



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO DI GENETICA E

BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO

XX CICLO

**Sviluppo e validazione di un cDNA *microarray* a scala genomica in
*Mytilus galloprovincialis***

DIRETTORE DELLA SCUOLA: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

SUPERVISORE: Ch.mo Prof. Gerolamo Lanfranchi

CORRELATORE: Dr.ssa Paola Venier

DOTTORANDA: Laura Varotto

INDICE

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE	9
1.1 IL MITILO	9
1.1.1 DISTRIBUZIONE DEL GENERE <i>MYTILUS</i>	9
1.1.2 CARATTERISTICHE MORFO-FUNZIONALI	10
1.1.3 FATTORI AMBIENTALI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA	12
1.1.4 IL MITILO COME ORGANISMO INDICATORE DI QUALITÀ DELLE ACQUE	13
1.1.5 IL GENOMA E I GENI DEL MITILO	17
1.2 CONTAMINANTI POTENZIALMENTE TOSSICI DELLE ACQUE: METALLI E LORO COMPOSTI	20
1.2.1 I MOLLUSCHI BIVALVI E LE ALTERAZIONI INDOTTE DAI METALLI PESANTI	21
1.3 L'AMBIENTE LAGUNARE VENEZIANO	23
1.3.2 INQUINAMENTO NELLA LAGUNA DI VENEZIA E PROGRAMMI DI BIOMONITORAGGIO	24
1.4 ANALISI DEL TRASCRITTOMA	27
1.4.1 I MICOARRAY DI CDNA	29
1.4.2 I MICOARRAY DI OLIGONUCLEOTIDI	31
1.4.3 PIATTAFORME MICROELETTRONICHE (<i>COMBIMATRIX</i>)	31
1.4.4 APPLICAZIONE DEI MICOARRAY IN AMBITO ECOTOSSICOLOGICO	32
2. MATERIALI E METODI	35
2.1 LA COLLEZIONE DI EST DI MITLO	35
2.2 AMPLIFICAZIONE DELLA COLLEZIONE DI CDNA DI MITILO	35
2.3 QUANTIFICAZIONE E PREPARAZIONE DEL CDNA PER LA DEPOSIZIONE SU VETRINO	36
2.4 ORGANIZZAZIONE DEL <i>MYTARRAY 1.0</i>	37
2.5 TRATTAMENTO DEI MITILI CON METALLI PESANTI COMBINATI	37
2.6 VALUTAZIONE DELLA FREQUENZA DI MICRONUCLEI ED ANOMALIE NUCLEARI IN CELLULE BRANCHIALI DI MITILO	38
2.7 CAMPIONAMENTO DEI MITILI NATIVI DELLA LAGUNA DI VENEZIA	39
2.8 ESTRAZIONE, PURIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL' RNA TOTALE	40
2.9 PREPARAZIONE DEI CDNA <i>TARGET</i> MARCATI	41
2.10 IBRIDAZIONE COMPETITIVA SU <i>MYTARRAY 1.0</i>	42
2.11 ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE	43
2.11.1 ACQUISIZIONE ED ANALISI DELL' IMMAGINE	43
2.11.2 NORMALIZZAZIONE DEI VALORI DI ESPRESSIONE	44
2.11.3 ANALISI DI RAGGRUPPAMENTO GERARCHICO (<i>CLUSTERING</i>)	45
2.12 IDENTIFICAZIONE DEI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI	45
2.12.1 SAM (<i>SIGNIFICANCE ANALYSIS OF MICROARRAY</i>)	46
2.12.2 RANK PRODUCT	46
2.13 CATEGORIZZAZIONE FUNZIONALE	48
2.14 VALIDAZIONE DEI DATI DI ESPRESSIONE CON Q RT-PCR	49
2.15 REALIZZAZIONE DI LIBRERIE PRIMARIE E DI UNA LIBRERIA NORMALIZZATA DA TESSUTI DI MITILI STRESSATI	51
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	53
3.1 PRIMA VALIDAZIONE SPERIMENTALE DEL CDNA <i>MICROARRAY</i> DI MITILO	53
3.2 AMPLIFICAZIONE DELLA COLLEZIONE DI 3' CDNA DI <i>MYTILUS GALLOPROVIALIS</i>	55

3.3 ALTERAZIONI TRASCRIZIONALI E DANNO GENOTOSSICO DA METALLI PESANTI IN MITILO	55
3.3.1 MICRONUCLEI E ANOMALIE NUCLEARI NEI MITILI TRATTATI CON METALLI PESANTI	56
3.3.2 PROFILI TRASCRIZIONALI DEI MITILI TRATTATI CON METALLI PESANTI	58
3.3.3 VALIDAZIONE CON QRT-PCR DI GENI SOVRAESPRESSI IN MITILI TRATTATI CON METALLI PESANTI	67
3.4 PROFILI TRASCRIZIONALI DI MITILI DELLA LAGUNA DI VENEZIA	70
3.4.1 CAMPIONAMENTO DEI MITILI LAGUNARI	71
3.4.2 DISEGNO SPERIMENTALE	72
3.4.3 PROFILI DI ESPRESSIONE DI SINGOLI MITILI (2005)	72
3.4.4 PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA DA CAMPIONI <i>POOL</i> (N=5, 2005, 2006, 2007)	75
3.4.5 IDENTIFICAZIONE DEI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI	77
3.4.6 CATEGORIZZAZIONE FUNZIONALE DEI TRASCRITTI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI NEI MITILI LAGUNARI	80
3.5 LIBRERIE DI MITILI STRESSATI, SEQUENZIAMENTO E NUOVO <i>OLIGOARRAY</i>	85
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	86
BIBLIOGRAFIA	87
PUBBLICAZIONI DEL DOTTORANDO	99
PARTECIPAZIONI A CONGRESSO	99

RIASSUNTO

I bivalvi marini del genere *Mytilus* sono organismi filtratori comunemente utilizzati come biosensori della qualità dell'ambiente costiero. Infatti, i mitili bioaccumulano sia inquinanti organici sia metalli pesanti, e rispondono alle alterazioni indotte con caratteristici meccanismi fisiologici e genetici. Tuttavia, uno dei limiti nell'utilizzare il mitilo come bioindicatore è dato dalla scarsa caratterizzazione dei suoi meccanismi funzionali e di difesa. I biomarcatori tradizionali non sono sufficienti a comprendere i meccanismi fisiologici o gli effetti indotti da stress in mitilo e le conoscenze sulla struttura, sulla funzione e sull'evoluzione del suo genoma sono ancora frammentarie. Per incrementare le informazioni sui processi fisiologici e comprendere meglio i meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nella risposta agli stress, si è reso necessario applicare un approccio di tipo genomico.

Sulla base della produzione e del sequenziamento sistematico di una libreria 3'ESTs dei principali tessuti di mitilo, in collaborazione con il C.R.I.B.I., Università di Padova, è stata depositata su vetrino la prima collezione di 1714 trascritti selezionati, realizzando il *MytArray* 1.0.

Per poter utilizzare tale piattaforma, realizzata nel 2003, è stato necessario riamplicare la collezione fisica di cloni batterici ricombinati. Quindi sono stati preparati nuovi *microarray* e su cui condurre gli esperimenti di ibridazione competitiva.

La potenzialità di questo nuovo strumento è stata valutata analizzando l'alterazione trascrizionale in mitili esposti in condizioni controllate di laboratorio ad una miscela di metalli tossici e genotossici e nel loro ambiente naturale (Laguna di Venezia).

Tra i contaminati potenzialmente tossici, è noto che i metalli pesanti possono danneggiare i componenti cellulari, interferire con i meccanismi di segnalazione cellulare e alterare l'espressione di molti geni. Dopo esperimenti di ibridazione competitiva su *MytArray* 1.0, si sono osservate alterazioni di espressione genica in branchie ed in ghiandola digestiva di mitili trattati con dosi crescenti di una miscela di metalli pesanti (Cd, Cu, Hg). Questi risultati erano informativi ed in accordo con l'aumento del danno cromosomico misurato nelle cellule branchiali degli stessi mitili (valutato come incremento di micronuclei e altre anomalie nucleari). Le variazioni trascrizionali osservate mostravano un andamento dose-dipendenti e, tra i trascritti differenzialmente espressi in modo significativo, sono emersi trascritti coinvolti nei processi di: omeostasi degli ioni (metallothioneina 10IV, ferritina), protein turnover (sequestosoma 1 e diverse subunità del proteasoma), *chaperones* (*hsp70*, *hsp90*, *shsp24*), regolazione dell'apoptosi e indotti da danno al DNA (*gadd45*, *apoptosis inhibitor 2*), motilità e adesione

cellulare. Le successive *real time*-PCR condotte hanno convalidato questi risultati.

Per valutare le potenzialità del *microarray* di mitilo in ambiente, ho analizzato i profili trascrizionali della ghiandola digestiva di mitili native della laguna di Venezia. Questa laguna ha caratteristiche peculiari e concentrazioni significative di cadmio, mercurio, PAHs, PCBs e diossine vengono costantemente rilevate nell'area industriale di Porto Marghera.

Per tre anni successivi (2005, 2006, 2007) sono stati campionati all'inizio dell'estate mitili nativi da zone con a diverso grado di inquinamento: dai canali dell'area industriali e dalla bocca di porto di Lido, area relativamente pulita. Mitili di un allevamento di mare aperto sono stati utilizzati come controllo. Ho condotto esperimenti di ibridazione competitiva sulla ghiandola digestiva ed i geni differenzialmente espressi individuati sono stati suddivisi in categorie funzionali.

Le analisi *microarray* condotte su singoli individui hanno dimostrato che i profili trascrizionali dei mitili prelevati dai canali industriali sono simili tra loro e chiaramente diversi da quelli dei siti meno inquinati. Anche i dati chimici sulla polpa del mitilo hanno mostrato le stesse tendenze.

Il numero delle repliche biologiche e l'analisi su singolo individuo aumentano di molto i tempi di lavoro, ma quanto è il contributo della variabilità inter-individuale su studi di questo tipo? Per provare a rispondere a questa domanda, ho condotto nuovi esperimenti di ibridazione usando gli stessi mitili riuniti in *pool*. Il raggruppamento gerarchico è lo stesso di quello ottenuto dalle analisi individuali ed i valori di espressione del *pool* sono assimilabili alla media dei valori individuali. Tuttavia dall'analisi *pool* emergono solo i trascritti con valori significativamente alterati. Sebbene, quindi l'analisi di gruppo appiattisca la variabilità inter-individuale essa produce un profilo ancora rappresentativo del sito considerato ed è in grado di far emergere comunque trascritti per i quali la variazione trascrizionale è statisticamente robusta.

Infine ho contribuito alla purificazione dei campioni di RNA che hanno generato nuove librerie primarie e una libreria normalizzata da mitili trattati con contaminanti chimici e biologici, allo scopo di ampliare la collezione di trascritti e comprendere meglio le risposte trascrizionali in mitilo (lavoro in collaborazione con C.R.I.B.I e UniTrieste). Il sequenziamento sistematico di tali librerie l'individuazione di più di 7000 *cluster* e relativi consensi. Queste sequenze e le relative informazioni sono in via organizzazione per la realizzazione del primo database di sequenze *Mytilus galloprovincialis*.

ABSTRACT

Marine bivalves of the genus *Mytilus* are intertidal filter-feeders commonly used as biosensors of coastal pollution. Indeed, mussels readily bioaccumulate both organic and metal pollutants, and react to changes with physiological and genetic mechanisms. However, one main problem in using mussels as bio-sensors is the poor characterization of their functional and defence reactions. The currently used biomarkers provide insufficient understanding of mussel physiology status or stressor-induced effects, and knowledge of mussel genome structure, function and evolution are still lacking. Therefore, genomic approaches are needed to increase our knowledge of physiological processes and to better understanding molecular and cellular mechanisms involved in the stress responses.

Based on the production and massive sequencing of 3'ESTs library from main mussel tissues, we arrayed, in collaboration of C.R.I.B.I., University of Padova, the first collection of selected transcript 1714 tags on glass slides as *MytArray* 1.0. In order to use this molecular platform defined in 2003, it has been necessary to refresh the physical collection of the bacterial clones bearing cDNA inserts in recombinant plasmids. Then, microarrays have been spotted and hybridisation experiments realized.

The potential use of this novel tool was evaluated by analyzing gene expression changes in mussels exposed to mixture of toxic and genotoxic metals in laboratory and in their natural environment (Venice lagoon, Italy).

Among the potential toxic contaminants, heavy metals can damage cell components, disturb cell signalling and are expected to modulate the expression of many genes. After competitive ibridisation experiments on *MytArray* 1.0, we found gene expression changes in gill and digestive gland in mussels treated with increasing micromolar doses of a metal mixture (Cd, Cu, Hg). Results appear instructive and consistent with the enhance of chromosomal damage in gill cells of same mussels (evaluated as increases of micronuclei and other nuclear abnormalities). The transcriptional changes raised in dose-dependent manner and transcripts showing consistent expression trends revealed the complexity of the induced cellular response, with the most evident changes referring to: ion homeostasis (i.e metallothionein 10IV isoform, ferritin), protein turnover (sequestosome 1 and proteasome subunits) and chaperones (hsp70, hsp90, shsp24), regulation of apoptosis and DNA damage-inducible transcripts (*gadd45*, apoptosis inhibitor 2), cell motility and adhesion. The subsequent real-time PCR performed supports further these results.

To assess the potential use of the mussel microarray in environment, I evaluated the transcriptional digestive gland profiles of mussels living in the Venice lagoon. Venice lagoon is a unique case and significant concentrations of cadmium, mercury, PAHs, PCBs and dioxin-like compounds are recurrently detected in the

industrial area near the town. Native mussels were sampled in the early summer in 2005, 2006, 2007, from zones affected differently by chemical pollution: from industrial district channels and from Lido lagoon inlet relatively uncontaminated. Offshore mussel farm, was chosen as a source of reference. I performed the competitive hybridisation experiments on DG samples and detected differentially expressed genes are grouped into different functional categories.

In mussels of the industrial canals (Marghera, Venice) microarray analysis performed on individual mussels indicated a general profile similarity which make them distinguishable from mussels living in less polluted sites. Chemical data support this work hypothesis.

The number of biological replicates influence the study size but, how much the individual variability can influence our studies? To try to answer to this question, I performed new hybridisation experiments by using the pool from the same samples.

The overall clustering of transcriptional profiles can be compared with data already obtained from individual mussel tissues even though only transcripts with significant expression values are found.

In all three years, the suggestive presence of gene markers, tracing organic contaminants and heavy metals in mussels from the industrial district is consistent with reported trends of chemical contamination.

Finally, I contributed to the preparation of samples generating new primary cDNA libraries and a unique normalized library from mussels treated with with chemical and biological contaminants in order to enlarge the transcript collection and better understanding transcriptional mussel responses (work in collaboration with C.R.I.B.I and UniTrieste). Massive sequencing of the primary and normalized libraries yielded positive results and information obtained are going to be organized in the first intergrated *Mytilus* database.

INTRODUZIONE

1.1 IL MITILO

1.1.1 DISTRIBUZIONE DEL GENERE *MYTILUS*

I bivalvi del genere *Mytilus* sono molluschi filtratori marini che vivono in fitte comunità aderendo a substrati duri. Considerandone particolarità morfologiche ed enzimatiche si distinguono quattro specie principali: *Mytilus edulis* (Linneo, 1758), *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), *Mytilus californianus* (Conrad, 1837) e *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) per le quali è stata tracciata una mappa della distribuzione geografica (fig.1).

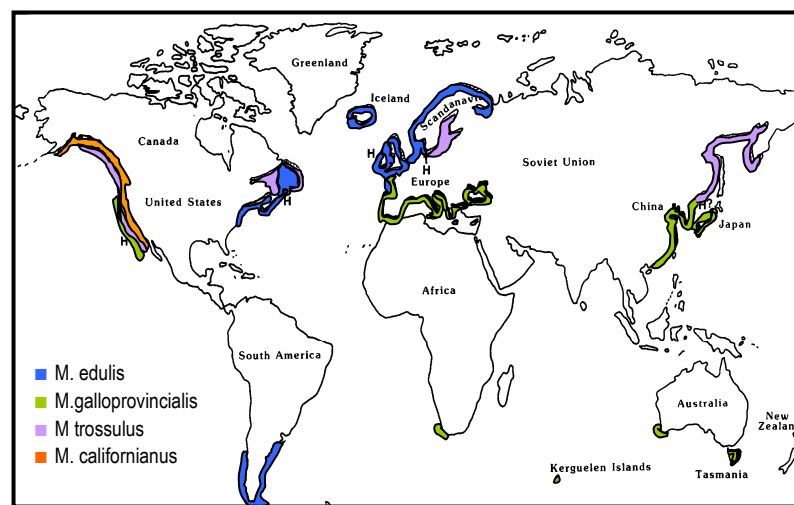


Figura 1. Distribuzione mondiale di quattro ecotipi di *Mytilus* (modificata da Gosling, 1992).

M. edulis (Linneo, 1758) è presente a latitudini temperate e fredde, sia nell'emisfero nord che in quello sud, indicando una buona tolleranza anche alle temperature rigide.

M. galloprovincialis (Lamarck, 1819) è presente a latitudini temperate in entrambi gli emisferi, ma le sue zone di distribuzione comprendono anche acque più calde, come quelle del Mar Mediterraneo.

M. trossulus (Gould, 1850) e *M. californianus* (Conrad, 1837) sono presenti solo nell'emisfero nord, in un'area più ristretta ma continua, lungo un intervallo latitudinale di circa trenta gradi.

In generale, l'ampia distribuzione del genere *Mytilus* e la possibilità di scambio genico o di ibridazione sono direttamente collegati alla dispersione che avviene durante lo stadio larvale planctonico (Lutz e Kennish, 1992).

È noto che popolazioni simpatriche di *M. edulis*, *M. galloprovincialis* e *M. trossulus* possono ibridare e gli individui risultare morfologicamente meno distinguibili (Gilg e Hilbish, 2003; Riginos e Cunningham, 2005). Inoltre, le caratteristiche morfologiche della conchiglia, su cui per molti anni si è basata la

sistematica del genere *Mytilus*, mostrano plasticità fenotipica e sembrano influenzate da fattori come età, densità della popolazione e tipo di *habitat*.

La mancanza di un singolo marcatore morfologico o elettroforetico che permetta di collocare in modo univoco un determinato mitilo in un particolare *taxon* e il riscontro di zone di ibridazione possono indurre a considerare i vari gruppi sopra citati come ecotipi del genere *Mytilus* (Gosling, 1992). In realtà, le caratteristiche attuali di questo complesso di specie derivano da una varietà di processi che includono isolamento post-zigotico, coevoluzione, selezione direzionale e introgressione genetica (Bierne *et al.*, 2006).

1.1.2 CARATTERISTICHE MORFO-FUNZIONALI

Il mitilo è un mollusco dotato di un rivestimento esterno rigido e protettivo: una conchiglia composta di due valve convesse, articolate dorsalmente fra loro, e unite da una fascia proteica elastica non calcificata, detta legamento della cerniera e dai muscoli adduttori anteriore e posteriore. Questi agiscono in antagonismo con il legamento e, contraendosi, determinano la chiusura delle valve anche per lunghi periodi di tempo. I mitili sono dotati di un appendice muscolosa, il piede che consente loro di sondare la superficie su cui si trovano ed effettuare piccoli spostamenti (fig. 2).



Figura 2. Mitilo con piede estroflesso (da Lindner, 1999).

Da un incavo sul lato ventrale del piede viene rilasciata una secrezione viscosa che a contatto con l'acqua solidifica. Essa darà origine ai filamenti del bisso, costituiti da collagene e da particolari proteine di adesione che permettono al mitilo di aderire efficacemente a substrati duri (Sun *et al.*, 2002).

Il mantello è sostanzialmente una lamina di tessuto connettivo, aderente alla superficie interna delle valve e fissato alla regione dorsale, che racchiude tutta la massa viscerale. Presenta un'ampia apertura inalante attraverso cui entra l'acqua e un orificio esalante da cui la espelle dopo aver captato l'ossigeno disciolto in essa e particelle alimentari (Mengoli, 1998).

Le branchie o ctenidi sono composte da due emibranchie, ognuna delle quali presenta a sua volta due lamelle, una ascendente e una discendente, tenute assieme

da giunzioni connettivali (forma a W). Le lamelle branchiali sono rivestite da un epitelio ciliato riccamente vascolarizzato che favorisce la corretta circolazione dell'acqua e che è importante sia per la filtrazione sia per gli scambi respiratori. Le particelle in sospensione nell'acqua vengono trattenute dalle ciglia e convogliate, tramite battito ciliare lungo un solco branchiale, verso i palpi labiali e alla bocca. Da lì, le particelle giungono nello stomaco dotato di sacco dello stilo e, al suo interno, dello stilo cristallino, dove sono racchiusi enzimi digestivi come amilasi, lipasi e cellulasi. Le particelle alimentari parzialmente digerite vengono convogliate alla ghiandola digestiva, che consiste in una serie di diverticoli comunicanti con lo stomaco. Infine, il materiale digerito viene convogliato nell'intestino fino a sboccare, tramite l'ano nella cavità palleale in prossimità della corrente esalante.

L'apparato escretore consta di due nefridi di tipo metanefridiale, collocati sotto la cavità pericardica. I prodotti del catabolismo proteico sono rappresentati principalmente da ammoniaca e urea.

L'apparato circolatorio è costituito da un sistema aperto a circolazione incompleta e mista. Posto dorsalmente, il cuore è composto da un ventricolo, il principale propulsore dell'emolinfa, e da due atri.

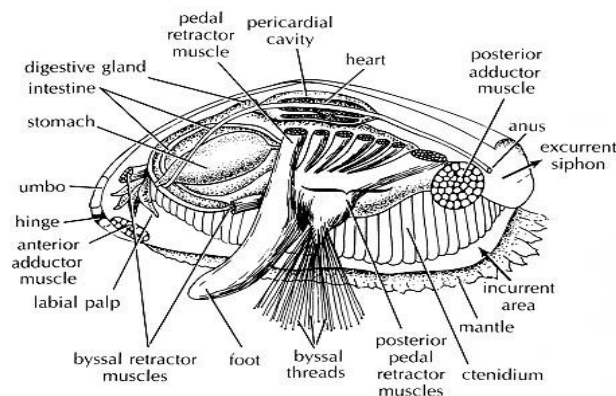


Figura 3. Organizzazione interna di un generico mitilo (da <http://www.manandmollusc.net>).

I mitili presentano generalmente sessi separati. Le gonadi sono costituite da tessuto ghiandolare che si insinua tra gli organi digestivi e nel mantello. I gameti in maturazione si raccolgono in dotti e sono rilasciati esternamente a livello di follicoli genitali. La fecondazione è esterna, anche se talvolta può avvenire all'interno della cavità palleale delle femmine.

I tempi che scandiscono il ciclo riproduttivo variano a seconda delle zone geografiche. Nell'area dell'Alto Adriatico le gonadi sono mature tra settembre ed ottobre e l'emissione dei gameti avviene per tutto l'inverno fino a primavera con vari picchi, ed è particolarmente evidente a febbraio-marzo. Durante il periodo estivo, il mitilo accumula riserve di nutrienti per periodi successivi di grande richiesta energetica.

