangue e di emoglobina funzionale (sangue bianco). Nei Teleostei due cluster (AL e MN) contengono sequenze ripetute e alternate di geni codificanti globuline alfa (hba) e beta (hbb). Nelle 16 specie riconosciute i geni hbb sono stati persi e 15 di queste hanno conservato 3 geni hba. Questo evento di delezione è avvenuto circa 5 – 2 Ma, corrispondente alla divergenza dai dragonfish e bulhead notothen.

La mancata espressione dell'emoglobina va ad accompagnare la mancata espressione di mioglobina (Mb). La delezione di geni codificanti Mb è un evento avvenuto a monte di quello della perdita di Hb funzionale, tra 12 – 5 Ma corrispondente alla diversificazione degli 8 Taxa di Notothenioidi. In tutti i pesci ghiaccio e i Notothenioidi a sangue rosso non è stata rilevata la presenza di espressione di Mb nei tessuti scheletrici ossidativi. Nei pesci ghiaccio si sono verificati 4 eventi mutazionali indipendenti che hanno portato alla perdita di espressione di Mb nel muscolo cardiaco di 6 specie. Trattamenti dei tessuti miocardici di specie che esprimono Mb con NaNO_2 (tossina della Mb) hanno dimostrato una notevole diminuzione dell'attività cardiaca. Per di più, geni codificanti per proteine mioglobina – simili sono espressi in muscoli scheletrici glicolitici, caratteristica assai strana, dato che l'espressione della Mb è confinata ai muscoli di tipo ossidativo.

ADATTAMENTI DEL SISTEMA VASCOLARE

La perdita di Hb e Mb è stata interpretata come evento adattivo all'abbassamento della temperatura e all'aumento dell'ossigenazione delle acque. Dal punto di vista logico l'abbassamento dell'ematocrito comporta una diminuzione della viscosità e quindi un risparmio energetico dell'attività cardiaca. Tuttavia, recenti studi hanno provato l'esatto contrario. L'aumento del volume cardiaco (2 volte superiore a quello di notothenioidi dal sangue rosso), del diametro dei vasi e del volume sanguigno (4 volte superiore nei pesci ghiaccio) ha comportato un aumento del lavoro cardiaco. I pesci ghiaccio consumano il 20% dell'energia prodotta dalla respirazione cellulare in attività cardiaca, valore estremamente alto se comparato con il 0.5% - 5% dei notothenioidi a sangue rosso o di pesci che abitano in acque temperate. I pesci ghiaccio hanno adattato il sistema cardiovascolare per ossigenare al meglio i tessuti: aumento della gittata cardiaca, forza di contrazione ventricolare, riduzione delle resistenze periferiche, aumento del tessuto capillare e miocardio spugnoso.

Particolarmente importante è il ruolo dell'ossido nitrico (NO) nella regolazione delle funzioni vascolari, determinando un effetto vasodilatatorio generalizzato e influenzando così la pressione vascolare e la gittata sistolica. In aggiunta NO può aumentare l'attività del fattore di crescita vascolare (VEGF) la cui azione determina fa sì che nei pesci ghiaccio a livello della retina vi siano capillari particolarmente abbondanti e di ampio diametro. NO agisce inoltre sui mitocondri promuovendone l'aumento di densità ed alterazioni strutturali che implicano un aumento della loro attività; studi sperimentali hanno dimostrato che NO può causare un aumento della densità mitocondriale fino al 36% nei muscoli scheletrici di pesci nei quali mancano Hb e Mb. NO viene sintetizzato da enzimi specifici (NOS) presenti in diverse isoforme: eNOS, nNOS e iNOS. nNOS (neuronal NOS) è espressa in vari tessuti ma i più alti livelli si trovano nel muscolo scheletrico dei pesci ghiaccio; eNOS (endothelial NOS) si localizza nelle cellule dell'endotelio vascolare e nel muscolo cardiaco oltre che a livello epicardico; iNOS (inducibile NOS) si localizza in vari tessuti fra cui il miocardio ventricolare.