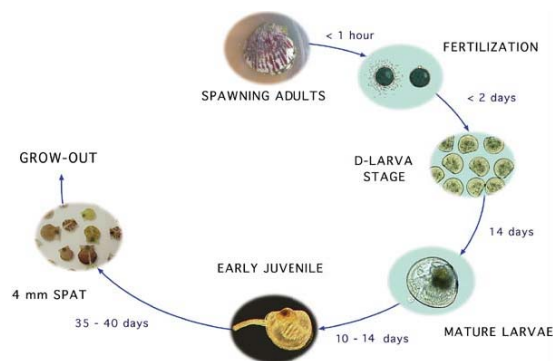


Figura 4. Sviluppo vitale di un bivalve (www.fao.org).

Ogni emissione contiene dai 5 ai 12 milioni di gameti, una quantità così elevata da limitare la decimazione dovuta ai predatori. Dall'ovocita fecondato si sviluppa il primo stadio larvale, larva trocofora che possiede una fascia centrale ed una cresta terminale di ciglia. Dopo alcuni giorni la trocofora si trasforma nella larva veliger riconoscibile per la disposizione a vela delle ciglia; la fase larvale pelagica garantisce la colonizzazione di nuove zone e il flusso genico (Gilg e Hilbish, 2003). In circa cinque settimane la larva raggiunge una grandezza di circa 5 mm e diventa un giovane mitilo (fig. 4). Dopo questa metamorfosi esso aderisce a substrati duri con i filamenti di bisso, probabilmente in risposta alla presenza di un biofilm superficiale (Bao *et al.*, 2007) e, dopo alcune settimane, raddoppia le sue dimensioni e diventa un mitilo adulto.

1.1.3 FATTORI AMBIENTALI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA

L'accrescimento del mitilo è stato ampiamente studiato sia per l'importanza ecologica sia per la sua rilevanza come specie edule.

È noto che la temperatura di crescita per *M. edulis* è compresa tra i 5-20 °C. Oltre queste temperature la crescita declina nettamente ma entro questo intervallo non si notano variazioni macroscopiche delle condizioni dell'organismo che, complessivamente, mostra buona capacità di adattamento alle fluttuazioni stagionali (Almada-Villela *et al.*, 1982).

I mitili si accrescono anche in acque salmastre e lagunari, dove ci siano abbondanza di nutrienti e parametri fisico-chimici compatibili. Una significativa riduzione della salinità può per esempio essere causa di alterazioni fenotipiche e provocare la morte di organismi già debilitati (Almada-Villela, 1984).

Misurando parametri biochimici e fisiologici, Nesto *et al.*, 2003 hanno dimostrato che temperatura e la salinità influenzano il tasso di sopravvivenza all'aria di mitili provenienti da aree diverse dell'ambiente lagunare veneziano, il distretto industriale ed una zona relativamente pulita. In condizioni sfavorevoli, la più immediata risposta difensiva del mitilo consiste nella chiusura delle valve così da

isolarsi dall'ambiente esterno; in conseguenza di ciò aumenta la concentrazione osmotica del fluido del mantello e viene meno l'apporto nutritivo (Aunaas *et al.*, 1988).

Il fattore che contribuisce maggiormente all'accrescimento sembra essere la disponibilità di cibo, in quanto fonte primaria di energia. I mitili sono organismi filtratori che trattengono un particolato di dimensioni inferiori a 2-3 μm con un'efficienza dell'80-100% (Møhlenberg e Riisgard, 1977). Il materiale presente in sospensione è costituito da batteri, fitoplancton, detriti organici e residui di origine inorganica, e varia comunque a seconda della regione e della stagione. In condizioni di emersione durante la bassa marea, i mitili non riescono a nutrirsi adeguatamente ma ripristinano poi rapidamente le normali condizioni di metabolismo e di accrescimento.

Tra i fattori che influenzano negativamente la crescita dei mitili vi è la prolungata esposizione alla luce, la presenza di forti onde e la competizione intraspecifica per il cibo e lo spazio che si riscontra in popolazioni eccessivamente affollate (Gosling, 1992). L'indebolimento del mitilo e l'incremento della mortalità sono inoltre influenzate dalla presenza di predatori, parassiti, patogeni e competitori naturali. Tra questi, si ritiene che la classe dei trematodi sia la più offensiva: essi sfruttano l'organismo come ospite primario alterandone il ciclo riproduttivo e bloccando la gametogenesi (Coustau *et al.*, 1990). Comune infestante dei mitili, spesso in coincidenza di condizioni ambientali sfavorevoli, è il copepode *Mytilicola intestinalis* che si insedia a livello dell'intestino riducendo l'assimilazione di nutrimenti da parte dell'ospite (Rayyan *et al.*, 2004). Benché più infestante in altri bivalvi (Boscolo e Giovanardi, 2002) il polichete *Polydora ciliata* può colpire anche il mitilo. Esso agisce scavando dei piccoli solchi nella conchiglia, coprendoli di fango e indebolendone la struttura.

1.1.4. IL MITILO COME ORGANISMO INDICATORE DI QUALITÀ DELLE ACQUE

Lo sviluppo di attività produttive, la strutturazione del territorio e lo sfruttamento delle risorse naturali hanno causato un progressivo deterioramento dell'ambiente in cui l'uomo vive e, in particolare, l'inquinamento degli ecosistemi marini costieri. Le aree litorali vengono raggiunte da una pluralità di sostanze contaminanti di origine mineraria, industriale e agricola, ma anche da innumerevoli rifiuti di origine urbana. Una parte dei contaminanti che raggiungono il mare risultano biodisponibili e possono accumularsi lungo la catena trofica, minacciando non solo la salute degli organismi marini, ma anche quella dell'uomo che se ne ciba. I contaminanti xenobiotici, oltre ad influenzare la sopravvivenza di singoli organismi, possono avere effetti a lungo termine sull'ecosistema, modificandone la struttura e la diversità a vari livelli: abbondanza e numero di specie, corredo genetico, variabilità individuale (Bickham *et al.*,

2000). Tra i principali contaminanti potenzialmente dannosi per l'uomo e per l'ambiente ritroviamo idrocarburi policiclici aromatici (IPA) come tali e sostituiti, bifenili policlorurati (PCB), diossine e furani policlorurati (TCDD/F), metalli e metalloidi. Benché ci siano studi che suggeriscono ipotesi causali tra inquinamento e danno indotto negli organismi (Vasseur e Cossu-Leguille, 2006), gli effetti biologici a breve e lungo termine non sono facilmente prevedibili e, anche per singoli contaminanti, poco indagati. Di conseguenza, il rischio ecologico e sanitario associato all'esposizione dei mitili a contaminanti tossici risulta generalmente difficile da stimare.

Da queste considerazioni emerge un crescente bisogno di sviluppare metodi che consentano l'identificazione, la valutazione e la gestione dei rischi causati da specifiche tipologie di contaminanti ambientali.

Una tale valutazione non può basarsi solo su analisi chimiche effettuate su campioni d'acqua, d'aria o di sedimento, poiché tale approccio non fornisce alcuna informazione diretta sui possibili effetti biologici. Per di più, il numero di composti chimici ad ampio volume di produzione e quello dei composti di nuova sintesi è così vasto da rendere inefficace il loro controllo mediante analisi chimica. La possibilità d'interazione e di sinergie tra xenobiotici rende oltretutto poco significativa una stima del rischio basata sulla quantificazione dei singoli componenti. Una possibile risposta a questi problemi è data dal biomonitoraggio, ovvero lo studio di parametri marcatori di avvenuta esposizione agli inquinanti in organismi selezionati (organismi bioindicatori o specie sentinella) (Bresler *et al.*, 2003; Cajaraville *et al.*, 2000). Il biomonitoraggio contribuisce all'individuazione di casi reali di esposizione, alla costruzione di ipotesi causa-effetto e alla valutazione del rischio per l'uomo e per l'ecosistema.

Prerequisiti fondamentali affinché una specie possa essere utilizzata come specie bioindicatore sono: l'ampia diffusione geografica, la facilità di raccolta, lo stato sedentario o sessile, abitudini alimentari preferibilmente di tipo filtratorio e la conoscenza del ciclo biologico. Un'altra caratteristica importante per un organismo sentinella è la mancanza di meccanismi biochimici o fisiologici in grado di regolare le concentrazioni tissutali dei contaminanti. Solo così, le concentrazioni tissutali dei contaminanti possono riflettere le concentrazioni misurate nell'ambiente circostante.

Nel 1975, venne proposto da Goldberg il *Mussel Watch*, un programma di biomonitoraggio basato sull'analisi di quattro tipi di inquinanti marini nella polpa di mitili naturalmente esposti ad essi (Goldberg, 1975; Goldberg e Bertine, 2000). Nel corso degli anni, la pratica del *Mussel Watching* è andata consolidandosi ed è stata ulteriormente sviluppata (Dagnino *et al.*, 2007).

Ancora oggi, infatti, il mitilo è uno degli organismi più utilizzati nella sorveglianza dall'ambiente marino costiero anche grazie alla messa a punto di

metodi per valutare alterazioni funzionali indotte in tempi brevi da contaminanti tossici (Damiens *et al.*, 2007; Kucuksezgin *et al.*, 2007; Vlahogianni *et al.*, 2007). In mitilo vengono abitualmente misurate alcune tipiche alterazioni funzionali correlabili a condizioni di stress e, soprattutto, all'esposizione all'inquinamento chimico, richiamate qui di seguito.

Vengono valutati indici fisiologici quali lo *Scope For Growth*, una misura complessiva della condizione fisiologica dell'animale (Mubiana e Blust, 2006) e l'indice di sopravvivenza in aria, che consiste nel valutare il tempo di sopravvivenza dei mitili fuori dall'acqua. Esso solitamente diminuisce per organismi provenienti da zone inquinate, poiché lo stress naturale dell'esposizione all'aria va ad aggravare una condizione di stress precedente, dovuta agli agenti inquinanti (Koukouzika e Dimitriadis, 2005; Hellou e Law, 2003).

A livello subcellulare, viene valutata l'alterazione della stabilità delle membrane lisosomiali. I lisosomi sono il principale sito di digestione intracellulare e contribuiscono alla detossificazione sequestrando gli xenobiotici. Accumulandosi nei lisosomi, molecole contaminanti possono alterarne struttura e funzione, causando così ulteriori danni cellulari (Domouhtsidou e Dimitriadis, 2000). Le reazioni patologiche dei lisosomi consistono in cambiamenti destabilizzanti della membrana, induzione di autofagia e relative variazioni morfo-funzionali, processi ampiamente studiati come indicatori di esposizione (ed effetto) a contaminanti ambientali biodisponibili. Il rigonfiamento dei lisosomi è anche il risultato dell'accumulo di granuli di lipofuscina derivanti dall'aggregazione di proteine danneggiate e da organelli degradati. Brunk e Terman, 2002 hanno dimostrato che la lipofuscina è in grado di legarsi all'atomo di ferro, generando ROS (specie reattive dell'ossigeno) ed aggravando il danno ossidativo.

A livello molecolare, l'esposizione a metalli tossici può render evidente un aumento di espressione di metallotioneine (MT), proteine a basso peso molecolare rilevabili in citoplasma, nucleo e lisosomi. L'elevato contenuto di residui tiolici, dovuto all'abbondanza di cisteine, conferisce a queste proteine un'elevata affinità per i cationi metallici divalenti. Esse hanno un ruolo essenziale per l'omeostasi di ioni metallici essenziali come Cu e Zn e nel sequestro di metalli tossici come Cd e Hg e di specie reattive dell'ossigeno. In questo modo esse prevengono eventuali effetti citotossici dovuti ad un'eccessiva concentrazione intracellulare di metalli (Cajaraville *et al.*, 2000). Il ruolo primario che queste proteine adempiono in quasi ogni organismo è confermato dall'abbondanza di isoforme, sia costitutive che inducibili, ritrovate in ogni tipo di cellula; ciò suggerisce uno specifico ruolo per ogni isoforma, dipendente dalle caratteristiche strutturali e funzionali. Le due principali isoforme identificate e sequenziate in *Mytilus galloprovincialis* sono MT-10, monomero di 10 kDa, ed MT-20, dimero di 20 kDa (Banni *et al.*, 2007). L'elevata similarità nella regione non tradotta suggerisce che queste possano essersi originate da un recente evento di duplicazione genica nella specie. Sebbene

siano state molto studiate, il meccanismo molecolare di regolazione delle metallotioneine non è ancora ben delineato. L'induzione della trascrizione di MT è stata documentata dopo un trattamento di esposizione ai metalli, ma anche stress ossidativi, *shock* termici ed ormoni le possono indurre con profili di espressione specifici. Rimangono da chiarire le caratteristiche strutturali che rendono una determinata isoforma più responsiva ad uno stimolo rispetto ad un altro (Vergani *et al.*, 2007).

Varie isoforme del citocromo P450 giocano un ruolo fondamentale nella biotrasformazione dei contaminanti quali idrocarburi policiclici aromatici (IPA), amine aromatiche ed altri, alcuni dei quali noti come mutageni e cancerogeni. L'induzione di citocromo P450 è innescata dal legame di diossine, IPA e composti chimicamente affini ad essi al recettore citosolico *aryl hydrocarbon receptor* (AHR) (Yuan *et al.*, 2006; Rivera *et al.*, 2007). Tuttavia negli invertebrati l'attività di tali enzimi è più difficile da dimostrare e misurare rispetto ai vertebrati. In particolare, nei mitili la presenza di specifiche isoforme del citocromo P450 e la loro inducibilità è tutt'ora materia controversa (Balaam e Thomas, 2007).

L'induzione di danno genetico, misurato come una maggior frequenza di micronuclei (MN) e di altre alterazioni nucleari in cellule branchiali ed emociti di mitilo è considerato indicativa dell'esposizione a contaminanti genotossici, capaci di alterare la struttura dei cromosomi o la loro migrazione durante la divisione cellulare. Allo stesso modo, gli addotti al DNA, potenzialmente molto dannosi per la cellula, possono formarsi per legame covalente di certi xenobiotici come tali o di intermedi elettrofili derivanti da trasformazione metabolica (Koukouzika e Dimitriadis, 2005; Venier e Zampieron, 2005; Nigro *et al.*, 2006).

Anche gli studi effettuati in condizioni controllate di laboratorio possono facilitare l'identificazione di contaminanti chimici ambientali, la caratterizzazione dei processi molecolari che si instaurano dopo l'esposizione e la delucidazione delle relazioni dose-risposta.

Processi molecolari e cellulari ancora sostanzialmente da indagare in mitilo ed altri bivalvi, come ulteriori marcatori di risposta a vari tipi di stress, sono quelli riconducibili alle risposte immuni cellulari ed umorali. La comprensione di tali processi può contribuire infatti a capire gli effetti tossici dei contaminanti ed a stabilire nuovi parametri di biomonitoraggio (Auffret *et al.*, 2006; Akaishi *et al.*, 2007; Ordas *et al.*, 2007).

1.1.5 IL GENOMA E I GENI DEL MITILO

Nonostante l'importanza ampiamente riconosciuta degli organismi bivalvi come componenti fondamentali del benthos marino costiero, come risorsa economica e come organismi sentinella, gli studi di biologia molecolare risultano essere ancora frammentari e le informazioni genetiche insufficienti. In particolare, sono ancora estremamente limitate le conoscenze sui loro geni e sulle funzioni da essi codificate.

Il contenuto di DNA del genoma dei bivalvi (valore C: 0.65-5.4 pg, Gregory, 2005) è confrontabile con quello di altri organismi modello il cui genoma è stato completamente sequenziato (fig. 5).

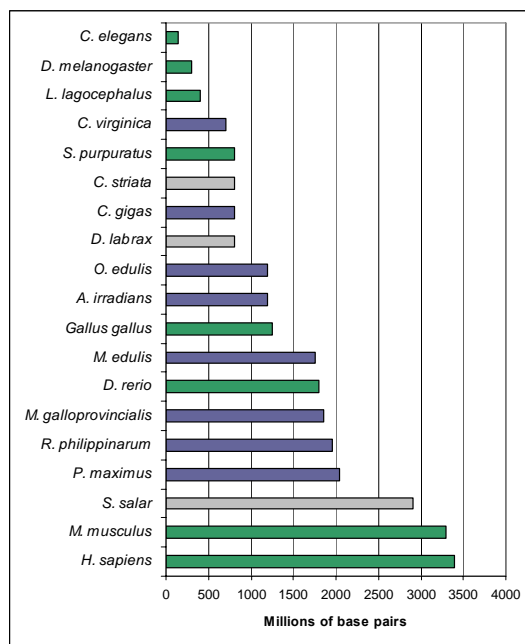


Figura 5. Confronto delle dimensioni del genoma di alcuni bivalvi (in blu) con altri organismi marini (grigio) e organismi completamente sequenziati (verde). (Modificato da Saavedra e Bachère, 2006).

A dicembre 2007, presso NCBI *Entrez taxonomy*, risultavano depositate per *Mytilidae* 37026 sequenze nucleotidiche, delle quali solamente 6071 sono di *M. galloprovincialis*. Questo dato è esiguo se confrontato con le sequenze disponibili per altre specie di invertebrati acquatici come, ad esempio *Crassostrea gigas*, 22949 sequenze, *Carcinus maenas*, 15657, o con altri invertebrati marini il cui genoma è stato completamente sequenziato (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Aplysia californica*).

Fino a pochi anni fa le sequenze geniche conosciute nei bivalvi erano limitate a pochi marcatori comunemente impiegati nei programmi di biomonitoraggio o negli studi di genetica di popolazione.

Le informazioni maggiormente disponibili sono riferite al genoma mitocondriale ed a geni ribosomali (Steiner e Müller, 1996), soprattutto per la loro utilità come strumento negli studi filogenetici. Alcuni gruppi di bivalvi (*Mytilidae*, *Unionidae*, *Veneridae*), inoltre, hanno una peculiare caratteristica che stimola l'interesse

scientifico: presentano due tipi di DNA mitocondriale, F e M, trasmesso tramite un particolare meccanismo detto “doppia eredità uniparentale (*doubly uniparental inheritance*, DUI) (Skibinski *et al.*, 1994; Kouros, 2001), le cui basi molecolari sono ancora da chiarire. Al momento, sono stati completamente sequenziati i genomi mitocondriali F e M di *M. galloprovincialis*, *R. philippinarum* e *I. japonensis*, ed il mtDNA F di *M. edulis*, *L. ornata* e *C. gigas*.

Come spiegato in precedenza, i bivalvi, e soprattutto i mitili, sono ampiamente utilizzati per monitorare i cambiamenti ambientali, particolarmente in relazione alla presenza di contaminanti. Questo spiega la disponibilità delle sequenze di certi geni coinvolti nella risposta allo stress e agli inquinanti (Barsyte *et al.*, 1999; Yang H.L. *et al.*, 2004).

Esistono informazioni di sequenza anche su geni che svolgono funzioni tipiche dei bivalvi; ad esempio, quelli per le proteine del bisso (Waite e Quin, 2001), la cui comprensione può essere utile per la realizzazione di cementi naturali o di vernici antivegetative, e quelli coinvolti nella formazione della conchiglia (Zhang Y. *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Sono anche stati studiati geni che codificano per proteine coinvolte nella respirazione (Kimura *et al.*, 2005), nella produzione di energia (Suzuki *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2004), nel metabolismo del calcio (Dubos *et al.*, 2003), nella digestione (Xu *et al.*, 2001), nella contrazione muscolare (Funabara *et al.*, 2001), nello sviluppo (Barucca *et al.*, 2003), nel *turnover* proteico (Donald *et al.*, 2001), ed altri, codificanti per proteine strutturali (Carlos *et al.*, 1993).

Nella frazione non-codificante del genoma dei bivalvi sono state identificate sequenze di DNA ripetuto (DNA satellite e sequenze ripetute sparse), comuni in questi organismi (Hedgecock *et al.*, 2005; Saavedra e Bachère, 2006).

Negli ultimi anni stiamo assistendo ad un notevole incremento dell’interesse per molte specie di bivalvi e, di conseguenza, all’esigenza di ampliare le conoscenze sui loro meccanismi molecolari e cellulari.

La realizzazione di librerie genomiche e di cDNA di diversi tessuti dei bivalvi, ha permesso di avviare ricerche più complete anche sul genoma e sulle risposte funzionali di questi organismi non modello (Jenny *et al.*, 2007; Hedgecock *et al.*, 2005 e 2007). Recentemente sono state prodotte nuove librerie di cDNA rappresentative di diversi tessuti a diverso stadio di sviluppo di *C. gigas*, *M. edulis*, *B. azoricus* e *R. decussatus*, mantenuti in condizioni fisiologiche o esposti a diversi fattori di stress, quali pesticidi, ipossia, infezione con *Vibrio* sp.; il successivo sequenziamento sistematico delle ESTs ha permesso di individuare nuovi trascritti coinvolti in meccanismi fisiologici, nella risposta a fattori di stress (HSPs, ferritine, GST) e del sistema immunitario (peptici antimicrobici, lectine), e di identificare un elevato numero di SNPs (Tanguy *et al.*, 2008).

Ad oggi (dicembre 2007) sono disponibili nei database pubblici 18 collezioni di ESTs riferite a bivalvi di rilevante interesse commerciale ed ecotossicologico,

come mitili, ostriche e vongole. Per quanto riguarda *Mytilus sp.* (fig. 6), il maggior numero di sequenze depositate sono di *M. callifornianus*.

Delle 5133 ESTs di *M. galloprovincialis*, 3986 sono state prodotte dal sequenziamento sistematico di librerie di cDNA dei principali tessuti di mitili sani presso il dipartimento di Biologia e C.R.I.B.I. dell'Università di Padova (Venier *et al.*, 2003). Di queste, 1714 sono state selezionate e depositate sulla piattaforma *MytArray* 1.0, utilizzata per gli esperimenti descritti in questa tesi. Altre 1147 derivano, invece, dal sequenziamento di due librerie di cDNA di emolinfa di mitili immunostimolati (collaborazione con Istituto Investigaciones Marinas- C.S.I.C., Vigo, Spain, Pallavicini *et al.*, 2008)

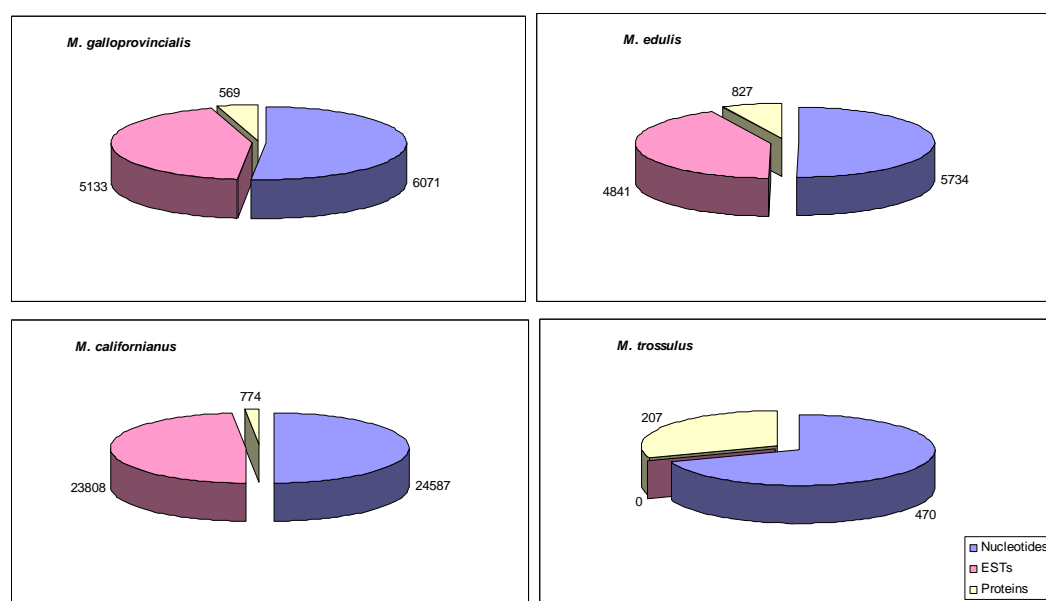


Figura 6. Sequenze nucleotidiche, ESTs e sequenze proteiche di *Mytilus sp.*, disponibili nei database pubblici a dicembre 2007.

Molte delle sequenze registrate mostrano similarità con geni isolati e caratterizzati in altri organismi; una parte consistente (~ 50%), invece, risulta essere ancora priva di annotazione genica (Tanguy *et al.* 2008). Se questa situazione, da un lato, risulta un fattore limitante per lo studio delle risposte funzionali e la caratterizzazione dei processi molecolari in mitilo, dall'altro giustifica e rinforza l'impegno relativo ad realizzare sequenziamenti sistematici di librerie genomiche e di cDNA rappresentative di geni e trascritti espressi in condizioni fisiologiche e di stress, in particolare in *M. galloprovincialis*.

1.2 CONTAMINANTI POTENZIALMENTE TOSSICI DELLE ACQUE: METALLI E LORO COMPOSTI

Gli ecosistemi marini costieri risentono pesantemente di tutte le attività antropiche e risultano quindi contaminati da una grande varietà di inquinanti. Inoltre l'ambiente marino costiero, caratterizzato solitamente da acque con bassa densità batterica, pH leggermente alcalino, elevata salinità e bassa temperatura, presenta tempi lunghi di degradazione delle sostanze chimiche che vi vengono immesse. Nelle acque marine costiere si può trovare un numero particolarmente elevato di contaminanti chimici, spesso a concentrazioni bassissime non rilevabili con i metodi di routine (rapporto APAT 23/2002, www.sinanet.apat.it).

Un gruppo disomogeneo di inquinanti chimici potenzialmente tossici è costituito dai metalli e loro composti, in particolare da quelli che comunemente vengono chiamati metalli pesanti. Il termine "metallo pesante" è piuttosto impreciso (Duffus, 2002), ma viene correntemente usato per identificare elementi collocati tra il gruppo 3 e il 12 della tavola periodica ed aventi densità maggiore di 5 g/cm³. I principali metalli pesanti noti come inquinanti ambientali sono: zinco (Zn), rame (Cu), cadmio (Cd), mercurio (Hg), nichel (Ni), piombo (Pb) e cromo (Cr). Alcuni sono compresi nelle 33 sostanze prioritarie per le quali la Direttiva Quadro 2000/60/CE sull'inquinamento delle acque prevede la riduzione e la graduale eliminazione del carico inquinante.

La contaminazione da metalli pesanti dell'ambiente marino può comportare infatti problemi gravi, specialmente per quei metalli e quelle specie di organismi per i quali sono stati riportati bioconcentrazione e biomagnificazione lungo la catena trofica. Tali fenomeni, infatti, possono avere risvolti negativi sulla qualità igienico-sanitaria dei prodotti della pesca.

Risulta quindi importante fissare degli standard di qualità per le acque, sia per tutelare l'ambiente marino costiero, sia per evitare rischi alla popolazione che si ciba degli animali provenienti da tali zone.

Nel caso della laguna di Venezia il D.M. 23/4/98 ha fissato, tra i requisiti di qualità delle acque, i valori imperativi da non superare per i metalli pesanti disciolti totali (tab. 1).

Metallo	Valore imperativo secondo il D.M. 23/4/98 [µg/L]
Rame	1.50
Mercurio	0.003
Piombo	0.15
Zinco	1.50
Cadmio	0.03
Cromo	0.70
Nichel	1.50

Tabella 1. Concentrazioni di metalli disciolti totali: valori imperativi secondo il D.M. 23/4/98

Alcuni di questi metalli, come zinco e rame, sono normalmente presenti negli organismi viventi dove svolgono importanti funzioni, sebbene risultino tossici a concentrazioni elevate. Essi hanno ruolo strutturale e regolativo in numerose macromolecole biologiche e pertanto sono coinvolti in numerosi processi cellulari.

Gli altri metalli pesanti, invece, risultano tossici già a concentrazioni molto basse. I meccanismi implicati nella tossicità dei metalli sopra indicati non sono ancora completamente chiariti, tuttavia sono sperimentalmente dimostrati alcuni tipi di danno che essi provocano all'interno delle cellule:

- Interazione diretta con il DNA. Questo avviene nel caso del cromo e del cadmio, che risultano genotossici in quanto interagiscono direttamente con il DNA, provocando una serie di gravi conseguenze, come arresto delle polimerasi, blocco della replicazione e della trascrizione e inibizione dei sistemi di riparazione (Emmanouil *et al.*, 2007)

- Danno ossidativo. Normalmente nelle cellule il metabolismo dell' O₂ porta alla formazione di ROS, *reactive oxygen species* (Lloyd *et al.*, 1997). Si pensa che concentrazioni intracellulari significative di ROS siano normalmente prodotte durante il metabolismo aerobico, ma gli organismi hanno sviluppato elaborati meccanismi per neutralizzarli. Il problema sorge quando, a seguito dell'esposizione ad agenti tossici (come alcuni metalli), si assiste ad una sovrapproduzione di ROS che la cellula non riesce a detossificare completamente. Si possono quindi generare vari tipi di danno, tra cui: frammentazione delle proteine, perossidazione dei lipidi e danno genetico (lesioni pre-mutagene). L'induzione di danno ossidativo è stato riportato per il nichel, il rame, il cadmio, il mercurio, il piombo e il ferro (Valko *et al.*, 2005; Ercal *et al.*, 2001).

- Interferenza con le normali attività cellulari. In seguito all'esposizione a metalli sono state riportate alterazioni in molteplici attività cellulari. Spesso si assiste allo sbilanciamento del normale equilibrio ionico cellulare oppure alla competizione e dislocamento di uno ione metallico essenziale dal suo sito e la sostituzione da parte del metallo tossico, con conseguenti alterazioni livello dell'espressione genica o di attività enzimatiche e regolative (Korashy *et al.*, 2007. Beyersmann, 2002).

1.2.1 I MOLLUSCHI BIVALVI E LE ALTERAZIONI INDOTTE DAI METALLI PESANTI

Il tasso con cui i metalli pesanti vengono accumulati dai molluschi come i mitili dipende sia da fattori abiotici (proprietà fisico-chimiche del metallo o suoi composti e della matrice ambientale in cui esso si trova) che da fattori biotici (tipo di organismo esposto, suo stadio di sviluppo e stato funzionale). Per esempio, temperatura e salinità possono influenzare sia la speciazione chimica del metallo (ioni liberi, complessi organici o inorganici, in soluzione o nel particolato

sospeso) che il suo destino all'interno di un organismo (assorbimento e accumulo, eliminazione).

I molluschi possono assumere i composti metallici sia dalla frazione disciolta nell'acqua che dal particolato sospeso e, in generale, il processo di assorbimento è cellula-specifico e metallo-specifico. In generale le specie metalliche solubili e gli ioni metallici liberi risultano più biodisponibili e più tossici rispetto alle forme insolubili degli stessi metalli, anche se una maggiore idrofobicità spesso si traduce in una maggiore tendenza del composto a ripartirsi e persistere nei tessuti dell'organismo (Widdows e Donkin, 1992).

Il bioaccumulo dei metalli nei molluschi bivalvi è controllato da fattori fisiologici e biochimici che possono variare stagionalmente e in funzione dell'individuo (Mubiana e Blust, 2006; Casas *et al.*, 2004). In generale, il livello di bioaccumulo dei contaminanti metallici è direttamente correlato alla loro concentrazione nell'ambiente (Usero *et al.*, 2005).

Gli studi relativi alle variazioni indotte in mitilo dai metalli pesanti e alla definizione dei meccanismi di risposta attuati, sono numerosi. Gli studi effettuati hanno indagato alterazioni del *signalling* (Kaloyianni *et al.*, 2006), dell'espressione di geni tessuto-specifici (Zorita *et al.*, 2007), la tossicità indotta in diversi stadi larvali (Prato e Bindolino, 2007) e l'induzione di specifiche proteine (Domouhtsidou *et al.*, 2004, Kaloyianni *et al.*, 2006).

Tra gli effetti dei metalli pesanti evidenziati in mitilo, vi è, ad esempio l'attivazione di enzimi come la superossidodismutasi, la catalasi, la glutatione perossidasi e altre perossidasi cellulari; essi costituiscono una delle prime meccanismi di difesa da agenti ossidanti (Borković *et al.*, 2005). Tuttavia questi enzimi possono essere inibiti da metalli, come dimostrato per cadmio e rame (Company *et al.*, 2004).

I metalli possono indurre danno genotossico, come dimostrato da Bolognesi *et al.* (1999) nelle branchie di mitili esposti ad una miscela di Cd, Cu, Hg alla concentrazione 0.10 μ M. La genotossicità è stata valutata mediante la stima delle cellule micronucleate e saggi di eluizione alcalina, utilizzando anche l'induzione delle MT come marcatore dell'avvenuta esposizione ai metalli.

In studi effettuati su *Mytilus galloprovincialis* si è osservato come mercurio e rame determinino una deregolazione dell'omeostasi del calcio citosolico. Si attiva per esempio una fosfolipasi A2 calcio-dipendente, che destabilizza la membrana lisosomiale (Marchi *et al.*, 2004). Inoltre sono in grado di alterare l'attività e l'espressione di ATPasi di membrana calcio-dipendenti (Burlando *et al.*, 2004).

Gli studi di questo tipo sostengono la possibilità di utilizzare le alterazioni indotte dai metalli in mitilo nel biomonitoraggio dell'inquinamento e per una migliore definizione dei meccanismi di tossicità dei metalli pesanti. Quest'idea può essere

sviluppata ulteriormente tenendo conto degli attuali progressi realizzati nel campo della genetica, della bioinformatica e della genomica funzionali.

1.3 L'AMBIENTE LAGUNARE VENEZIANO

La laguna di Venezia è la più vasta laguna italiana e ha una superficie di circa 550 km², una lunghezza di 50 km e una larghezza media di 10-11 Km.

E' un ambiente di transizione tra terra ed acqua, in stato di perenne instabilità. Il sistema suolo del territorio lagunare è costituito dall'insieme delle terre emerse, di natura artificiale o naturale (isole, litorali, argini, casse di colmata) e rappresenta circa l'8% di tutta la superficie della laguna. Il restante 92% è costituito dal sistema acqua che comprende i canali e i fondali (11.9%), le velme e le barene (80.1%). Comunica con il mare attraverso tre bocche di porto (Lido, Malamocco, Chioggia) (fig. 7), di conseguenza la sua idrodinamica è legata ai cicli della marea ma è anche dipendente dagli apporti di acqua dolce dall'entroterra lagunare.

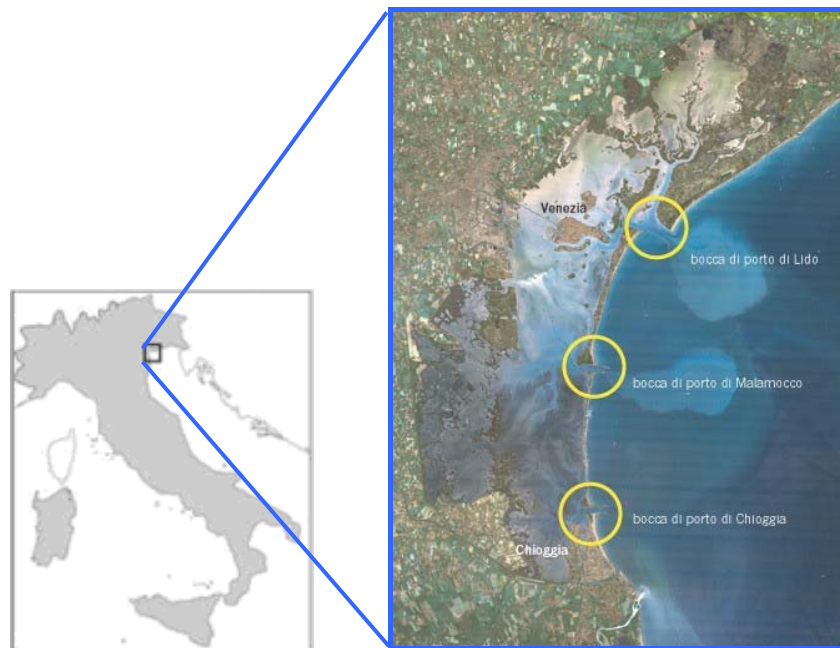


Figura 7. Immagine satellitare della laguna di Venezia in cui sono indicate le tre bocche di porto. (www.infrastrutturetrasporti.it)

L'alternarsi di bassa e alta marea ogni dodici ore e mezza contribuisce al ricambio delle acque, al trasporto e alla distribuzione dei sedimenti, determinando le sue peculiari caratteristiche biologiche. La vegetazione e le specie animali lagunari si trovano spesso a popolare zone dove le condizioni di vita sono difficili. Per esempio, le oscillazioni delle temperature giornaliere e stagionali, l'idrodinamica lagunare e le attività umane definiscono gradienti termici e la salinità delle acque salmastre, che influenzano la vita degli organismi. Nel suo insieme, la laguna veneziana è un ambiente a elevata biodiversità in cui gli organismi affrontano i

cambiamenti del loro ambiente vitale con un'ampia gamma di meccanismi adattativi (Cognetti e Maltagliati, 2004).

Tuttavia, la ricchezza e la complessità morfologica dell'ecosistema lagunare vanno via via scomparendo per effetto di una serie di fattori che si alimentano tra loro. Erosione, acque alte, moto ondoso stanno gradualmente trasformando la laguna che mantiene sempre meno le caratteristiche fisiche di zona umida e assume invece quelle semplificate e indifferenziate, dell'ambiente marino. Si osservano fenomeni di subsidenza (abbassamento del suolo) e di eustatismo (innalzamento del livello marino) (Ravera *et al.*, 2000). L'attività umana ha inoltre profondamente modificato, fin dall'epoca dei primi insediamenti, l'aspetto e l'equilibrio idro-geografico della laguna. In particolare, la pesante trasformazione industriale ed urbana degli anni Sessanta e Settanta ha causato l'immissione di sostanze eutrofizzanti, di metalli pesanti, di inquinanti di natura organica. Direttamente o indirettamente, l'ambiente lagunare subisce alterazioni per il traffico di mezzi natanti, gli apporti di origine urbana, industriale, agricola e zootecnica (come fertilizzanti e pesticidi) e per il *fall out* atmosferico (sia deposizione secca che umida). Inoltre, fattori quali la presenza di sostanze inquinanti nei fondali lagunari o nei siti utilizzati passato come discariche espongono questo ecosistema complesso al rischio di crisi ambientali (www.salve.it).

L'effetto dell'inquinamento chimico sull'ecosistema lagunare non è ancora sufficientemente definito, a causa della frammentarietà ed eterogeneità dei dati e della mancanza di solide interpretazioni dei processi dinamici che lo governano. Comunque, a partire dagli anni Ottanta si è cercato di contrastare questa tendenza con studiando la qualità delle acque e dei sedimenti e ponendo maggior attenzione alle problematiche ambientali, anche creando istituti preposti a tale compito (Secco *et al.*, 2004).

1.3.2 INQUINAMENTO NELLA LAGUNA DI VENEZIA E PROGRAMMI DI BIOMONITORAGGIO

La tutela del patrimonio idrico costituisce uno degli obiettivi prioritari all'interno di qualsiasi programma di salvaguardia del territorio. Essa parte da elementi precisi di conoscenza dello stato di salute dell'ambiente acquatico che recenti normative hanno reso d'obbligo (D. lgs. 152/99 e successive modificazioni apportate dal D. lgs. 258/2000). In linea di massima i contenuti delle leggi sono strutturati per dare indicazioni su criteri generali d'azione, non vincolati a casi specifici, ma validi sull'intero territorio nazionale.

Gli ambienti acquatici, ed in modo particolare l'ambiente marino costiero, sono soggetti all'immissione di una quantità sempre maggiore di inquinanti, i quali coesistono in miscele complesse e difficilmente caratterizzabili da un punto di

vista chimico e tossicologico. La Direttiva europea 2000/60 dispone le linee da adottare in materia di tutela delle acque, e prevede la riduzione e la graduale eliminazione dell'inquinamento provocato dagli scarichi, emissioni e perdite di singoli inquinanti o gruppi di inquinanti che presentano un rischio significativo per l'ambiente (Direttiva Quadro 2000/60/CE del 23 ottobre 2000). La Direttiva, inoltre, specifica quali sono le sostanze prioritarie (P) che rappresentano un rischio significativo per, o attraverso, l'ambiente acquatico. Alcune di queste sono poi identificate come sostanze pericolose e prioritarie (PP), ovvero sostanze che hanno caratteristica di persistenza e bioaccumulabilità. Il Decreto Ministeriale 367/03 definisce gli *standard* di qualità nella matrice acquosa dei contaminati prioritari e ne prevede la determinazione delle concentrazione nelle acque, nei sedimenti e nel biota (mitili ed altre specie di bivalvi). Tra questi contaminanti sono inclusi anche composti potenzialmente genotossici e cancerogeni.

La Tab. 2 riporta i limiti di concentrazione previsti nelle acque per i soli contaminanti definiti prioritari e pericolosi (PP).

NUMERO CAS	ELEMENTO	-A- 2015 ($\mu\text{G/L}$)	-B- 2008 ($\mu\text{G/L}$)
7440-38-2	Arsenico	2 D; 1,4 M-L	5 D 1,6 M-L
7440-43-9	Cadmio	0,1 D 0,03 M-L	1 D 0,2 M-L
7439-97-6	Mercurio	0,02 D 0,003 M-L	0,05 D 0,03 M-L
7440-47-3	Cromo	1,5 D 0,5 M-L	4 D 0,7 M-L
7440-02-0	Nichel	1,3 D 0,6 M-L	3 D 1,5 M-L
7439-92-1	Piombo	0,4 D 0,06 M-L	2 D 0,15 M-L
	Idrocarburi Policiclici Aromatici Totali	0,005	0,02 D 0,015 M-L
50-32-8	Benzo(a)pirene	0,0001	0,004 D 0,003 M-L
205-99-2	Benzo(b)fluorantene	0,0001	0,004 D 0,003 M-L
207-08-9	Benzo(k)fluorantene	0,0001	0,004 D 0,003 M-L
191-24-2	Benzo(g,h,i)perilene	0,0005	0,004 D 0,003 M-L
87-68-3	Esaclorobutadiene	0,001	0,01
58-89-9	Lindano (isomero dell'esaclorocicloesano)	0,001 D 0,0005 M-L	0,01 D 0,005 M-L
319-84-6/ 7	Esaclorocicloesano alfa / beta	0,0002	0,002

118-74-1	Esaclorobenzene		0,0003
608-93-5	Pentaclorobenzene	0,003	0,03
85535-84-8	Cloroalcani		0,5 D 0,1 M-L provvisori
32534-81-9	Pentabromodifenilettere Bromurato	0,0005	0,001
26154-52-3	Nonilfenolo	0,03 D 0,003 M-L	0,3 D 0,03 M-L
104-40-5	4(para)-Nonilfenolo	0,001 D 0,0006 M-L	0,01 D 0,006 M-L

Tabella 2. *Standard* di qualità delle acque marino-costiere (M), lagunari (L) e dolci (D), di alcuni contaminanti rappresentativi indicati nel D.M. 367/03. Tali *standard* di qualità dovranno essere raggiunti gradualmente entro il 2015 (Colonna **A**) con un obiettivo intermedio da raggiungere entro il 2008 (colonna **B**). Dove non è specificata la tipologia di corpo idrico, la concentrazione fissata costituisce lo *standard* da rispettare nelle acque dolci, nelle lagune e nelle acque marine.

Soprattutto negli anni di massimo sviluppo del centro industriale di Porto Marghera, la raffinazione del petrolio, la produzione di cloroacidi, di ammoniaca, di fertilizzanti, di alluminio, di vernici, ecc. hanno influito negativamente sull'ecosistema lagunare. Queste attività hanno contribuito ad aumentare le concentrazioni ambientali di contaminanti potenzialmente tossici tra cui idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e loro derivati, composti organici clorurati, metalli pesanti, ed anche sostanze radioattive.

I microinquinanti rilasciati in atmosfera possono depositarsi per caduta nella laguna, mentre quelli presenti nelle acque reflue tendono a contaminare i fondali antistanti gli scarichi. Una volta depositatisi sul fondo, sono ulteriormente rimossi e trasportati dalle correnti, dai moti ondosi e dalla marea (www.corila.it). I contaminanti lipofili persistenti come composti organoclorurati (policlorobifenoli: PCB, tetraclorodibenzodiossine/furani: TCDD/F) ed altri composti simili, possono essere assimilati dagli organismi filtratori, accumularsi in concentrazioni via via maggiori lungo la catena alimentare e raggiungere valori sufficientemente elevati da causare effetti tossici negli organismi acquatici e nell'uomo (Vasseur e Cossu-Leguille, 2006).

Questo particolare ambiente della laguna di Venezia, in cui convivono un delicato ecosistema ed importanti funzioni produttive, ha generato una serie di provvedimenti direttamente collegati al contesto, ed ha portato alla menzione del sito di Porto Marghera, al primo posto nell'elenco relativo alla legge 426/98. Negli ultimi anni, come conseguenza di una maggiore consapevolezza dell'entità del problema inquinamento della laguna, sono stati pianificati degli interventi di recupero e di salvaguardia dell'ecosistema lagunare. Poiché la progressiva erosione dei fondali contaminati contribuisce in modo significativo all'inquinamento lagunare, sono stati avviati anche lavori di bonifica dei siti particolarmente inquinati.

In base alle leggi comunitarie, nazionali e locali di tutela dei corpi idrici, il Magistrato delle Acque di Venezia promuove programmi di monitoraggio ambientale. Ha avviato, ad esempio, lo studio integrato MELa (Monitoraggio Ecosistema Lagunare), che valuta la qualità dell'ecosistema lagunare misurando i livelli di inquinanti nelle acque, nei sedimenti e nelle comunità biologiche (www.magisacque.it). Sono anche stati attuati programmi di biomonitoraggio che includono la valutazione degli effetti nocivi causati dagli inquinanti in organismi sentinella. Tali variazioni forniscono informazioni sia qualitative che semiquantitative sulla natura del contaminante chimico e possono evidenziare la connessione sequenziale fra effetti biologici e livelli di contaminazione ambientale (Nicholson e Lam, 2005; Nigro *et al.*, 2006).