STRESS OSSIDATIVO

Alcune specie di pesci ghiaccio (fra cui *C. Aceratus*) sono maggiormente sensibili allo stress ossidativo rispetto ai Notothenoidei a sangue rosso. Uno dei motivi di questa suscettibilità alle varie specie reattive dell'ossigeno (ROS) potrebbe essere rappresentato dalla morfologia e dimensioni dei mitocondri: nei pesci ghiaccio il volume mitocondriale in rapporto al volume cellulare è circa doppio rispetto a specie con sangue rosso. Questo potrebbe portare a una aumentata produzione di ROS e quindi esporre le cellule a un maggiore stress ossidativo. Per limitare il danno ossidativo i pesci ghiaccio hanno potenziato il meccanismo di difesa da ROS aumentando la produzione dei due principali sistemi enzimatici deputati alla loro rimozione: la Superossido dismutasi (SOD) e la NAD(P)H:chinone ossidoriduttasi (NQO). In *C. Aceratus* vi sono 5 geni sod (contro i 3 nei Teleostei): sod1, sod2 e tre copie di sod3 derivate da un meccanismo di duplicazione in tandem avvenuta circa 2,3 Ma. Nei pesci ghiaccio un totale di 33 geni nqo1 contro i 2-10 presenti nella maggior parte delle altre specie: questo aumento è dovuto all'acquisizione di 3 loci addizionali per nqo1 in aggiunta ai 2 già presenti. Nei pesci ghiaccio sono inoltre presenti due copie in tandem di geni (ogg1) per 8-oxoguanina DNA glicosilasi, enzima deputato alla rimozione dal DNA di basi azotate danneggiate da ROS.

CICLO CIRCADIANO

Specie animali che vivono nelle regioni artiche e antartiche sono esposti durante l'anno a grandi variazioni riguardanti la lunghezza del dì e della notte; questo comporta ovviamente grandi variazioni a carico del ritmo circadiano. In queste condizioni la sua regolazione in base alle ore di luce-buio risulta di utilità molto limitata. Questo potrebbe spiegare la perdita di alcuni geni che sono deputati a questa regolazione omeostatica. Nei pesci ghiaccio esistono solo 3 geni cry, il più basso numero fra tutti i Teleostei.

GLICOPROTEINE ANTI-CONGELAMENTO

L'ambiente acquatico estremamente freddo ha portato i pesci ghiaccio a sviluppare sistemi per evitare il congelamento dell'acqua che è costituente fondamentale di tutti i tessuti. Sono state quindi sviluppate specifiche proteine anti-congelamento (AFGP) che sono presenti in tutte le 16 specie di pesci ghiaccio. Le AFGP sono presenti in quasi tutti i liquidi corporei ad eccezione di endolinfa, liquidi oculari e urina. Le AFGP sono presenti negli individui adulti e funzionano abbassando il punto di congelamento dell'acqua attraverso un meccanismo non colligativo di adsorbimento-inibizione. La comparsa di geni per la sintesi di AFGP è avvenuta a partire da geni codificanti per il tripsinogeno mediante un processo evolutivo di duplicazione in tandem che ha portato alla presenza di 11 copie di geni per AFGP adiacenti a 10 copie di geni codificanti per il tripsinogeno.

BIBLIOGRAFIA

- Kim B. et al: Antarctic blackfin icefish genome reveals adaptations to extreme environments
Nat. Ecol. Evol., 2019(3): 469-478
- Sidell BD, O'Brien K: When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes
J. Exp. Biol., 2006: 209, 1791-1802
- I pesci ghiaccio e la storia del sangue
Le Scienze, vol. Aprile 2019
- DeVries A.: The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of antarctic fishes
Comp. Biochem. Physiol., 1988: 90B, 611-621
- DeVries A., Cheng C.: The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the survival of cold-water fishes
Water and Life 1992 Springer Verlag Berlin: 301-315