Diversi programmi di biomonitoraggio patrocinati dal Magistrato delle Acque di Venezia e sperimentalmente conclusi (Progetti 2023 e ICSEL) hanno utilizzato, in particolare, il mitilo come organismo sentinella nella valutazione dello stato di qualità dell'ambiente lagunare. Vari autori, singolarmente o nell'ambito di studi multidisciplinari, hanno studiato in mitilo i parametri sopra indicati (Da Ros e Nesto, 2005; Santovito *et al.* 2005; Venier e Zampieron, 2005; Marin *et al.*, 2006). Fra le varie evidenze, l'incidenza significativa di danno genetico (misurato come addotti di tipo aromatico mediante ^{32}P -*postlabelling assay*, micronuclei ed anomalie nucleari) nei mitili dell'area industriale ha dimostrato l'esposizione a contaminanti genotossici anche confermata dalle analisi chimiche (IPA, PCB ed esaclorobenzene sono risultati significativamente più elevati rispetto a mitili di altre zone lagunari. Tuttavia, prima di applicare i programmi di biomonitoraggio per valutare l'inquinamento ambientale è necessario conoscere le caratteristiche morfo-funzionali e l'intervallo di variazione delle risposte dell'organismo a normali condizioni di *stress* dovute al calore, alla mancanza di ossigeno, alla presenza di parassiti o infezioni, ed anche al dispendio energetico necessario alla riproduzione (Livingstone e Pipe, 1992).

1.4 ANALISI DEL TRASCRITTOMA

In tutti gli organismi le risposte funzionali si basano sull'espressione di geni e proteine specifici. Nelle cellule il livello di espressione di singoli geni è modulato in risposta a segnali intra- ed extra-cellulari e l'insieme dei trascritti presenti in una cellula fornisce un'istantanea delle proteine che essa sta producendo in quelle particolari condizioni, ossia il trascrittoma. La capacità di misurare l'espressione dei geni può migliorare la comprensione dei processi cellulari che intervengono durante lo sviluppo, il differenziamento o in risposta a diversi stimoli ambientali. Le tecniche disponibili per monitorare variazioni dell'espressione genica sono molteplici, per esempio il *Northern blotting* e l'RT-PCR. Questi metodi tuttavia,

sono definiti per singoli o pochi geni e costringono a stabilire a priori quelli da analizzare (Reece, 2004).

Un modo diretto ma laborioso per caratterizzare un trascrittoma è quello di isolare l'RNA messaggero, retro-trascriverlo in cDNA, clonarlo in un vettore e successivamente sequenziare ciascun clone della libreria risultante. Un ulteriore approccio correntemente utilizzato nell'individuazione delle modificazioni del trascrittoma è quello SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) che permette di separare molecole di cDNA che sono differenti tra due popolazioni. Questa tecnica viene utilizzata con successo per creare librerie di cDNA tessuto specifiche (Rebrikov *et al.*, 2004; Harbers e Carninci, 2005). Altre tecniche permettono lo studio del trascrittoma senza richiedere la conoscenza a priori delle sequenze genomiche: SAGE (Velculescu, 2000) e *Differential Display* (Liang e Pardee, 1992).

Tra le tecniche ad oggi più consolidate e frequentemente applicate per lo studio del trascrittoma, vi è quella dei DNA *microarray*. Deriva da principi e metodologie assodate come l'ibridazione degli acidi nucleici e la microscopia a fluorescenza (FISH) che sfruttano l'elevata selettività tra filamenti complementari del DNA (Southern e Maskos, 1994).

I *microarray* sono piattaforme miniaturizzate definite da migliaia di frammenti di DNA rappresentativi di tutto o di una parte del genoma di un organismo. La realizzazione dei DNA *microarray* dipende dalla disponibilità di dati di sequenza (sequenziamento sistematico di nuovi genomi, librerie di cDNA e singoli geni), e dalla disponibilità di sistemi robotizzati ad alta precisione in grado di depositare migliaia di geni su micropiattaforme (Xiang *et al.*, 2000, Kirby *et al.*, 2007).

A partire dal 1995 sono state applicate diverse strategie per la costruzione dei DNA *microarray*. Quelle più importanti sono: *microarray* di cDNA; *microarray* di oligonucleotidi; *chip* di DNA (*Affymetrix*) (fig. 8). Una più recente alternativa è costituita da *chip* microelettronici prodotti da *CombiMatrix CustomArray*TM.

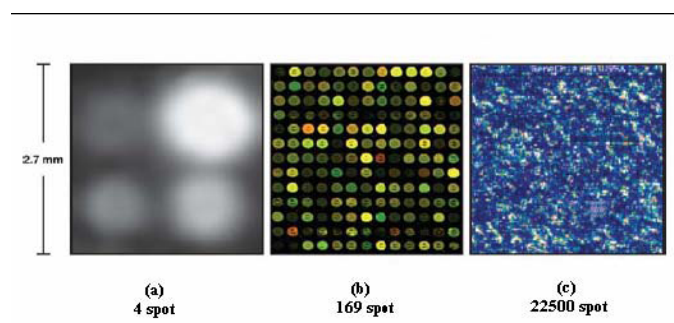


Figura 8. Evoluzione della tecnologia dei *microarray*. Ciascun riquadro rappresenta una regione dell'*array* di 2,7 x 2,7 mm. (a) *Macroarray*: cloni depositati su nylon. (b) *Microarray* a cDNA: *spot* per deposizione a contatto su vetro. (c) *Chip Affymetrix* ad alta densità spaziale di oligo 25-mer su silicio. Immagine tratta da Stoughton, 2005.

Proprio a causa delle diverse strategie utilizzate, delle differenze tra diverse piattaforme e del gran numero di informazioni ottenute dall'analisi bioinformatica dei dati, i ricercatori hanno la necessità di avere degli *standard* che permettano loro di interpretare i risultati in modo indipendente. L'Istituto Europeo di Bioinformatica (EBI) ha sviluppato la guida MIAME: *Minimum Information about a Microarray Experiment*, in cui vengono descritte le informazioni minime necessarie a questo scopo (Lettieri, 2006; Barrett e Edgar, 2006).

1.4.1 I MICOARRAY DI CDNA

I *microarray* di cDNA sono il primo tipo di piattaforma su scala genomica sviluppata nel 1995 da Schena *et al.*. Questa tecnologia viene correntemente applicata per lo studio dei profili trascrizionali nell'uomo ed in altri organismi, anche non modello, previo l'allestimento e il mantenimento di una libreria di cDNA.

Il *microarray* di cDNA infatti, sono costituiti sonde (*probe*) che provengono dall'amplificazione mediante PCR di sequenze di cDNA originate da specifiche librerie). Tali sonde, anche riferibili come EST (*Expressed Sequence Tag*) sono comunemente segmenti 3'-terminali di circa 200-500 bp, identificanti in modo univoco un singolo gene (Adams *et al.*, 1991; Duggan *et al.*, 1999; Gibson, 2002). Per la costruzione dell'*array* di cDNA viene utilizzato un sistema robotizzato detto *spotter*, che raccoglie le sonde da una micropiastre a 384 pozzetti e ne deposita in sequenza su *array* aliquote precise dell'ordine dei nanolitri o picolitri (fig. 9a).

Lo spazio tra i centri degli *spot* è stabilito tra 120 e 250 μm , a seconda della densità richiesta. Le testine da stampa più comuni sono di quattro tipi e solitamente hanno da 4 a 32 aghi distanziati di circa 1 cm l'uno dall'altro (fig. 9b).

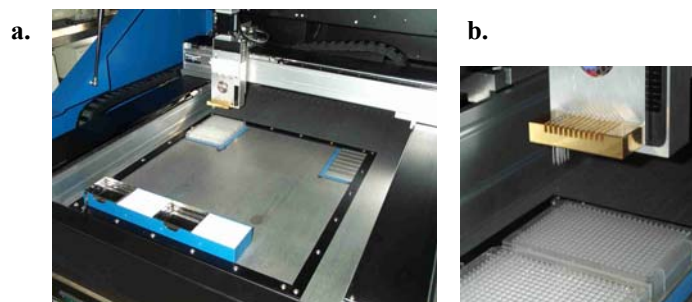


Figura 9. a) Lo spotter presente presso il C.R.I.B.I. e il *Genpak*ARRAY 21 (*Genpak*); in alto a sinistra le piastre con il cDNA risospeso, a destra i vetrini ed in basso le soluzioni di lavaggio delle punte. b) Particolare della “testa” dello *spotter* con 8 punte montate.

Il supporto dell'*array* è rappresentato da membrane di nylon o nitrocellulosa oppure da vetrini da microscopia. Questi ultimi presentano numerosi vantaggi in quanto sono facilmente disponibili, poco costosi, duraturi, presentano superfici omogenee, resistono alle alte temperature, presentano una bassa emissione di fluorescenza e riducono al minimo il volume di ibridazione essendo di materiale non poroso (Xiang *et al.*, 2000). La superficie del vetrino è rivestita con una

soluzione di aminopropilsilani. In seguito all'esposizione ai raggi UV le cariche positive delle ammine primarie formano legami covalenti con i gruppi fosfato del DNA, permettendo il legame stabile di questo sulla superficie del vetrino (fig. 10).

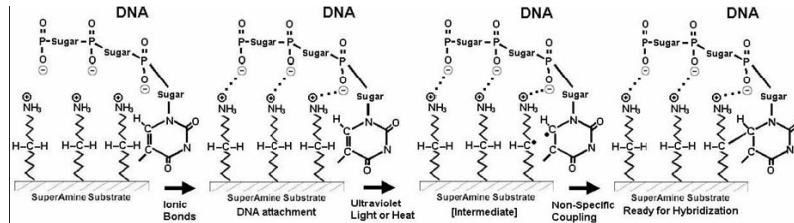


Figura 10. Processo chimico di fissazione del DNA sul vetrino.

Infine la sonda depositata sul supporto viene resa ad elica singola mediante denaturazione chimica o termica per poter essere ibridata con il cDNA *target* marcato del campione in esame. Per la marcatura dei *target* possono essere utilizzati coloranti fluorescenti (5-NN'-diethyl-tetrametilindocarbocianina: Cy3 e -NN'-diethyl-tetrametilindo di carbocianina: Cy5) che possono essere legati ad un nucleotide modificato del cDNA dopo la trascrizione inversa (Yu *et al.*, 2002).

Negli *array* di cDNA l'utilizzo di due fluorofori permette di ibridare in modo competitivo su uno stesso *array* due campioni provenienti da popolazioni cellulari o tessuti diversi. Dopo l'ibridazione, il vetrino viene letto allo *scanner* a due lunghezze d'onda diverse corrispondenti ai due fluorocromi utilizzati, ottenendo un segnale di fluorescenza relativa che è indice dell'abbondanza relativa dei trascritti. I dati di intensità di fluorescenza vengono poi sottoposti ad analisi statistiche e bioinformatiche. In fig. 11 sono descritte le fasi principali di un esperimento di ibridazione competitiva su cDNA *microarray*.

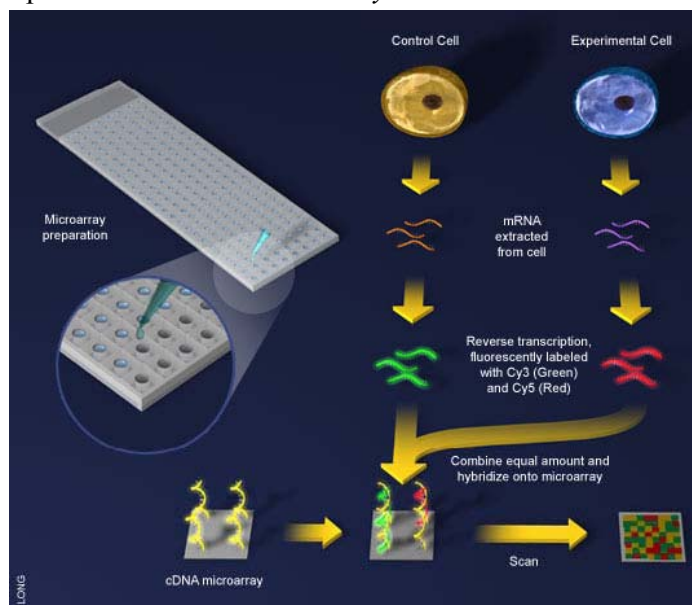


Figura 11. Fasi sperimentali in un esperimento di ibridazione su cDNA *microarray* (da Coe e Antler, 2004). L'amplificazione e deposizione del cDNA sonda su un vetrino da microscopia è seguita dall'ibridazione competitiva del cDNA *target* proveniente da due popolazioni di RNA (test e controllo). Alla rilevazione della fluorescenza segue l'analisi statistica e bioinformatici dei dati di intensità.

1.4.2 I MICROARRAY DI OLIGONUCLEOTIDI

La grande disponibilità di informazioni ottenute sui genomi ha portato allo sviluppo di un'alternativa vantaggiosa rispetto alle sonde di cDNA. Si tratta di oligonucleotidi sintetici, progettati in silico usando specifici programmi bioinformatici. Essi costituiscono una valida opzione rispetto ai *microarray* di cDNA in quanto riducono i tempi e i costi relativi al mantenimento e controllo dell'archivio fisico dei cDNA, la raccolta dei cloni ricombinanti e l'amplificazione degli inserti (Carvalho *et al.*, 2004).

Le sonde oligonucleotidiche sono di lunghezza compresa tra 50 e 80 bp, disegnate informaticamente facendo riferimento alle sequenze disponibili oggi nei *database* pubblici ed anche alle EST generate per una data specie (Xiao *et al.*, 2005). Il successo di queste piattaforme è dovuto ad una precisa progettazione degli oligonucleotidi. Essi, infatti, possono esser disegnati sulla base di sequenze note, in modo da identificare una sola variante di *splicing*, evitando strutture secondarie favorite dalla presenza di GC e, preferibilmente, nella regione 3' terminale dell'mRNA riducendo cross-ibridazioni tra geni omologhi appartenenti ad una stessa famiglia genica (Kane *et al.*, 2000).

I *microarray* di oligonucleotidi, proprio per la loro precisa progettazione, presentano specificità più elevata rispetto agli *array* di cDNA, pur mantenendone le caratteristiche di versatilità e flessibilità. Questo approccio non è tuttavia praticabile quando la disponibilità di sequenze geniche dell'organismo in esame sia scarsa.

1.4.3 PIATTAFORME MICROELETTRONICHE (COMBIMATRIX)

Una recente alternativa alla produzione di *array* di oligonucleotidi che prevede la sintesi direttamente sulla superficie del supporto solido consiste nel depositare sonde pre-sintetizzate della lunghezza desiderata con le stesse modalità di stampa descritte per i *microarray* a cDNA. Una prerogativa di questo approccio, detto di *delivery*, con il vantaggio di poter depositare oligonucleotidi dalle sequenze validate e di qualità uniforme. I processi di sintesi e di *delivery* sono parte integrante anche dei *chip* microelettronici prodotti da *CombiMatrix CustomArray™* (Ghindilis *et al.*, 2007). Questa tecnologia si basa su un semiconduttore modificato che contiene una matrice di microelettrodi di platino che permettono la sintesi chimica del *probe* e la rilevazione del *target* che si andrà ad ibridare. Un processo sotto stretto controllo di un *software* dirige la sintesi simultanea *in situ* di migliaia di differenti oligonucleotidi con densità spaziale paragonabile alla tecnologia *inkjet*. Gli oligonucleotidi, tipicamente 50-meri, vengono prodotti su uno strato sottile di materiale poroso (*Porous Reaction Layer*) che, ricoprendo i microelettrodi, permette il passaggio di corrente (>100

nanoampere) riducendo gli effetti negativi dei prodotti indesiderati di elettrolisi sulla catena oligonucleotidica in crescita. Una caratteristica estremamente interessante delle piattaforme *CombiMatrix* è data dalla possibilità di utilizzare i microelettrodi non solo per la sintesi ma anche per la rilevazione elettrochimica del segnale generato dal *target* ibridato. Questo tipo di rilevazione, basato su misure amperometriche, consente inoltre di abbandonare l'utilizzo di molecole fluorescenti per la marcatura del *target* e di velocizzare notevolmente il processo di scansione dell'*array*.

1.4.4 APPLICAZIONE DEI MICROARRAY IN AMBITO ECOTOSSICOLOGICO

Le nuove tecniche genomiche hanno rivoluzionato in maniera significativa non solo la medicina clinica ma anche l'approccio allo studio dei contaminanti tossici. In questi ultimi anni, il progresso di diverse metodologie genomiche derivanti da conoscenze biologiche, biochimiche e bioinformatiche ha reso possibile ottenere maggiori informazioni sulle reazioni funzionali e sui processi molecolari in atto in un organismo. Proprio nel 1999 è stato coniato il termine tossicogenomica, per descrivere l'applicazione dell'approccio genomico allo studio delle interazioni gene-ambiente nello sviluppo di malattie.

Il numero di specie il cui genoma è già stato sequenziato è in rapida crescita. Di altre, anche di interesse ecotossicologico, incluse specie microbiche, le conoscenze genomiche rimangono parziali (Ankley *et al.*, 2006). Il concetto fondamentale per applicazioni ambientali della tecnologia dei *microarray* si basa sull'assunto che le diverse sostanze tossiche alterano l'espressione genica e, di conseguenza, lo studio dei profili trascrizionali può aiutare a definirne il meccanismo di azione. Il numero di geni coinvolti nel *pathway* di risposta dipende dal meccanismo coinvolto, ma non è un fattore limitante in quanto una piattaforma *microarray* può ospitare migliaia di sonde.

Gruppi di ricerca hanno concentrato i loro sforzi sulla produzione di librerie di cDNA per la definizione di piattaforme *microarray* e per lo studio delle diverse funzioni fisiologiche di organismi di interesse ecotossicologico. Si cominciano ad avere i primi risultati di un tale approccio genomico per lo studio, ad esempio, degli effetti degli inquinanti in organismi acquatici (Kausch *et al.*, 2008; Hook *et al.*, 2006; Venier *et al.*, 2006; Tanguy *et al.*, 2008) e in comunità microbiche (Wu *et al.*, 2006).

Molti esperimenti di esposizione a xenobiotici vengono condotti in situazioni controllate in laboratorio solitamente considerando una sola sostanza. Tuttavia, nell'ambiente reale, in particolare nell'ambiente acquatico, un vasto spettro di molecole con diverso grado di tossicità, agisce simultaneamente su organismi e cellule, e ciò rende difficile l'individuazione di specifiche relazioni causa-effetto (Williams *et al.*, 2003; Denslow *et al.*, 2007).

I profili generati dai *microarray* generano una mole di dati che bisogna gestire con risorse bioinformatiche e strumenti di analisi statistica. Questi studi possono giovare delle conoscenze già disponibili sui meccanismi d'azione di vari tipi di contaminanti ambientali e dell'ambiente acquatico e, d'altra parte, ci possono aiutare ad identificare nuovi *pathway* di tossicità anche in specie molto diverse dai modelli biologici più noti, importanti per la comprensione delle alterazioni indotte in un ecosistema.

2. MATERIALI E METODI

2.1 LA COLLEZIONE DI EST DI MITILO

Le sonde molecolari (cDNA *target*) che depositate su vetrino definiscono il DNA *microarray* di mitilo (*MytArray 1.0*) sono parte di una collezione di sequenze (*Expressed Sequence Tags*, EST) 3' terminali di *M. galloprovincialis*, prodotte dal sequenziamento sistematico di una libreria di cDNA dei principali tessuti di mitilo; il procedimento di creazione della libreria è descritto in Venier *et al.*, 2003. L'archivio fisico dei cloni batterici ricombinanti (*E. coli* DH10B con inserti 3'cDNA su vettore plasmidico pcDNAII, *Invitrogen*) è costituito da 19 micropiastre da 96 pozzetti (solo 30 pozzetti occupati nella piastra tmy-000019) contenenti in ogni pozzetto 140 µl di SOB con ampicillina allo 0.1% e 10 µl di batteri. Le micropiastre sono conservate a -80°C dopo aggiunta di glicerolo (20% v/v finale) che previene la formazione di cristalli di ghiaccio e la lisi batterica.

2.2 AMPLIFICAZIONE DELLA COLLEZIONE DI CDNA DI MITILO

Per avere una sufficiente quantità di sonde molecolari (cDNA *target*) da depositare su vetrino ed effettuare gli esperimenti di ibridazione competitiva su *microarray*, è stato necessario ri-amplificare la collezione dei cloni batterici costituenti l'archivio fisico. Un µl di ogni clone è stato trasferito in piastre (96 *Well, Assay Plate, Falcon*[®]) contenenti 150 µl di Terrific Broth e ampicillina allo 0,1%, ed incubato a 37°C per 24 h. Si è proceduto quindi con l'amplificazione mediante PCR degli inserti di cDNA, trasferendo in piastre per PCR (*Twin.tec PCR plate 96, Eppendorf*[®]) 1 µl di ogni coltura batterica per ogni pozzetto contenente 60 µl seguente miscela di reazione: 1X PCR *buffer*, 2 mM MgCl₂, 0.20 mM di dNTPs, 0.15 µM di ciascuno dei due *primers* (M13 *Reverse*: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' e M13 *Forward*: 5'-TTTAAAACGACGGCCAGT-3', *Invitrogen*[™]) e 1.5 U di Taq DNA *Polymerase, Invitrogen*[™]. La reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore (*Mastercycler*[®], *Eppendorf*) con il seguente programma: 5 min iniziali a 95°C per permettere la lisi batterica; 35 cicli composti da 40 sec di denaturazione del DNA a 95°C, 40 sec di appaiamento dei *primers* a 57°C e 1 min di estensione a 72°C; 5 min di allungamento finale a 72°C. Per ogni clone batterico la reazione di PCR è stata condotta in doppio e i relativi prodotti di amplificazione sono stati successivamente riuniti in un'unica aliquota. Per verificare l'avvenuta amplificazione degli inserti, un'aliquota (8 µl) di ciascun prodotto di PCR è stata controllata in gel d'agarosio all'1.5% con 0.5 µg/ml bromuro d'etidio (*Invitrogen*[™]) (marcatore di peso molecolare *GeneRuler*[™] 1 Kb DNA *Ladder*, MBI *Fermentas*). Gli inserti che non hanno superato tale

controllo sono stati ri-amplificati, controllati e sostituiti nella posizione corrispondente. I prodotti di PCR sono stati trasferiti in piastre da 96 pozzetti (MicroAmp[®], *Optical 96-well Reaction Plate*, *Applied Biosystems*), purificati con 1/10 del volume di NaAc 3 M pH 5.2 e 2 volumi di EtOH ass e due successivi lavaggi con EtOH 75%; il DNA è stato infine risospeso in 22 μ l di H₂O Gibco[®]/pozzetto e posto in agitazione per 12h.

2.3 QUANTIFICAZIONE E PREPARAZIONE DEL cDNA PER LA DEPOSIZIONE SU VETRINO

Poiché il cDNA da depositare sull'*array* deve avere una concentrazione minima di 50 ng/ μ l è stato necessario creare un marcatore di quantità a questa concentrazione limitante (DNA purificato dal clone tmy-000014/A02, 50 ng/ μ l) e confrontare quindi tutti gli amplificati in gel di agarosio all'1.5%: i prodotti di PCR in quantità insufficiente, sono stati ri-amplificati e nuovamente purificati.

Per essere depositato sul vetrino dell'*array*, il cDNA deve essere risospeso in una soluzione specifica. A questo scopo il contenuto delle piastre da precipitazione da 96 pozzetti è stato riunito in piastre da 384 pozzetti (*Gentix* Cat. X7020), particolarmente adatte per lo spottaggio, in quanto sono costruite con materiale idrofobico e con pozzetti di forma adatta per gli aghi dello *spotter*, e liofilizzato (liofilizzatore *Heto Lyolab* 3000, T -60°C, 12 h). Successivamente il cDNA è stato risospeso meccanicamente (robot *Multimek*) in 18 μ l di soluzione di spottaggio SSC 3X/pozzetto. Dopo 2-4 h in agitazione a 4°C, le sonde sono pronte per essere depositate su vetrino polilisinato (*Micromax Glass Slide superChipTM*, *Perkin Elmer*) mediante lo *spotter Genpak ARRAY 21* (*Genpak*) e fissate con raggi UV.

2.4 ORGANIZZAZIONE DEL MYTARRAY 1.0

Il *MytArray* 1.0 è una piattaforma di cDNA costituito da 1758 EST 3' terminali depositate in duplicato nello stesso *array* alla concentrazione minima di 50 ng/ml. Di queste, 1693 e 21 sono rispettivamente EST nucleari e mitocondriali di *M. galloprovincialis*; altre 44 EST sono controlli negativi (12 EST di caffè, 32 EST batteriche).

I singoli *spot* distano tra loro 180 μm e hanno un diametro di 80-100 μm mentre i *subarray* sono a distanza di 4500 μm . Ogni vetrino contiene due copie del *Mytarray* 1.0 ad una distanza di circa 2 cm (fig. 12). Nell'angolo superiore sinistro di ogni *array* sono collocati alcuni *spot* "a saturazione" che aiutano ad allineare correttamente le griglie di identificazione del *microarray* durante l'analisi dell'immagine.

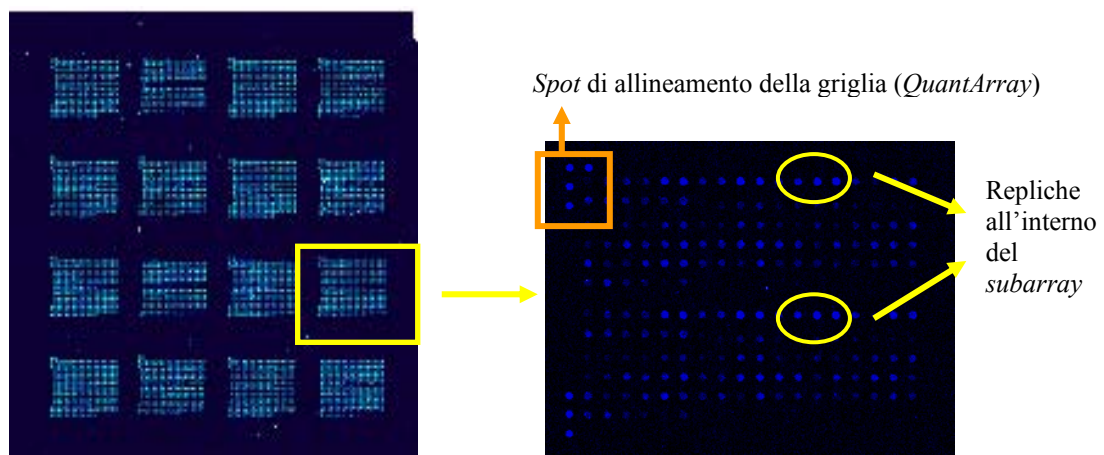


Figura 12. Organizzazione e dettaglio del *MytArray* 1.0 dopo colorazione Vistra (*Vistra Green Nucleic Acid staining solution*, Amersham Pharmacia, NJ)

2.5 TRATTAMENTO DEI MITILI CON METALLI PESANTI COMBINATI

Mitili di taglia media (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk. 1819, lunghezza della conchiglia 4.93 ± 0.17 cm) sono stati prelevati da un allevamento in mare aperto (Chioggia,) ed acclimatati alcuni giorni in condizioni standard (18 ± 1 °C, acqua marina artificiale ASW *Istant Ocean*, salinità $\sim 32\text{‰}$). Sono stati quindi suddivisi in 4 vasche (5 mitili/vasca, 1 litro ASW/mitilo). A parte il gruppo di controllo, i mitili delle altre 3 vasche sono stati esposti per 48 h a tre concentrazioni diverse (rispettivamente 0.05, 0.10 e 0.20 μM) di una miscela di sali metallici costituita da $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM 201.33), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM 170.48) e HgCl_2 (PM 271.50). Le concentrazioni sono state scelte come dosi biologicamente attive, potenzialmente in grado di causare effetti biologici sulla base dei dati riportati in letteratura (Bolognesi *et al.*, 1999), ma tali da evitare tossicità conclamata o letalità. Durante l'acclimatazione ed il trattamento, i mitili sono stati regolarmente nutriti

(*Invertebrate Target Food, Coral Life*) e mantenuti a 19 ± 1 °C. L'acqua, il nutrimento e le miscele di trattamento sono stati rinnovati ogni 12 ore, controllando ogni volta la reattività dei mitili (filtrazione, chiusura delle valve, produzione di bisso). Al termine del trattamento da ciascun mitilo sono state dissezionate metà branchia (emibranchia) e la ghiandola digestiva, subito congelate in azoto liquido, e conservate a -80°C fino all'estrazione dell'RNA.

2.6 VALUTAZIONE DELLA FREQUENZA DI MICRONUCLEI ED ANOMALIE NUCLEARI IN CELLULE BRANCHIALI DI MITILO

Dagli degli stessi mitili descritti sopra, un'emibranchia è stata posta in soluzione fisiologica e sottoposta a digestione enzimatica (dispasi II 0.6 U/ ml Alsever, 10-15 min a T_{amb}). La sospensione cellulare ottenuta è stata filtrata in successione su nylon a porosità di 280 e 100 μm , lavata per centrifugazione (200 xg per 15 min a 10°C) e risospesa in 1 ml di Alsever addizionato di 1% siero fetale di vitello (Biospa). Diluizioni opportune di ogni sospensione cellulare sono state quindi centrifugate su vetrino (*Cytospin 3 Shandon*, 2 min a 800 rpm) fino ad ottenere un numero adeguato di preparati (5-7 vetrini per mitilo) a densità ottimale di cellule (3000-6000 cellule/vetrino) come riportato in Dolcetti e Venier, 2002 e Venier e Zampieron, 2005. Dopo breve tempo all'aria, i preparati cellulari sono stati fissati in metanolo assoluto ghiacciato, lasciati asciugare a temperatura ambiente e colorati in Giemsa al 6% in tampone di Sorensen, al riparo dalla luce.

La presenza dei micronuclei (MN) e di anomalie nucleari (AN) è stata valutata in microscopia ottica a campo chiaro (Olympus BH-2, oculari WHK 10X/10L) utilizzando l'obiettivo ad immersione 100x (Splan Apo 1,40 oil 160/0,17 Olympus) classificando più di 2000 cellule di tipo epiteliale per vetrino, su almeno due vetrini indipendenti per mitilo, 5 mitili/dose. La lettura è stata effettuata in cieco (in collaborazione con A. Gómez-Mendikute, Università di Bilbao, Spagna). Affinchè il test conduca a dei risultati validi, è importante adottare criteri che permettano la selezione e classificazione delle cellule analizzate, escludendo nel contempo qualsiasi cellula di dubbia definizione. I criteri per la corretta classificazione dei MN sono stati a suo tempo definiti da Coutryman e Heddle nel 1976. Sulla base della classificazione effettuata al microscopio sono state calcolate le frequenze individuali, medie e le relative deviazioni standard (5 mitili/sito). Dai valori assoluti di cellule con MN e AN si sono ricavate le frequenze per singolo mitilo ossia il numero di casi ogni 1000 od ogni 100 cellule classificate. I valori assoluti osservati per ogni punto dose sono stati confrontati con quelli del controllo mediante un test non parametrico (G test, Sokal e Rohlf, 1995).

2.7. CAMPIONAMENTO DEI MITILI NATIVI DELLA LAGUNA DI VENEZIA

Mitili nativi sono stati campionati da alcune zone di riferimento dell'ambiente lagunare veneziano in tre anni successivi (2005, 2006, 2007) all'inizio dell'estate, evitando la fase primaverile di liberazione massiva dei gameti. I siti di campionamento sono (fig. 13):

Sito 1: confluenza Canale industriale ovest e Darsena della Rana

Sito 2: Canale Vittorio Emanuele III

Sito 3: scarico SM3, all'inizio del Canale Malamocco-Marghera

Sito 4: Bocca di Lido

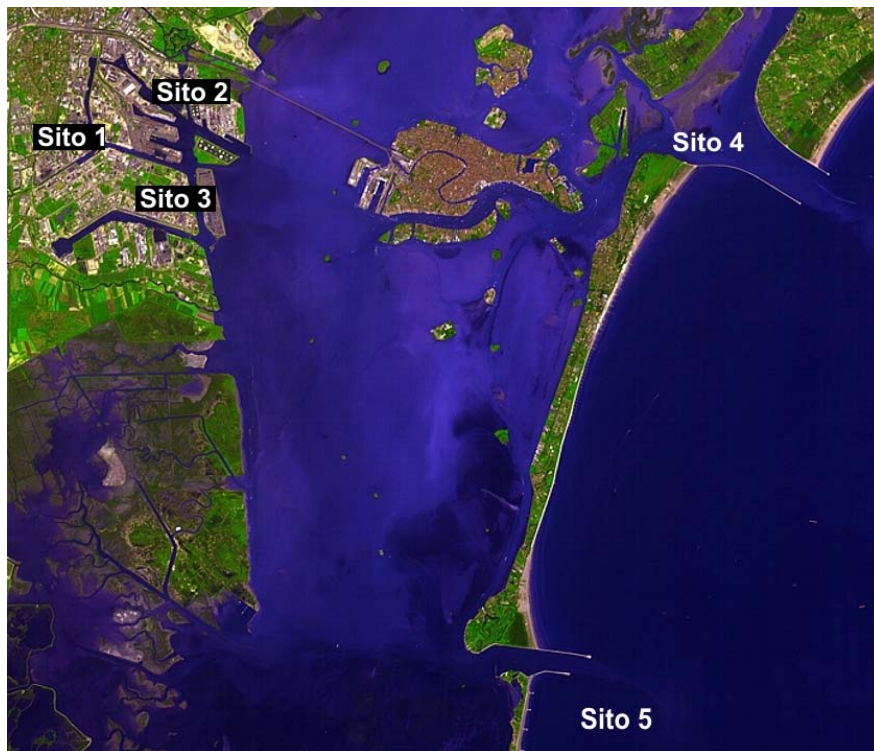


Figura 13. Visione satellitare della laguna di Venezia e dei siti di campionamento.

Misure effettuate nel 2005 e nel 2007 hanno indicato variazioni di temperatura da 29°C a 26°C e di salinità da 29 a 36 psu, dall'interno lagunare al mare aperto rispettivamente. Nel 2007 il sito 1 è risultato privo di mitili nativi. I mitili sono stati prelevati da briccole, al livello sub-mareale della colonna d'acqua.

La lunghezza media della conchiglia, valutata in cm su cinque mitili è risultata:

- nel 2005: 6.72 ± 0.38 (sito 1), 6.18 ± 0.36 (sito 2), 5.88 ± 0.18 (sito 3), e 6.28 ± 0.16 (sito 4).

- nel 2006: 5.86 ± 0.56 (sito 1), 5.83 ± 0.48 (sito 2), 5.47 ± 0.48 (sito 3), e 5.87 ± 0.26 (sito 4).

-nel 2007: 6.68 ± 0.26 (sito 2), 5.70 ± 0.30 (sito 3), e 6.34 ± 0.39 (sito 4).

Altri mitili (lunghezza media della conchiglia 6.34 ± 0.37 cm) sono stati raccolti da una mitilicoltura extra-lagunare, sito 5, ed utilizzati come controllo “universale” (*pool* N=30) per tutti gli esperimenti di *microarray* descritti in questa tesi.

I mitili dell’area industriale erano evidentemente incrostati da organismi epifiti e, in parte, infestati da *Mytilicola*. Lo stato di sviluppo delle gonadi è apparso lievemente più avanzato nei mitili dell’area industriale rispetto ai mitili della bocca di porto, e in questi ultimi rispetto ai mitili dell’allevamento a mare.

Sono state dissezionate e rapidamente congelate in azoto liquido le ghiandole digestive di 10 mitili/sito.

Per quanto concerne il campionamento del 2005, i tessuti molli di circa 30 mitili/sito sono stati destinati all’analisi dei contaminanti chimici più rappresentativi.

2.8 ESTRAZIONE, PURIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL’ RNA TOTALE

Per effettuare gli esperimenti di ibridazione competitiva e l’analisi di espressione genica mediante DNA *microarray* è stato purificato individualmente l’RNA totale dalle branchie (B) e dalle ghiandole digestive (GD) dei mitili trattati in laboratorio (3 mitili/dose e 5 mitili di controllo), dalle ghiandole digestive dei mitili nativi della laguna di Venezia (5 mitili/sito/anno), e da 30 ghiandole digestive di mitili provenienti dall’ allevamento di mare aperto: i tessuti sono stati omogeneizzati (omogenizzatore DiAx 900, *Heidolf*) e l’RNA totale è stato estratto in soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato (6 ml Trizol, *Invitrogen*TM /150 mg di tessuto umido), ottimizzando il protocollo *Invitrogen*. Negli esperimenti di *microarray* è necessario che l’RNA sia estremamente puro: contaminanti come fenoli, polisaccaridi, proteine o DNA genomico inibiscono la sintesi del cDNA, impedendo l’azione della trascrittasi inversa o causando una terminazione prematura della retrotrascrizione. La permanenza di questi composti può causare seri problemi di ibridazione con la sonda ed incrementare la fluorescenza aspecifica. Si è notato che i campioni di RNA estratto dalla ghiandola digestiva di mitilo presentavano un’alta assorbanza a 230 nm ed un basso valore del rapporto $(A_{260} - A_{320}) / (A_{230} - A_{320})$, e si è quindi ipotizzata una contaminazione da carboidrati. Per eliminare tali contaminanti si è deciso di precipitare l’RNA totale con LiCl (conc. fin. 2 M), così come generalmente si usa nel caso di campioni vegetali (Tesniere e Vayda, 1991). L’RNA totale purificato è stato quindi quantificato con uno spettrofotometro avanzato (NanoDrop[®] Ambion, ND-1000 UV-Vicon). La qualità dei campioni è valutata per elettroforesi capillare con il *kit* RNA 6000 Nano LabChip, in associazione con lo strumento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Si riportano di seguito alcuni esempi di elettroferogrammi (fig 14), in base ai quali si può valutare la qualità dell’RNA totale.

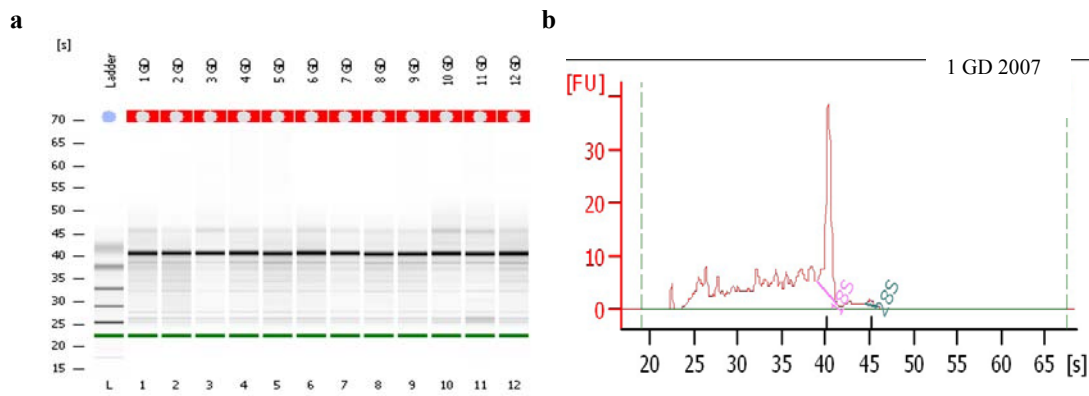


Figura 14. a) Elettroforesi capillare con RNA 6000 ladder (cod. 7152), Ambion, e alcuni campioni esemplificativi di RNA totale di ghiandola digestiva (GD) di mitili lagunari. b) RNA totale di mitilo di ottima qualità (evidente il picco rRNA 18S, mentre rRNA 28S, tipicamente in questa specie, è facile all'idrolisi).

2.9 PREPARAZIONE DEI CDNA TARGET MARCATI

Nello studio dei profili trascrizionali mediante DNA *microarray*, è possibile stabilire i livelli relativi di espressione genica nel campione di interesse rispetto ad un campione di riferimento (controllo) marcando i due campioni con fluorofori diversi. Si allestiscono solitamente almeno due esperimenti di ibridazione, in modo da ottenere dati significativi dal punto di vista statistico. Dato il diverso comportamento dei fluorofori utilizzati (sia come efficienza di incorporazione, che come emissione di fluorescenza), i due esperimenti sono condotti in reciproco, ovvero invertendo i fluorofori nella marcatura dei campioni (*dye-swap*). Poiché ogni vetrino contiene due *array* è stato possibile eseguire le due ibridazioni reciproche contemporaneamente sulla stessa superficie, senza introdurre ulteriori ragioni di variabilità. Dal momento che ogni trascritto è rappresentato due volte sullo stesso *array* si può contare su quattro repliche per ogni sonda di cDNA.

Per la sintesi e la marcatura indiretta dei campioni *target* si è seguito il protocollo sviluppato da Hughes *et al.* (2001), da noi messo a punto per campioni di mitilo.

L'RNA totale viene retrotrascritto a cDNA, sostituendo parte dei nucleotidi dTTP, forniti per la reazione, con nucleotidi contenenti un'ammina primaria reattiva: 5-(3-aminoallyl)-dUTP (aa-dUTP). Tale ammina successivamente è in grado di combinarsi con un estere libero dei fluorofori, permettendone così il legame al cDNA.

Per ognuno dei campioni test e controllo sono allestite due reazioni di retrotrascrizione separate, così da permettere poi la successiva marcatura del cDNA con Cy3 o con Cy5 e da poter effettuare gli esperimenti in reciproco come precedentemente descritto. Ogni reazione di retrotrascrizione è condotta a partire

da 10 µg di RNA totale risospesi in 8 µl di acqua Gibco®. All'RNA si aggiunge 1 µg di oligo(dT)₁₈ degenerato (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV-3'), e si incuba a 65°C per 5 min. Ad ogni campione si aggiungono 19.4 µl della seguente miscela di retrotrascrizione: *first-strand buffer* 1x, dATP 0.5 mM, dGTP 0.5 mM, dCTP 0.5 mM, dTTP 0.3 mM, aa-dUTP 0.2 mM e DTT 0.5 mM. La reazione è catalizzata dall'enzima *SuperScript II* (200 U/µl, *Invitrogen*TM) una trascrittasi inversa con attività DNA polimerasica RNA dipendente in direzione 5'→3', altamente processiva e priva di attività RNAsica, così da non degradare l'mRNA stampo. La reazione è stata condotta a 42°C per 2 h.

Si aggiungono quindi 0.6 µl di EDTA 500 mM, per determinare il blocco della reazione e 3 µl di NaOH 1 N, per degradare l'RNA stampo; il pH è riportato a condizioni vicine alla neutralità con 3 µl di HCl 1N e 8.5 µl HEPES di 2 M.

Per rimuovere i frammenti di RNA degradato e i componenti della miscela di reazione si utilizzano le *Microcon YM-30* (*Amicon MILLIPORE*). Prima di effettuare la reazione di accoppiamento dei fluorofori ai nucleotidi modificati incorporati nel cDNA, è necessario ridurre il volume della soluzione per liofilizzazione. I campioni vengono poi risospesi in 14 µl di acqua Gibco® e si aggiungono quindi 1/10 del volume di Na₂CO₃ 1 M pH 9.0 e 4 µl della soluzione di fluoroforo desiderato NHS-estere-Cy3 o - Cy5 (*CyDye Post-Labeling Reactive Dye Pack, GE Healthcare*) precedentemente rispeso in DMSO, e incubando per 1 h a T_{amb} al buio. Il fluoroforo residuo è inattivato con 4.5 µl di idrossilammina [4 M] incubando i campioni per 15 min a T_{amb}. Il cDNA marcato è purificato con l'uso del *GeneEluteTM PCR Clean-Up Kit* (*Sigma*) e quantificato al *NanoDrop[®]* (*Ambion*).

2.10 IBRIDAZIONE COMPETITIVA SU MYTARRAY 1.0

Dal momento che l'ibridazione effettuata è di tipo competitivo, uguali quantità di Cy3- o Cy5- campione di controllo e Cy5- o Cy3-campione test sono riunite e precipitate assieme, aggiungendo 1/10 del volume di NaAc 3 M pH 5.2 e due volumi di EtOH abs; seguono 2 successivi lavaggi con un isovolume di EtOH 75%. Si risospende il cDNA in 18 µl del tampone di ibridazione (SSC 5X, formamide 50%, SDS 0.1%). Tale volume di tampone di ibridazione è sufficiente per coprire completamente l'area di spottaggio sul vetrino. Prima della reazione di ibridazione, tuttavia, la piattaforma deve subire un processo di pre-ibridazione che permette di bloccare eventuali siti attivi rimasti liberi, che potrebbero in seguito legare molecole di cDNA marcato e provocare un'emissione di fluorescenza aspecifica. A questo scopo il *MytArray 1.0* è incubato per 2 h a 48°C in una soluzione composta da: SSC 5x, *salmon sperm* ssDNA 100 ng/µl, *Denhardt's solution* 5x, SDS 0.1%.

Dopo la denaturazione a 70°C per 3 min, i campioni di cDNA marcati sono trasferiti sulla superficie del *MytArray* 1.0 e coperti con un coprioggetto 22*22 mm (HybridSlip™, SIGMA). Il vetrino è posto in una cameretta di ibridazione umidificata (HybChamber™, GeneMachines®) ed immersa in un bagnetto termostato a 48°C per 12-16 h. La temperatura è tale da assicurare una stringenza ottimale, in modo da ridurre al minimo le ibridazioni aspecifiche.

In seguito si procede alla rimozione di tutto ciò che non si è ibridato, con tre lavaggi successivi: il vetrino è immerso in una soluzione di SSC 1x e SDS 0.2% a 48°C per 1 min e in agitazione a T_{amb} per 3 min; in SSC 0.1x, SDS 0.2% a T_{amb} per 2 min; in SSC 0.1x a T_{amb} per 2 min. Infine il vetrino è asciugato con aria compressa.

2.11 ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE

2.11.1 ACQUISIZIONE ED ANALISI DELL'IMMAGINE

La fluorescenza è rilevata mediante lo scanner GSI *Lumonics* LITE (*Perkin Elmer*), che permette di eccitare selettivamente i due fluorofori grazie a due *laser* (a 543 nm per il Cy3 e a 633 nm per il Cy5) e di rilevare la luce emessa proporzionale alla quantità di fluoroforo incorporato. Un fotomoltiplicatore (PMT) converte il segnale luminoso in un impulso elettrico, ed in seguito in un segnale digitale ovvero un'immagine della fluorescenza relativa al Cy3 e al Cy5.

Dapprima si esegue una scansione preliminare per stimare i parametri più adatti per l'acquisizione (risoluzione, intensità della luce emessa dai *laser*, voltaggio del PMT, bilanciamento dei fluorofori), poi una scansione ad alta risoluzione (5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). Dopo aver acquisito l'immagine si effettua la quantificazione numerica della fluorescenza tramite il software *ScanArray Express*® *Quantitate*, che permette di associare ad ogni *spot* il nome del trascritto corrispondente e fornisce i dati per la successiva elaborazione statistica. L'utilizzo di un algoritmo permette in seguito di aggiustare ulteriormente la griglia, identificando il centro di ogni *spot* ed il relativo *patch*, ovvero il rettangolo costruito attorno ad esso e al cui interno vengono misurati sia l'intensità di fluorescenza sia il rumore di fondo. Il programma individua tutti i *pixel* appartenenti ad ogni *spot* e ne calcola sia la media che la mediana. Solitamente si preferisce lavorare con la mediana, che è una misura più robusta in quanto non tiene conto in modo significativo di piccoli gruppi di *pixel* con un valore significativamente diverso dalla media.

Alla fine del processo il programma restituisce uno *scatter plot* ed un *file* (fig 15) contenente varie informazioni, tra cui: la sigla del trascritto identificato dallo *spot*,

la fluorescenza misurata per ognuno, il rumore di fondo associato, la deviazione *standard* di ogni misura, una serie di parametri relativi a controlli di qualità.

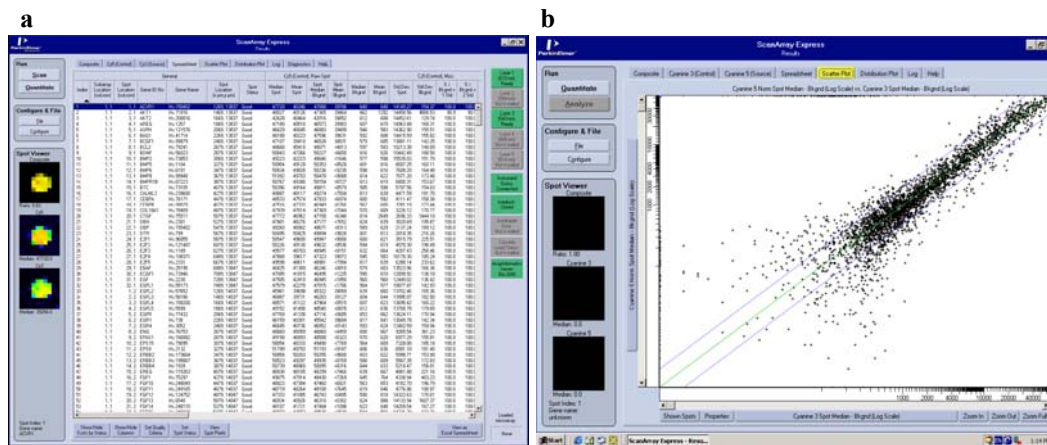


Figura 15. Esempio di un *file* di *output* di ScanArray Quantitate (a) di *scatter plot* (b) che riporta l'intensità del Cy3 contro l'intensità del Cy5 (in scala logaritmica) per ogni *spot*. In questo tipo di rappresentazione trascritti con simile valore di espressione si distribuiscono lungo la retta diagonale $y=x$, mentre i geni differenzialmente espressi divergono da essa, proporzionalmente alla loro differenza di espressione.

Un esperimento di *microarray* restituisce una serie di dati che riflettono una misura di espressione relativa di un campione rispetto ad un controllo perciò nella fase di analisi si utilizza il \log_2 del rapporto test/controllo.

2.11.2 NORMALIZZAZIONE DEI VALORI DI ESPRESSIONE

Molte variabili possono influenzare e distorcere i dati di fluorescenza, come per esempio, la diversa efficienza di incorporazione ed emissione dei due fluorofori o eventuale disomogeneità di ibridazione sul vetrino. Per poter eliminare distorsioni sistematiche è quindi necessario normalizzare i dati. Per questo scopo si utilizza il programma *Microarray Data Analysis System* (MIDAS) sviluppato dal TIGR (*The Institute for Genomic Research* <http://www.tigr.org/software>) (Hegde *et al.*, 2000, Saeed *et al.*, 2003).

Una prima normalizzazione è effettuata sull'intensità totale che si basa sull'assunzione che la distribuzione dei valori di espressione dei trascritti ugualmente espressi si collochi su una retta, calcolando di conseguenza un fattore di normalizzazione che consente di correggere i dati e calcolare i reali rapporti di intensità di fluorescenza per ciascun trascritto. Questo tipo di normalizzazione, tuttavia, si può applicare solo in caso che l'errore sistematico dipenda da uno scorretto bilanciamento da parte dell'operatore o dalla diversa efficienza ottica e di incorporazione dei due fluorofori, ma non tiene conto di altri fattori, riferibili per esempio all'intensità del segnale di fluorescenza. Per eliminare questo errore si utilizza la regressione di *Lowess* (*LOcalised WEighted Smother Estimator*), applicata per la prima volta su dati *microarray* da Yang Y.H. *et al.*, 2001. E' un metodo di regressione lineare che permette la ricerca della miglior interpolazione dei valori dello *scatter plot* in modo che la pendenza della retta di regressione sia

pari ad uno, basandosi sull'assunzione che per mRNA derivanti da campioni simili la maggior parte dei trascritti sia espressa allo stesso livello; i dati vengono ordinati secondo la loro intensità e corretti calcolandone le distanze attorno alla curva di interpolazione. MIDAS effettua una normalizzazione dell'intensità di fluorescenza applicando l'algoritmo *Lowess* ai valori espressi come il rapporto tra le intensità dei due canali, $\log_2(I_{CyA}/I_{CyB})$, in funzione del prodotto $\log_{10}(I_{CyA} * I_{CyB})$ (fig 16).

2.11.3 ANALISI DI RAGGRUPPAMENTO GERARCHICO (*CLUSTERING*)

La classificazione e la rappresentazione delle diverse situazioni biologiche esaminate con i profili di espressione è possibile attraverso un'analisi gerarchica: un'analisi statistica descrittiva basata sulla costruzione di matrici di similarità. Le matrici di similarità vengono costruite in base al calcolo delle distanze di tutte le possibili coppie di elementi.

Il programma utilizzato a questo scopo è *J-Express* (Gentleman *et al* 2004; Dysvik *et al.*, 2001), che, tramite un approccio agglomerativo, fornisce un dendrogramma dove i geni con profilo di espressione simile vengono raggruppati insieme nello stesso *cluster*. I raggruppamenti sono stati ottenuti sia calcolando la distanza euclidea sia con la correlazione di Pearson.

2.12 IDENTIFICAZIONE DEI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI

L'analisi di raggruppamento gerarchico evidenzia somiglianze tra i profili trascrizionali, ma fornisce poche informazioni sulla significatività statistica dei dati. Per identificare i trascritti differenzialmente espressi rispetto ad un controllo vengono correntemente applicati diversi metodi statistici, dal semplice calcolo del *fold change* all'analisi della varianza o a t-test modificati. La scelta del test statistico opportuno è guidata principalmente dalla numerosità delle liste geniche e dal numero di repliche per trascritto che si hanno a disposizione.

Nello specifico, per quanto riguarda il trattamento di laboratorio sono stati effettuati per ciascun tessuto (B e GD) due esperimenti ibridazione competitiva in *dye-swap* (in totale, 4 repliche tecniche/trascritto) su singoli mitili (3 repliche biologiche/dose) ottenendo 12 valori di espressione per trascritto/dose (totale 36 ibridazioni); per individuare i trascritti differenzialmente espressi rispetto al controllo è stato utilizzato il programma SAM (*Significance Analysis of Microarray*).

Nel caso dei mitili nativi della laguna di Venezia, gli esperimenti di *microarray* sono stati così condotti ed analizzati:

- campionamento 2005: analisi su GD di singoli individui (5 mitili/sito), 2 ibridazioni in *dye-swap* (= 4 repliche tecniche/trascritto), ottenendo 8 valori di espressione di ogni trascritto per ciascun sito (totale 40 ibridazioni); analisi SAM e *Rank product*.
- campionamenti 2005, 2006, 2007: analisi su GD *pool* (N=5 mitili), 2 ibridazioni in *dye-swap*, ottenendo per ogni trascritto 4 valori di espressione di ogni trascritto per mitilo per ciascun sito/anno (totale 24 ibridazioni); analisi *Rank product*.

2.12.1 SAM (*SIGNIFICANCE ANALYSIS OF MICROARRAY*)

Per l'analisi dei dati ottenuti dagli esperimenti di *microarray* è stato creato un metodo statistico specifico: *Significance Analysis of Microarray* (SAM) (Tusher *et al.*, 2001; Storey and Tibshirani 2003), che permette di estrapolare geni differenzialmente espressi in modo significativo. Una caratteristica importante è che esso non prende in considerazione un dato sperimentale qualora i valori delle diverse repliche siano disomogenei, quindi identifica solo quei trascritti che presentano sufficiente omogeneità tra le diverse repliche sperimentali. Inoltre, viene utilizzato un approccio non parametrico, non basato su assunzioni relative ad una distribuzione normale dei dati. Il programma opera confrontando i valori delle misure ripetute con un valore atteso, calcolato in base a permutazioni casuali effettuate sui dati forniti dall'operatore, restituendo alla fine una lista di geni sovra e sotto espressi con repliche omogenee.

L'analisi fornisce anche una serie di valori delta (Δ) che descrivono il grado di scostamento tra i valori attesi ed osservati, e ad essi si associa il numero atteso di falsi positivi, noto come *false discovery rate* (FDR). È possibile specificare il valore Δ per ottenere un più appropriato numero di geni significativamente sovra- o sotto-espressi. E' stata effettuata un'analisi di tipo *One Class response* con 200 permutazioni.

Un limite di questo programma, tuttavia, è di fornire una stima meno affidabile della varianza quando il numero di repliche è limitato (< 8); perciò, in questi casi, è preferibile l'applicazione di metodi non parametrici alternativi (Jeffery *et al.*, 2006; Wu, 2005; Martin *et al.*, 2004).

2.12.2 RANK PRODUCT

Per l'analisi statistica degli esperimenti condotti sul *pool* di mitili lagunari è stato utilizzato, un metodo denominato prodotto dei ranghi (*Rank Product*, RP) che è stato sviluppato da Breitling *et al.*, 2004, appositamente per trovare geni differenzialmente espressi in esperimenti di ibridazione competitiva. Dal confronto tra i metodi statistici solitamente utilizzati, il prodotto dei ranghi è un metodo robusto anche con poche repliche sperimentali (Jeffery *et al.*, 2006) ed ha

trovato applicazione in numerosi studi di *microarray* (Hong *et al.*, 2006, Moscatiello *et al.*, 2006).

È un metodo non parametrico basato sulla posizione in classifica del valore di espressione del singolo gene: esso associa un valore di significatività per ogni singolo gene fornendo quindi l'indicazione della robustezza del dato e dando meno peso ai dati nel loro complesso. L'uso di un approccio non parametrico offre il vantaggio di non operare assunzioni relative ad una distribuzione normale dei dati. Tuttavia, prima di applicare RP, è necessario filtrare le liste dei dati in modo da eliminare i trascritti che presentano repliche tecniche discordi. A questo scopo è stato calcolato il valore del rapporto fra media e deviazione standard delle quattro repliche per ogni trascritto, e sono stati considerati omogenei solo quei valori con tale rapporto superiore a (1+0.3 volte la deviazione standard). Questo è un filtro piuttosto restrittivo, ma, considerando solo i trascritti che presentano repliche omogenee, consente di applicare l'analisi RP solo ai dati più robusti.

Il calcolo del *Rank Product* è piuttosto laborioso per la quantità e la complessità dei calcoli da eseguire. Per questo è preferibile utilizzare il linguaggio di programmazione R, che opera in un ambiente appositamente sviluppato per il calcolo statistico. R è liberamente disponibile alla pagina <http://www.r-project.org>. Tra le numerose opzioni, permette di scaricare dei pacchetti contenenti funzioni complesse. Uno di questi, denominato “*RankProd*” (Hong *et al.*, 2006) migliora l'uso del metodo *Rank Product* (www.bioconductor.com). Esso elabora dati provenienti da varie piattaforme, permette la definizione di filtri basati su valori soglia di probabilità (*p value*), individua i geni sovra e sottoespressi, e ne consente una visualizzazione grafica. Dal punto di vista statistico, è necessario siano verificate due assunzioni:

- le repliche tecniche sono da considerarsi indipendenti
- la varianza è ritenuta uguale per tutti i geni.

Il metodo ordina le repliche per valore di espressione decrescente, nel caso in cui si desideri trovare i geni sovrespressi, oppure crescente per i geni sottoespressi. In seguito assegna ad ogni gene in ogni replica la sua posizione in classifica e calcola il valore RP.

Avendo un numero n di geni g in k repliche ed essendo $r_{g,i}$ la posizione del gene in classifica, il valore RP si calcola con la seguente formula:

$$RP(g) = (\prod_{i=1}^k r_{g,i})^{1/k}$$

Per determinare il livello di significatività è necessario operare come segue:

1. generare p permutazioni di k posizioni di lunghezza n
2. calcolare il RP degli n geni nelle p permutazioni
3. conteggiare quante volte il valore di RP dei geni nelle permutazioni è più piccolo o uguale a quello osservato; indicare questo valore con c

4. calcolare la media attesa dei valori di RP con $E_{RP}(g) = c / p$
5. la percentuale di falsi positivi come $pfp(g) = E_{RP}(g) / RP(g)$.

Solo i dati che sono stati risultati omogenei sono caricati in R, sotto forma di “*data frame*”, ovvero in una matrice con intestazioni di riga e di colonna. Dopo aver calcolato RP, il file di *output* conterrà il valore di espressione di tutti i trascritti, con la relativa posizione in classifica, ed il valore di *p value* associato ad ognuno. Nell’ analisi dei dati si è deciso di considerare solo quei trascritti che presentano un *p value* inferiore al 10% (< 0.10).

2.13 CATEGORIZZAZIONE FUNZIONALE

Una volta identificati gruppi di trascritti differenzialmente espressi è necessario acquisire ulteriori informazioni su di essi e suddividerli in categorie funzionali. A tal proposito esistono numerose banche dati consultabili in rete che permettono di comprendere le funzioni molecolari dei geni ed in quali processi biologici essi sono coinvolti. Nonostante l’annotazione delle sequenze di *Mytilus galloprovincialis* stia aumentando le informazioni complessivamente disponibili rimangono ancora limitata e frammentarie. Quindi la ricerca è stata sviluppata avvalendosi di diversi database integrando con ricerche bibliografiche le informazioni acquisite per poter classificare in modo più accurato i trascritti annotati.

La fonte primaria di informazioni è stata *Gene Ontology* GO (*Gene Ontology Consortium*, 2006, <http://www.geneontology.org>). L’ontologia, ossia una sorta di vocabolario di termini biologici gerarchicamente correlati, permette di trovare in modo sistematico informazioni sui geni e sulle loro categorie funzionali. E’ molto utile in quanto fornisce definizioni strutturate e controllate, e classificazioni che spaziano in diversi domini della biologia molecolare e cellulare. GO descrive un prodotto genico utilizzando tre domini non sovrapponibili:

- a. Funzione molecolare
- b. Processo biologico
- c. Componente cellulare

Per maggiore certezza di informazioni la ricerca è stata estesa anche al *database* KEGGs (*Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes*, <http://www.kegg.com>), una risorsa integrata di banche dati correlate ai genomi completamente sequenziati o in fase di completamento. Il programma crea dei *network* tra le varie classi di dati disponibili riguardanti, ad esempio, le vie metaboliche (PATHWAY database), informazioni sui geni e sulle proteine generate da progetti di sequenziamento (GENES/SSDBO/KO database) e le reazioni biochimiche nelle quali i prodotti genici sono implicati (COMPOUND/GLYCAN/REACTION database) (Kaneihisa *et al.*, 2006).

La seguente classificazione, da noi adottata, deriva quindi dall'integrazione delle fonti discusse precedentemente.

1. Metabolismo
2. Replicazione e trascrizione
3. Fattori implicati nella traduzione
4. Assemblaggio delle proteine e modifiche post-traduzionali
5. Meccanismi di trasduzione del segnale
6. Risposta immunitaria ed infiammazione
7. Motilità della cellula
8. Adesione della cellula
9. Ciclo cellulare e apoptosi
10. Riproduzione e sviluppo
11. Sequenze prive di similarità

2.14 VALIDAZIONE DEI DATI DI ESPRESSIONE CON Q RT-PCR

I risultati ottenuti dagli esperimenti di *microarray* sono stati convalidati tramite *real-time* quantitativa (qRT-PCR). In particolare, è stato misurato il livello di espressione di una selezione di trascritti nei mitili trattati con 0.05, 0.10, 0.20 μM della miscela di metalli, rispetto ai mitili di controllo.

Per ragioni pratiche e, soprattutto, a causa dell'ammontare residuo limitato dei campioni, le analisi sono state eseguite su un *pool* costituito da quantità equivalenti di mRNA dei singoli individui (5 mitili/dose). I campioni sono stati dapprima trattati con *DNase I (RNase-free DNase kit, Qiagen)* per evitare l'eventuale contaminazione da DNA genomico.

Per ciascun *pool* di interesse sono stati utilizzati 9 μg di RNA totale per allestire 3 reazioni indipendenti di sintesi di cDNA, in presenza di 2.5 μM *random decamers (Invitrogen)*, dNTPs 10 mM e 200 U *SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)* in un vol fin di 10 μl . La reazione di retrotrascrizione è stata condotta per 2 h a 42°C, come descritto in Venier *et al.* 2006. Successivamente 1 μl di cDNA per campione è stato amplificato tramite PCR applicando il metodo *SYBR Green* in 10 μl della seguente miscela di reazione: *SybrGreen PCR Master Mix 1x (DyNAmoTMHS SybrGreen qPCR kit F-410S/L, FINNZYMES)*, *Rox passive reference dye* 1x e 0.5 μM di ciascun specifico *primer*.

La coppia di *primers* è stata progettata sulla regione 3' terminale del trascritto di interesse, in quanto questa regione risulta essere la meno conservata e quindi in grado di discriminare anche isoforme della stessa famiglia genica, e con amplicone di 100-200 pb (tab. 3). A questo scopo è stato utilizzato *Primer Express® Version 2.0 (Applied Biosystems Foster City, CA)* impostando i parametri in modo da ottenere *primer* di lunghezza compresa tra 19 e 21 pb, Tm $60 \pm 1^\circ\text{C}$ ed una composizione di G/C < 50%.

Per verificare l'effettiva specificità di amplificazione è stata sistematicamente condotta una ricerca di similarità BLAST X tra le coppie di *primers* ed amplicone verso le sequenze depositate nei database pubblici, (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.catalog.llu.edu/BLAST/>). Inoltre, ciascuna coppia di *primers* è stata sottoposta ad amplificazione PCR per accertare la presenza di un singolo prodotto di amplificazione, come evidenziato dall'elettroforesi su gel di agarosio al 1.5% (dati non riportati).

Gene	MytArray 1.0 ID	GenBank Acc. n°	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
ferritin <i>gf2</i>	Myt01-013D11	AJ625268	ATGCAGGTGCTTGTCCCTTG	GGCGTTCACCTGTCTCCAA	135
<i>gadd45γ</i>	Myt01-006C05	AJ623737	TCTGTTTCGGCCATCTCTGGT	GCACAGGAAGACGGCAGAATT	110
<i>hsp 27</i>	Myt01-013C12	AJ625244	TGTTGACAGCCCAAGGAGAAC	AACATCTTCAGCCATTGGTGC	167
<i>hsp 70</i>	Myt01-010B03	AJ624615	GCAGCCTGTCTAGTTGGCA	GCATCACAAGAGCCAGGTTTG	103
<i>hsp 90 alpha</i>	Myt01-016G09	AJ625915	TCATGGAGGCTCTCAAGCTG	CAGCTGCCGATTCCCAGATAT	147
<i>mt 10 IV</i>	Myt01-016C08	AJ625847	AGGTTGTCGCTGTGGTGAATG	CAGGAACATCCAGGTGCACAT	129
<i>mt 20 IV</i>	*	AY566247	AATGGCTGGACCTTGTAACTGC	CTTTACATCCGGAACATCCGC	128
<i>sqstm 1</i>	Myt01-007D04	AJ624024	CCTTCTGTGCCAAGTACAACCA	TCAGAAGAGAGGTCAACCAGCC	121

Tabella 3. *Primers forward e reverse* utilizzati negli esperimenti di qRT-PCR, e lunghezza dell'amplicone relativo. Tutti i *primers* sono stati progettati nella porzione 3' terminale delle EST depositate sul *MytArray 1.0* (identificate da Myt01-ID), ad eccezione del trascritto *mt 20 IV* (*), disegnato nella sequenza disponibile presso l'NCBI, poiché non presente nella piattaforma. Abbreviazioni: *gadd*– growth arrest and DNA damage inducible; *hsp* – heat shock protein; *mt* – metallothionein; *sqstm* – sequestosome.

Per condurre le amplificazioni di *real time* PCR è stato utilizzato lo strumento *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* impostando il seguente programma: un'iniziale denaturazione per 15 min a 95°C, 40 cicli composti da 30 sec di denaturazione a 95°C, 1 min di appaiamento dei *primers* ed estensione a 60°C; una fase di allungamento finale per 3 min a 72°C.

Per valutare le differenze di espressione dei trascritti *target* rispetto a un controllo endogeno (*reference*), è stato utilizzato il metodo delle curve standard. Come gene *reference* è stato scelto l'*Universal 18S rRNA (QuantumRNA™ 18S Internal Standards, Ambion)* poiché la sua espressione risulta essere essenzialmente stabile ed è stato dimostrato non variare molto anche in diverse condizioni sperimentali (Dondero *et al.*, 2005). Per evitare che, durante l'amplificazione, l'abbondanza degli rRNA 18S mascheri il segnale degli altri trascritti, sono stati aggiunti alla miscela di reazione dei *primers* competitori 18S (sintetizzati da *Ambion Inc.*), in rapporto *primers* 18S/competimeri 18S pari a 1:9.

Tutte le reazioni di amplificazione relative ai trascritti *target* e al controllo endogeno sono state condotte in triplicato.

Inizialmente, per calcolare l'efficienza della reazione, è stata costruita una curva standard, basata sulle reazioni di qRT-PCR di 4 diluizioni seriali del *pool* dei prodotti di retrotrascrizione per ciascuna dose e del controllo. L'efficienza di reazione è stata calcolata in accordo con l'equazione $E=10(-1/slope)$ (coefficiente di correlazione >0.98).

I valori di espressione relativi sono stati determinati con il metodo del $\Delta\Delta Ct$ (Livak e Schmittgen, 2001) implementato nel *software 7500 Real Time PCR*

System, ed in accordo con la formula: quantificazione relativa (RQ) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{18S})_{trattato} - (Ct_{target} - Ct_{18S})_{controllo}$, e *Ct* è il ciclo soglia.

2.15 REALIZZAZIONE DI LIBRERIE PRIMARIE E DI UNA LIBRERIA NORMALIZZATA DA TESSUTI DI MITILI STRESSATI

Per allargare la piattaforma di cDNA *MytArray1.0*, gruppi di mitili adulti sono stati trattati in condizioni controllate separatamente con: a) una miscela di composti organici (B(a)P, TCDD, aminopirene, nitropirene, fluorantene), b) una miscela di metalli pesanti (Cd, Cu, Hg), c) un cocktail di batteri inattivati al calore (*Micrococcus lysodeikticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio splendidus*) e d) biotossine. I primi tre trattamenti sono stati condotti dalla Dr. P. Venier, l'ultimo in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie; il quarto trattamento è stato condotto all'Università di Trieste (Prof. A. Pallavicini). Dopo prelievo dell'emolinfa e dissezione di vari tessuti, è stato purificato l'RNA totale sottoponendolo a controllo qualitativo Agilent. L' mRNA ed è stato isolato con l'uso *Poly(A)Purist™ mRNA Purification Kit, Ambion* e controllato all'*Agilent*. Per la produzione delle librerie primarie (realizzate dal Prof. A. Pallavicini) è stato sintetizzato il cDNA *full-length* utilizzando la tecnologia SMART, *Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech Laboratories, Inc.)*. Questo metodo permette di retrotrascrivere ed amplificare il cDNA e di incorporare le sequenze attB alle estremità 5' e 3' terminali di cDNA neosintetizzato. Adeguate quantità dei diversi cDNA sono state successivamente riunite e normalizzate usando la *crab Duplex-Specific Nuclease* come riportato in Peng *et al*, 2008. Con l'uso dell'enzima BP clonasi (*Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix, Invitrogen*) è stato ottenuto il plasmide ricombinante pDONR221 (*Invitrogen*) poi transfettato in cellule batteriche elettrocompetenti (*E. coli* DH10B). I cloni batterici ricombinanti sono stati piastrati su terreno solido, *SOB+agar e kanamicina* (50 µg/ul), e fatti crescere 16 h a 37°C. Le singole colonie sono state manualmente raccolte e inoculate ad una ad una in pozzetti di 48 micropiastre (*384-Well Low Profile Microplate, Genetix*), contenenti 50 µl di SOB + 7,5% glicerolo+ kanamicina (50 µg/µl) ed incubati per ~ 20 h a 37°C. in agitazione. Una parte delle piastre è stata inviata, assieme ad un'aliquota di *primer attB1* (5'-CTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3', Tm 50°C, al servizio di sequenziamento BMR (<http://www.bmr-genomics.it/>) dell'Università di Padova. Le restanti sono state sequenziate altrove (Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin- Germany). Le EST risultanti sono in via di processamento e di organizzazione per la realizzazione del primo database di sequenze e di dati di espressione di *Mytilus galloprovincialis*.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 PRIMA VALIDAZIONE SPERIMENTALE DEL cDNA MICROARRAY DI MITILO

L'attività svolta nel triennio del mio dottorato è riferita ad un progetto di ricerca in corso presso il Dipartimento di Biologia ed il C.R.I.B.I. riguardante lo sviluppo della genomica funzionale in mitilo (*M. galloprovincialis*).

Ho collaborato attivamente al mantenimento ed al controllo della libreria di cDNA di mitilo già esistente ed ho contribuito alla definizione, validazione ed ampliamento del primo cDNA *microarray* di mitilo (*MytArray* 1.0) realizzato presso il C.R.I.B.I. (responsabile Prof. G. Lanfranchi) in collaborazione con la Dott.ssa P. Venier ed il Prof. A. Pallavicini. In particolare, ho effettuato e messo a punto esperimenti di ibridazione competitiva ed analisi dei profili di espressione genica, allo scopo di identificare geni espressi in mitilo in diverse condizioni fisiologiche ed in risposta a stimoli nocivi.

I mitili, oltre essere una risorsa economica importante, la cui qualità va salvaguardata e certificata, rappresentano una delle classi degli organismi più comunemente impiegati nel biomonitoraggio come indicatori dello stato di qualità dell'ambiente marino costiero (rif. D.L. 152/99). Essi infatti bioaccumulano numerosi agenti inquinanti che producono danni funzionali individuabili: oltre alle analisi dei contaminanti accumulati nei tessuti molli, infatti, vengono abitualmente valutate anche alcune tipiche alterazioni indotte dagli xenobiotici. Tuttavia si tratta spesso di singole misure, non sufficienti ad interpretare lo stato funzionale complessivo e, in generale, ancora mancano o sono evidentemente carenti informazioni di tipo genetico ed, in particolare, dati di sequenza relativi ai geni ed al genoma di mitilo nel suo complesso. Per contribuire all'arricchimento delle conoscenze sui geni, sulla loro funzione e sui meccanismi coinvolti nelle loro variazioni di espressione, e per approfondire lo studio delle risposte indotte da fattori tossici e agenti patogeni, si è pensato di adottare un approccio di tipo genomico e realizzare *MytArray* 1.0. In esso sono depositate 1714 sequenze di cDNA 3' terminali rappresentative di geni espressi nei principali tessuti di mitili adulti sani, (EST, *Expressed Sequence Tags*; branchie, ghiandola digestiva, gonadi e mantello, piede, muscoli e legamenti e, in piccola quantità, emolinfa), ottenute dal sequenziamento sistematico di una prima libreria di cDNA. Il *microarray* contiene anche EST di diversa origine (vegetale e batterica), che fungono da controllo negativo negli esperimenti di ibridazione (Par. 2.4, Mat. e Met.).

Come in tutti gli organismi pluricellulari, l'organizzazione strutturale e funzionale del mitilo dipende dalla specializzazione in tipi cellulari, tessuti ed organi e qualsiasi misura di alterazione biologica deve fondarsi sul riconoscimento delle specificità funzionali dell'organismo in condizioni normali. Per questo motivo i primi studi che abbiamo condotto utilizzando il *MytArray* 1.0 miravano ad

individuare i geni che vengono normalmente attivati nei mitili in condizioni fisiologiche, in modo da ottenere l'impronta trascrizionale del tessuto. I tessuti analizzati sono stati le branchie, la ghiandola digestiva, i tessuti implicati in motilità/contrazione (piede, muscoli adduttori, legamenti) e nella funzione riproduttiva (gonadi e mantello). Come riportato in Venier *et al.*, 2006, è stato possibile identificare numerosi trascritti tessuto-specifici, marcatori della funzionalità dei tessuti in esame. Ad esempio, il generale deficit trascrizionale osservato in gonadi e mantello confermava in questi mitili l'avvenuta emissione dei gameti, la ghiandola digestiva risultava caratterizzata da trascritti riferibili a trasformazioni metaboliche mentre nei tessuti coinvolti nella motilità/contrazione sono risultati ben rappresentati trascritti quali calponina, tropomiosina e actina ma anche trascritti (*twitchin*, *catchin*) che nel mitilo spiegano la forte e duratura capacità di contrazione a valve chiuse (*catch status*).

Successivamente la piattaforma *MytArray* 1.0 è stata utilizzata per studiare i profili trascrizionali tessuto-specifici di mitili trattati in condizioni controllate con due miscele rappresentative di inquinanti ambientali (composti organici e metalli pesanti) a dosi capaci di indurre lesioni premutagene, ossia danni strutturali al DNA misurabili come micronuclei o addotti di tipo aromatico (Bolognesi *et al.*, 1999, Canova *et al.*, 1998). Si è così dimostrato che i tessuti maggiormente responsivi ed in grado di discriminare a livello trascrizionale i due tipi di trattamento sono le branchie e la ghiandola digestiva. In realtà, nelle branchie il trattamento con sali solubili di Cd, Cu e Hg (0.1 μmol di ogni metallo, ogni 12 h per due giorni) ha indotto numerose e significative variazioni trascrizionali mentre il trattamento con composti organici (0.05 μM di benzo[a]pirene, fluorantene, 1-nitropirene, 1-aminopirene e 0.55 nM TCDD) sembra non aver sostanzialmente alterato l'espressione genica. D'altra parte, l'analisi dei profili trascrizionali della ghiandola digestiva ha chiaramente distinto l'effetto dei metalli pesanti da quello dei composti organici. Questa situazione può essere ragionevolmente spiegata con la diversa competenza dei due tessuti ad assorbire e attivare quei composti che richiedono attivazione metabolica per esplicare la loro tossicità. La ghiandola digestiva, infatti, rappresenta il sito di maggior bioaccumulo e di potenziale detossificazione (Marigómez *et al.*, 2002) e la complessità delle vie biochimiche attive in questo tessuto può spiegare le molteplici alterazioni trascrizionali osservate (Venier *et al.*, 2006).

3.2 AMPLIFICAZIONE DELLA COLLEZIONE DI 3' CDNA DI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

Per poter effettuare gli esperimenti di ibridazione competitiva tra cDNA *target* marcato e le sonde depositate sul vetrino è stato necessario ri-amplificare la collezione originale di EST 3' terminali di *M. galloprovincialis*, e dei relativi controlli negativi. Viene, in questo modo, minimizzato il consumo delle colture madri conservate in micropiastre a -80°C (condizione essenziale per preservare al più a lungo possibile l'archivio fisico) e si ottiene la quantità di cDNA utile a produrre nuovi *MytArray* 1.0.

Questa operazione ha richiesto tempi lunghi (diversi mesi) sia per rinfrescare i cloni costituenti l'archivio fisico (19 micropiastre da 96 pozzetti) sia per ottimizzare le condizioni di coltura e il protocollo delle reazioni di PCR. Un impegno ulteriore è stato necessario nei successivi controlli, qualitativi e quantitativi, dell'esito delle amplificazioni. Tutti gli inserti, infatti, sono stati verificati in gel d'agarosio e, nei casi in cui l'amplificazione sia risultata fallita o in presenza di doppie bande, si è proceduto con la ri-amplificazione e purificazione dei cloni corrispondenti (fig. 17a)(Par. 2.2, Mat. e Met.). Dopo quantificazione (conc minima richiesta: 50 ng/ μl , fig. 17b), i cDNA purificati sono stati deposti sul vetrino tramite una stazione robotizzata (Par 2.3, Mat e Met) ed il *MytArray* 1.0 è stato utilizzato per effettuare nuovi esperimenti di ibridazione competitiva.

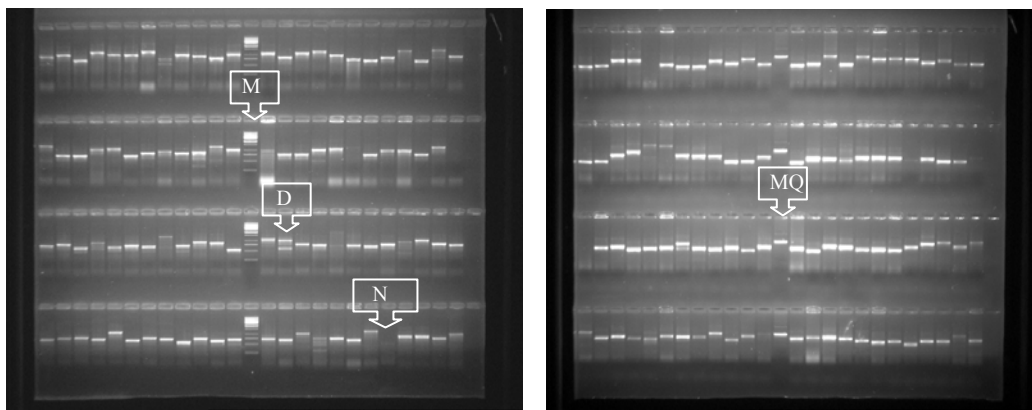


Figura 17: a. Controllo degli amplificati PCR (3' cDNA) in gel d' agarosio, D: doppia banda, M: marcatore di peso molecolare, N: amplificazione non riuscita. **b.** Quantificazione in gel di agarosio degli amplificati PCR dopo purificazione. MQ: marcatore di quantità (50 ng/ μl).

3.3 ALTERAZIONI TRASCRIZIONALI E DANNO GENOTOSSICO DA METALLI PESANTI IN MITILO

Questa parte sperimentale del mio dottorato di ricerca amplia i risultati inizialmente ottenuti e valuta la capacità del *Mytarray* 1.0 di discriminare a livello trascrizionale mitili trattati con dosi scalari della stessa miscela di metalli pesanti sopra descritta. Può lo studio dei profili di espressione genica mediante cDNA

microarray essere informativo del diverso livello di esposizione a composti xenobiotici? Può, inoltre, l'impronta trascrizionale fornire rispetto ai biomarcatori tradizionali una migliore interpretazione degli effetti prodotti da contaminanti ambientali?

Per poter dare una prima risposta a queste domande è stato allestito in laboratorio il trattamento dei mitili con dosi nominali 0.05, 0.10 e 0.20 μM della miscela dei metalli (quantità equimolari di Cd, Cu, Hg, ogni 12 h per due giorni). Movimenti valvari, adesività e produzione di pseudofeci non sono risultate visivamente alterate nei mitili trattati. Un quarto gruppo di mitili è stato mantenuto nelle medesime condizioni sperimentali ma senza trattamento, in modo da poter essere utilizzato come controllo. (Par. 2.5, Mat. e Met.).

I metalli scelti per comporre la miscela di trattamento sono tra gli inquinanti presenti nelle acque-marino costiere. Il rame è uno dei più efficaci biocidi dell'ambiente acquatico. Il mercurio è ben noto per l'elevata neurotossicità e nefrotossicità della sua forma alchilata (metilmercurio) in grado di oltrepassare le membrane biologiche; può entrare nella catena alimentare e, per consumo di pesce proveniente da zone inquinate, può causare problemi anche all'uomo. Il cadmio è un noto agente genotossico e cancerogeno umano. Gli effetti biologici potenzialmente indotti da questi contaminanti sono molteplici. A livello intracellulare possono alterare la struttura e la funzione di vari organelli e indurre danno ossidativo. La tossicità può manifestarsi a livello enzimatico, alterando specifiche vie biochimiche o interferendo con l'azione di varie proteine. Gli ioni metallici possono legarsi interagire con gli acidi nucleici, danneggiandoli e provocando effetti genotossici. Metallotioneine, lisosomi, granuli intracellulari ed extracellulari contribuiscono al sequestro di metalli potenzialmente tossici, prevenendone o limitandone gli effetti citotossici.

Nei tre gruppi di mitili trattati e nei mitili di controllo sono state valutate in parallelo, i livelli di danno genetico in cellule branchiali (Par. 2.6, Mat. e Met.) e, l'entità delle alterazioni trascrizionali misurabili in branchie e ghiandola digestiva mediante analisi su *MytArray* 1.0 (Par. 2.10, Mat. e Met.).

3.3.1 MICRONUCLEI E ANOMALIE NUCLEARI NEI MITILI TRATTATI CON METALLI PESANTI

Le branchie di organismi filtratori come i mitili sono il primo tessuto bersaglio dei contaminanti acquatici e, in mitilo, è dimostrata una correlazione positiva fra inquinamento e induzione di micronuclei (MN) in cellule branchiali di tipo epiteliale (Dailianis *et al.*, 2003; Kalpaxis *et al.*, 2004; Bolognesi *et al.*, 2004; Venier e Zampieron, 2005). I MN sono corpuscoli di cromatina delimitati da membrana che appaiono distinti dal nucleo principale durante l'interfase. Essi possono essere costituiti sia da frammenti cromosomici sia da cromosomi interi

come risultato di un'alterata separazione e migrazione anafasica-telofasica. Un incremento della frequenza di cellule con MN indica quindi danno cromosomico e, aspecificamente, l'esposizione ad agenti clastogeni ed aneuploidizzanti. Anche l'analisi delle anomalie nucleari (AN) quali cellule bi-nucleate o con MN non classificabili come tali pur essendo un parametro più grossolano, può facilitare e consolidare l'interpretazione dei dati sui MN.

Dopo disaggregazione del tessuto branchiale ed allestimento dei preparati citologici, le frequenze di ialinociti con MN (fig 18a) o con AN (fig 18b,c) sono state analizzate individualmente nei mitili di controllo e nei mitili trattati con metalli (5 mitili/punto dose). Sulla base della classificazione effettuata al microscopio sono state calcolate le frequenze individuali, medie e relative deviazioni standard e le frequenze significativamente alterate rispetto (i valori ottenuti per ogni dose sono stati confrontati con quelli dei mitili di controllo).

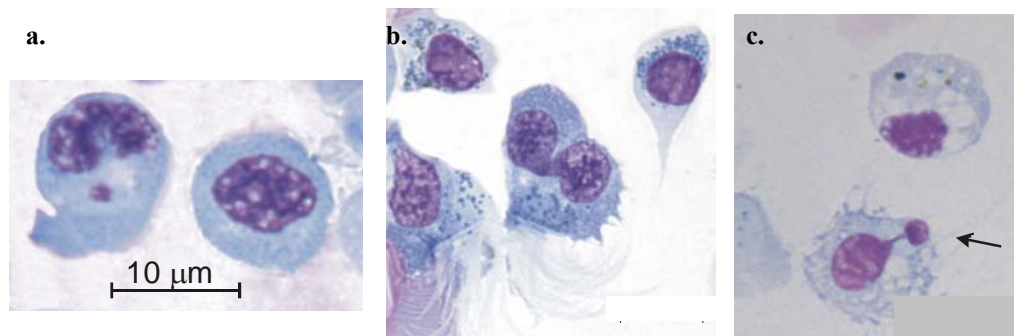


Figura 18. Cellule epiteliali branchiali di mitilo con **a)** micronucleo; **b)** cellula bi-nucleata **c)** cellula con MN ancora collegato al nucleo principale da un ponte cromatinico. (Foto di M. Zanella).

Come illustrato dal grafico (fig. 19), rispetto ai mitili di controllo, dove è evidente un certo livelli di induzione spontanea di MN e AN, nei mitili trattati con le dosi 0.05, 0.10 e 0.20 μM della miscela contaminante è stato osservato un incremento significativo nella frequenza di cellule micronucleate pari a 1.67, 2.93 e 3.96 volte, e di AN pari a 1.60, 1.63 e 2.34 volte.

Questi risultati indicano che la miscela di trattamento utilizzata ha provocato danno cromosomico indotto in misura dose-dipendente.

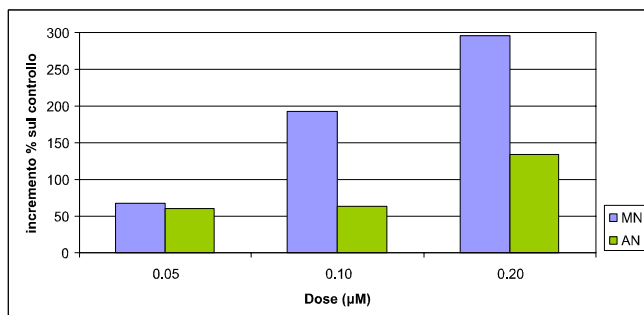


Figura 19. Incremento medio percentuale delle cellule con micronuclei (MN) e con anomalie nucleari (AN) nei mitili sperimentali rispetto al controllo (tutti gli incrementi sono significativi per $p < 0.05$; G test).

3.3.2 PROFILI TRASCRIZIONALI DEI MITILI TRATTATI CON METALLI PESANTI

I profili di espressione genica dei mitili trattati con metalli pesanti sono stati valutati in due tessuti: branchie, in quanto rappresentano il primo tessuto esposto all'azione dei contaminanti disciolti nell'acqua, e ghiandola digestiva, sito principale di bioaccumulo e del metabolismo.

L'analisi è stata effettuata scegliendo casualmente tre mitili per ciascuna dose.

L'RNA totale purificato da ogni campione di branchia e di ghiandola digestiva è stato controllato con l'*Agilent 2100 Bioanalyzer*, poiché solo l'RNA di ottima qualità può essere utilizzato negli esperimenti di ibridazione competitiva (Par. 2.8, Mat. e Met.). L'RNA di ogni singolo mitilo trattato è stato ibridato su *MytArray* 1.0 contro un *pool*, costituito da uguali quantità di RNA totale purificato dai medesimi tessuti dai mitili di controllo: per ogni mitilo sono stati allestiti due esperimenti di ibridazione competitiva (A e B) invertendo la marcatura con i fluorofori. Poiché ogni *array* contiene 2 repliche dello stesso *probe*, in totale si ottengono 4 valori di fluorescenza per ogni EST rappresentata sul *microarray* (Par. 2.10, Mat. e Met.). Dopo l'acquisizione dell'immagine e la normalizzazione dei dati è stato calcolato il \log_2 del rapporto tra l'intensità di fluorescenza del campione test ed il controllo.

Quando si analizzano i profili di espressione genica è necessario dapprima poter accertare la riproducibilità dei risultati ottenuti dall'ibridazione condotta in *dye-swap* (A e B) sullo stesso campione. Per questo motivo è stata applicata un'analisi di raggruppamento gerarchico sui dati normalizzati utilizzando la correlazione di Pearson con J-Express, che permette di valutare qualitativamente i dati, raggruppando i profili trascrizionali con andamento omogeneo (Par. 2.11.3, Mat. e Met.).

I dendrogrammi ottenuti mostrano che i profili di espressione relativi ad uno stesso mitilo risultano sempre raggruppati assieme, sia nelle branchie sia in ghiandola digestiva (fig. 20), indicando l'affidabilità delle repliche tecniche e del protocollo di ibridazione su *MytArray* 1.0.

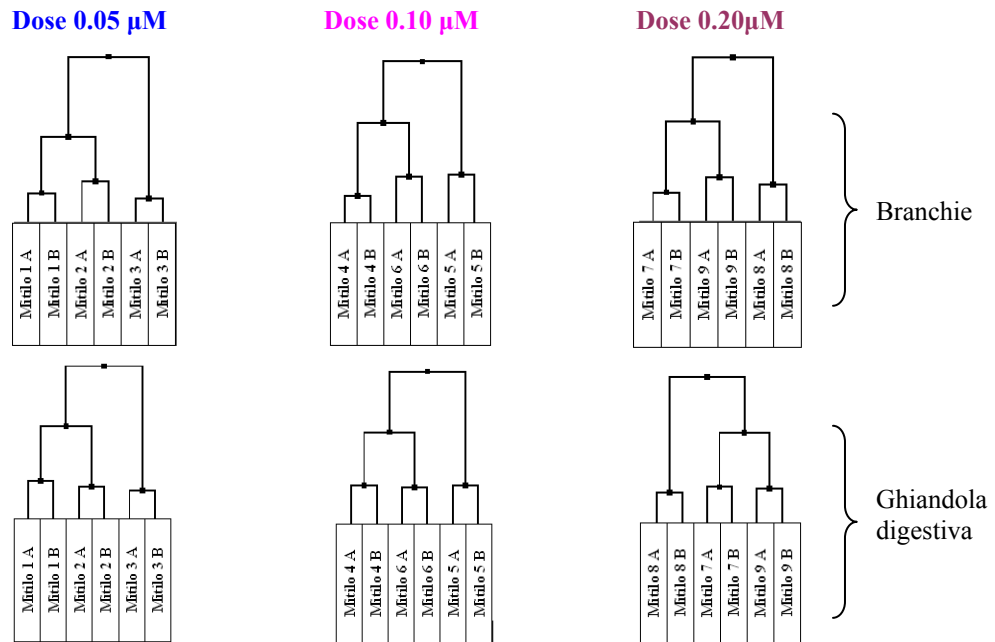


Figura 20: Dendrogrammi ottenuti con J-Express (correlazione di Pearson) utilizzando i dati relativi ai profili di espressione dei singoli mitili (18 esperimenti di ibridazione, 3 mitili/dose). Con A/B sono indicati i due esperimenti in reciproco (A= controllo marcato Cy5 e trattato marcato Cy3; B= controllo marcato Cy3 e trattato marcato Cy5).

Una volta verificata la riproducibilità dei dati ottenuti, sono stati mediati i valori di espressione di ogni trascritto ($N=4$) per i 3 mitili di ogni singola dose, ripetendo quindi l'analisi di raggruppamento gerarchico. Dai dendrogrammi riportati in fig. 21 risulta evidente che, in entrambi i tessuti, i profili trascrizionali dei mitili trattati con le due dosi più alte della miscela di metalli, vengono raggruppati insieme mostrando un andamento più simile tra loro rispetto al profilo relativo alla dose più bassa.

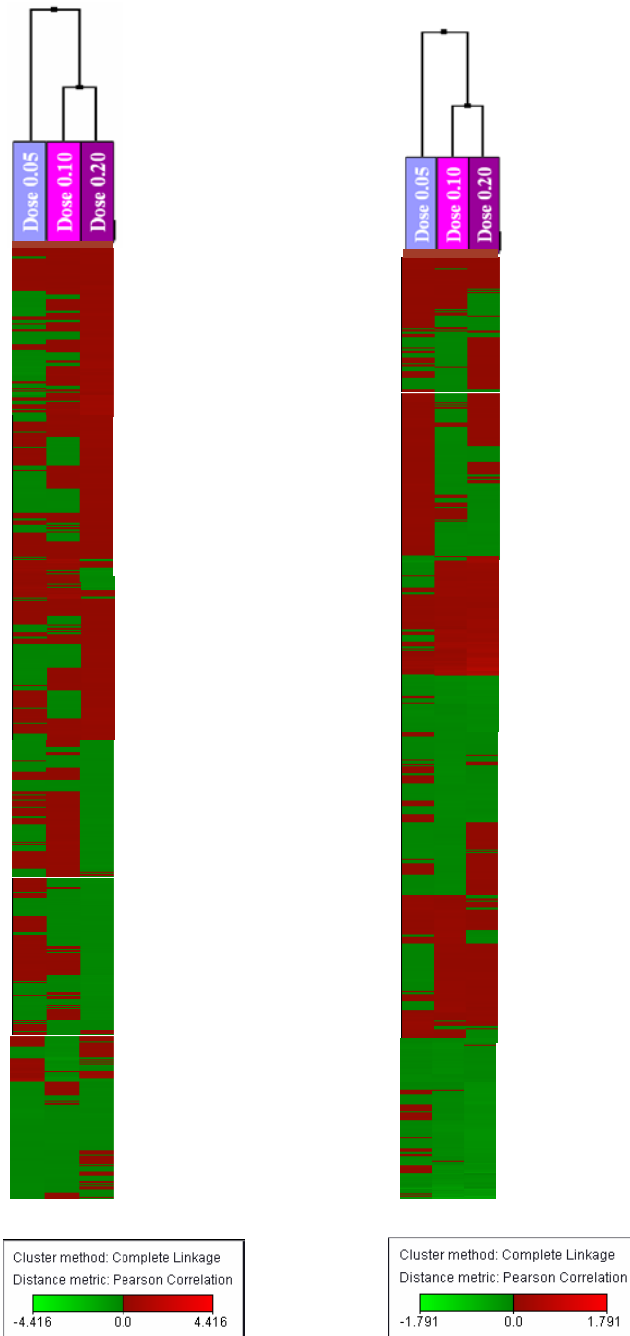


Figura 21: Dendrogrammi ottenuti con J-Express (correlazione di Pearson) utilizzando i dati medi relativi ai profili di espressione dei mitili trattati con metalli pesanti (3 mitili/dose). E' riportato solo 1/5 del dendrogramma originale.

Per identificare i geni differenzialmente espressi nei mitili trattati rispetto ai mitili di controllo è stato utilizzato il metodo statistico SAM, *Significance Analysis of Microarray* che individua soltanto i geni significativamente sovra- o sotto-espressi aventi repliche omogenee (Par. 2.12.1, Mat. e Met.). Per l'analisi sono stati adottati i criteri più restrittivi possibili, in modo da ridurre il numero di falsi positivi (FDR). La tab. 3 riassume il numero di geni differenzialmente espressi rilevati in ciascun tessuto e per ciascuna dose di trattamento.

Tessuto	Dose	Geni totali espressi differenzialmente	Sovra espressi	Sotto espressi	FDR
Branchie	0.05 μ M	27	18	9	3,0 %
	0.10 μ M	161	75	86	1,3 %
	0.20 μ M	372	205	167	1,3 %
Ghiandola digestiva	0.05 μ M	41	33	8	1,9 %
	0.10 μ M	38	12	26	1,9 %
	0.20 μ M	41	18	23	1,9 %

Tabella 3: Numero di geni differenzialmente espressi nella ghiandola digestiva e nelle branchie dei mitili trattati con le tre dosi della miscela di metalli pesanti (SAM *One Class*, FDR: *False Discovery Rate*).

Nel loro insieme, i risultati ottenuti indicano che il trattamento *in vivo* dei mitili con Hg, Cd e Cu ha causato alterazioni trascrizionali di diversa entità secondo la dose ed il tessuto in esame, senza tuttavia causare depressione generalizzata delle funzioni cellulari (il numero dei geni significativamente sottoespressi è simile a quello dei sovraespressi, non prevalente). In realtà, tali alterazioni trascrizionali sono di maggiore entità nel tessuto branchiale rispetto alla ghiandola digestiva (372 e 41 alla dose 0.2 μ M, 161 e 38 alla dose 0.1 μ M, rispettivamente) con incremento dose-dipendente. Il numero relativamente limitato (27) di geni differenzialmente espressi nelle branchie alla dose 0.05 μ M ed il più elevato FDR ad esso associato ($\sim 1/27$ falsi positivi) suggerisce una minore tossicità, seppur ancora rilevabile, rispetto alle dosi maggiori così confermando l'andamento dei dendrogrammi. (fig. 21). Nella ghiandola digestiva, il trattamento sembra modificare il profilo trascrizionale in modo limitato ed indipendentemente dalla dose (il numero di trascritti alterati è pressoché identico nei tre gruppi di mitili trattati). I risultati ottenuti per questo tessuto, certamente complesso ma capace di discriminare entrambi i tipi di trattamento (composti organici e metalli), indicano la necessità di ulteriore sperimentazione così da capire in che grado branchie e ghiandola digestiva di mitilo siano tessuti bersaglio dell'azione tossica dei metalli pesanti e quali variabili sperimentali (dal trattamento dei mitili all'analisi su DNA *microarray*) possano ridurre significativamente l'informatività dei risultati. La storia sperimentale di questi campioni di ghiandola digestiva, passati per più mani e avviati infine correttamente all'analisi trascrizionale diverso tempo dopo rispetto a quelli di tessuto branchiale può aver influenzato i risultati.

Seppur meno informativi rispetto a quelli del tessuto branchiale, i profili trascrizionali ed i geni trovati differenzialmente espressi nella ghiandola digestiva dei mitili trattati con metalli pesanti suggeriscono meccanismi di tossicità e di risposta tessuto-specifici, riconducibili alla varietà delle sottopopolazioni cellulari e alla loro specializzazione funzionale.

Da un'analisi più approfondita dei geni differenzialmente espressi in branchia e ghiandola digestiva dei mitili trattati si rileva una risposta dose- e tessuto-specifica. Infatti, in entrambi i tessuti analizzati, i trascritti comuni tra le 3 dosi, individuati da SAM come differenzialmente espressi in modo significativo rispetto al controllo, sono pochi (fig. 22).



Figura 22. I diagrammi di Venn illustrano il numero di trascritti differenzialmente espressi unici e comuni tra dosi di trattamento (analisi SAM tra dosi). I 4 e 5 trascritti comunemente alterati rispettivamente nel tessuto branchiale (B) e nella ghiandola digestiva (GD) sono: in B, Myt01-016G09 (*hsp90*), Myt01-011G05 (*putative hsp*), Myt01-003C09 (*eukaryotic translation initiation factor 5A*), Myt01-015C02 (*tubulin α 3in G*), Myt01-016C08 (*metallothionein 10IV*), Myt01-011D05 (*cathepsin L*), Myt01-015H12 (*cytoplasic actin II*), Myt01-006H04 e Myt01-017C08 (*whitout similarity*).

In fig. 23 è riportata una selezione di trascritti con andamento differenziale di espressione, a seconda della dose sperimentalmente applicata

GD	ID array	Description	Expression value (log2)		
			0.05	0.10	0.20
	Myt01-007H08	microfibrillar-associated protein 1 [<i>Mus musculus</i>]	-0.06	-0.35	-0.53
	Myt01-008B03	Spondin 1; VSGP/F-spondin [<i>Pan troglodytes</i>]	-0.08	-0.13	-0.47
	Myt01-002C11	Integumentary mucin C.1 (FIM-C.1)	-0.33	-0.31	-0.75
	Myt01-003E07	Thymosin, beta 4 [<i>Mus musculus</i>]	-0.41	-0.28	-0.53
	Myt01-006H12	Cytoplasmic actin CytII [<i>Helicidaris erythrogramma</i>]	-0.57	-0.66	-0.73
	Myt01-015C02	Cytoplasmic actin [<i>Dreissena polymorpha</i>]	-0.34	-0.34	-0.96
	Myt01-011E03	hemoelectin CG7002-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]	-0.17	-0.79	-0.90
	Myt01-016A08	Alpha 3 type VI collagen [<i>Homo sapiens</i>]	0.82	-0.10	-0.84
	Myt01-006H04	Whitout similarity	0.59	-0.71	-1.38
	Myt01-012D12	Matrilin 3 [<i>Mus musculus</i>]	1.02	-0.42	-1.74
	Myt01-015G12	Matrilin 2 precursor [<i>Homo sapiens</i>]	0.79	-0.76	-1.55
	Myt01-010B10	Precollagen-D [<i>Mytilus galloprovincialis</i>]	0.54	-0.11	-0.08
	Myt01-012A02	Elongation factor 1-alpha [<i>Mytilus edulis</i>]	0.73	-0.10	-0.10
	Myt01-012E12	Whitout similarity	0.55	-0.75	-0.63
	Myt01-002H12	Myc homolog [<i>Crassostrea virginica</i>]	-0.48	0.54	0.17
	Myt01-011E05	Vitellogenin coat protein 41 [<i>Tegula pfeifferi</i>]	-0.08	0.90	0.42
	Myt01-007F09	F 16S ribosomal RNA gene [<i>Mytilus trossulus</i>]	-0.02	0.36	0.34
	Myt01-004C08	Whitout similarity	-0.01	0.80	0.69
	Myt01-016C08	Metallothionein 10IV [<i>Mytilus edulis</i>]	0.84	1.15	1.48
	Myt01-017F02	Cathepsin L precursor [<i>Hydra vulgaris</i>]	0.36	0.93	0.98
	Myt01-014E05	Putative heat shock-related protein [<i>Dermaconator variabilis</i>]	0.03	0.38	0.60

Mean expression value (log₂; N=3)

B	ID array	Description	Expression value (log2)		
			0.05	0.10	0.20
	Myt01-007H08	baculoviral IAP 3; apoptosis inhibitor 2 [Mus musculus]	-0.73	-1.54	-1.29
	Myt01-008B03	Whitout similarity	-0.56	-1.55	-1.52
	Myt01-002C11	Gal/GalNAc-specific lectin [Rattus norvegicus]	-0.32	-0.95	-1.28
	Myt01-003E07	beta-tubulin [Halocynthia roretzi]	-0.26	-0.87	-0.94
	Myt01-006H12	tubulin alpha 4 [Mus musculus]	-0.13	-0.52	-0.50
	Myt01-015C02	tubulin alpha 3 [Mus musculus]	-0.25	-0.51	-0.57
	Myt01-011E03	Whitout similarity	-0.11	-0.70	-0.77
	Myt01-016A08	vitelline coat protein 42 [Tegula pfeifferi]	-0.05	-0.32	-0.64
	Myt01-014F09	CG10903-PA [Strongylocentrotus purpuratus]	-0.10	-0.50	-0.65
	Myt01-012D12	cytoplasmic actin [Dreissena polymorpha]	-0.16	-0.35	-0.38
	Myt01-015G12	precollagen-D [Mytilus galloprovincialis]	-0.07	-0.34	-0.42
	Myt01-010B10	alpha 1 type XII collagen short isoform precursor [Homo sapiens]	0.07	-0.96	-1.00
	Myt01-012A02	Whitout similarity	0.01	-0.37	-0.46
	Myt01-011E05	Whitout similarity	0.03	-0.70	-0.56
	Myt01-002H12	cysteine-rich motor neuron 1 [Homo sapiens]	0.24	-0.52	-0.48
	Myt01-011E05	Whitout similarity	0.03	-0.70	-0.56
	Myt01-007F09	RNA-dependent helicase p68 (DEAD-box p68) [Mus musculus]	0.05	-0.58	-0.46
	Myt01-019B08	Mitochondrial-ND6	0.16	-0.50	-0.72
	Myt01-015A11	6-phosphogluconolactonase [Homo sapiens]	0.08	-0.27	-0.55
	Myt01-017F02	alpha 3 type VI collagen [Homo sapiens]	0.05	-0.33	-0.32
	Myt01-014E05	collagen pro alpha-chain [Haliotis discus]	0.12	-0.36	-0.68
	Myt01-003H01	calmodulin [Plasmodium falciparum 3D7]	0.08	-0.28	-0.52
	Myt01-006G10	cytochrome c oxidase subunit I (COI) [Mytilus edulis]	0.11	-0.26	-0.45
	Myt01-013D11	ferritin GF2 [Crassostrea gigas]	-0.21	-0.06	0.84
	Myt01-016C08	metallothionein 10IV [Mytilus galloprovincialis]	-0.36	0.52	1.57
	Myt01-015F11	precerebellin-like protein [Oncorhynchus mykiss]	-0.02	0.73	0.68
	Myt01-007D02	26S proteasome-associated pad1 homolog [Homo sapiens]	-0.03	0.39	0.31
	Myt01-002C12	transmembrane protein 32 [Homo sapiens]	-0.07	0.34	0.30
	Myt01-018H05	Whitout similarity	-0.07	0.33	0.38
	Myt01-018H05	40S ribosomal protein S12 [Homo sapiens]	-0.04	0.38	0.46
	Myt01-007G05	Whitout similarity	-0.07	0.32	0.28
	Myt01-018F02	ribosomal protein S27E [Mytilus galloprovincialis]	-0.01	0.41	0.55
	Myt01-002A11	small nuclear ribonucleoprotein B [Mus musculus]	-0.16	0.45	0.60
	Myt01-012F11	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma [Artemia sp.]	-0.09	0.24	0.66
	Myt01-014G06	elongation factor 1-alpha (EF1a) [Mytilus edulis]	-0.03	0.14	0.65
	Myt01-016F07	proteasome Z subunit [Ciona intestinalis]	-0.25	0.08	0.51
	Myt01-012G07	O-methyltransferase [Aequifex aeolicus]	-0.11	0.14	0.68
	Myt01-013G06	ubiquitin/ribosomal proteinS27a [Branchiostoma belcheri tsingtaunese]	-0.10	0.03	0.29
	Myt01-011C12	protein transport protein SEC61 alpha subunit [Halocynthia roretzi]	-0.09	0.05	0.26
	Myt01-018G07	SEC63, endoplasmic reticulum translocon component [Homo sapiens]	-0.01	0.02	0.37
	Myt01-013B07	importin 7; RAN-binding protein 7 [Homo sapiens]	-0.19	0.02	0.34
	Myt01-003A02	leucyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	-0.22	0.13	0.31
	Myt01-003C05	Myc homolog [Crassostrea virginica]	-0.08	0.07	0.26
	Myt01-001D03	40S ribosomal protein S26 [Suberites domuncula]	-0.05	0.22	0.34
	Myt01-003G10	alpha-1 (III) collagen [Homo sapiens]	-0.11	0.05	0.23
	Myt01-003E08	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G [Homo sapiens]	0.02	0.61	0.34
	Myt01-017B01	selenide,water diiknase CG8553-PA [Drosophila melanogaster]	0.03	0.43	0.33
	Myt01-011H08	precollagen-D [Mytilus galloprovincialis]	0.02	0.65	0.64
	Myt01-013D03	proteasome alpha 2 subunit; proteasome subunit HC3 [Homo sapiens]	0.04	0.10	0.55
	Myt01-006C05	GADD45-gamma [Strongylocentrotus purpuratus]	0.08	0.16	0.67
	Myt01-003G03	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit [Gallus gallus]	0.14	0.41	0.70
	Myt01-006B11	polyubiquitin [Tribolium castaneum]	0.08	0.35	0.84
	Myt01-012G04	microsomal glutathione S-transferase 3 [Mus musculus]	0.02	0.32	0.40
	Myt01-001H12	ADP-ribosylation factor 2 [Mus musculus]	0.13	0.62	0.72
	Myt01-012A04	FK506-binding protein 2 CG11001-PA [Drosophila melanogaster]	0.15	1.07	0.98
	Myt01-014C10	Whitout similarity	0.08	0.92	1.58
	Myt01-014B11	heat shock protein 70 [Crassostrea gigas]	0.13	0.90	1.31
	Myt01-014B06	chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta) [Danio rerio]	0.29	0.45	0.68
	Myt01-016G09	heat shock protein 90-alpha [Danio rerio]	0.39	0.46	1.25
	Myt01-010B03	heat shock protein HSP70 (hsp70) [Mytilus edulis]	0.48	0.56	1.07
	Myt01-013C12	heat shock 27kDa protein 2 [Strongylocentrotus purpuratus]	0.27	0.77	1.10
	Myt01-011G05	putative heat shock-related protein [Dermacentor variabilis]	0.44	0.67	1.56
	Myt01-007D04	sequestosome 1 [Mytilus edulis]	1.05	3.34	4.42



Figura 23: Selezione di geni differenzialmente espressi in ghiandola digestiva (GD) e branchie (B) dei mitili trattati, con i livelli relativi di espressione (log₂ trattato/controllo) che mostrano d’insieme un andamento crescente o decrescente rispetto alla dose di trattamento. Per ogni dose, le alterazioni trascrizionali individuate come significative dall’analisi SAM sono sottolineate. I colori, secondo la scala cromatica riportata, visualizzano i livelli di sovra- e sotto-espressione. In grassetto sono riportati i trascritti convalidati in real-time PCR, par. 3.3.3, Risult e Discuss.). Le liste complete dei geni differenzialmente espressi in B e DG sono riportate altrove.

E' noto dalla letteratura che l'esposizione a stress chimici, induce comunemente la sovraespressione di vari meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo (Emmanouil *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2005; Ercal *et al.*, 2001). L'esposizione dei mitili alla miscela di metalli pesanti ha provocato, in entrambi i tessuti analizzati, l'induzione, con andamento dose correlato, di trascritti codificanti per le *Heat Shock Proteins* (HSP), in particolare l'isoforma *hsp 90* ed una *putative smallHsp (sHsp)*; in branchia sono inoltre sovraesprese la *hsp 70* e la *hsp 27*. Le HSP sono proteine ubiquitarie, classificate in famiglie sulla base di omologie di sequenza e del peso molecolare. Rivestono un ruolo importante nell'assemblaggio (*foldings*), nella segregazione e nella degradazione delle proteine. Alcuni membri delle varie famiglie sono espressi in modo costitutivo, altri vengono indotti in seguito a diversi fattori ambientali: aumento della temperatura, *stress* osmotici e ossidativi, infiammazione e esposizione a metalli pesanti (Snyder *et al.*, 2001; Hamer *et al.*, 2004; Ohtsuka *et al.*, 2005). E' noto che metalli pesanti, in particolare cadmio (Gottschalg *et al.*, 2006; Kültz, 2005; Simpson *et al.*, 2005; Somji *et al.*, 2002) e mercurio (Fremont *et al.*, 2006;), aumentano l'espressione di *hsp* specifiche in diversi tipi cellulari. Franzellitti e Fabbri (2005) hanno dimostrato che, in mitilo, a seconda del tempo di esposizione al calore, a Hg²⁺ o a Cr⁶⁺, vengono trascritte due diverse isoforme geniche delle *hsp70s*. In particolare, l'espressione di *Mghsp70* è fortemente indotta nella fase acuta di risposta all'esposizione e torna a livelli basali dopo esposizioni a lungo termine, dove invece si assiste ad un'induzione della trascrizione di *Mghsp70*.

L'aumento dell'espressione di tali *chaperon* molecolari nei mitili trattati può essere ricondotto al tentativo delle cellule di ripristinare la conformazione nativa di proteine che l'hanno perduta, oppure alla degradazione di proteine irreversibilmente danneggiate, in risposta a stress ossidativi.

Nelle branchie dei mitili trattati sono risultate sovraespressi numerose subunità componenti il proteasoma (ad es., *proteasome Z subunit*, *proteasome alpha 2 subunit 26S*, *proteasome-associated pad1*), la poliubiquitina, il sequestosoma e diverse proteine ribosomiali, in numero crescente all'aumentare della dose. Il proteasoma è un complesso enzimatico in grado di riconoscere e degradare le proteine coniugate ad una catena di poliubiquitina; tali proteine devono essere distrutte o perché non sintetizzate in maniera corretta, o perché danneggiate in seguito a condizioni di stress (Dahlmann, 2005). Il sequestosoma è risultato essere il trascritto con il maggior livello di sovraespressione rispetto al controllo (di 10 volte alla dose 0.10 µM e ben di 21 volte alla dose 0.20 µM); esso interagisce con la coda di poliubiquitina e sembra svolgere un ruolo essenziale nel trasporto delle proteine da degradare al complesso enzimatico del proteasoma (Seibenhener *et al.*, 2004). La sovraespressione di questo gruppo di geni nei mitili trattati permette di ipotizzare che i metalli inducano modificazioni tali da richiedere un elevato *turnover* proteico. A sostegno di quest'ipotesi, nelle branchie alle dosi 0.10 e 0.20

μM risultano sovraespressi *sec63* e *sec61*, appartenenti ad una famiglia genica che codificano per complessi proteici localizzati nelle membrane del reticolo endoplasmatico che guidano il trasporto di proteine destinate alla degradazione nel proteasoma.

Tra i biomarcatori già utilizzati per valutare l'esposizione del mitilo e di altri organismi acquatici ad inquinanti chimici vi è la misura dell'espressione della glutatione S-tranferasi, *gst* (Fitzpatrick *et al.*, 1997). Le *GST* sono enzimi di fase II del metabolismo degli xenobiotici. La loro funzione viene considerata centrale nella protezione dal danno ossidativo e svolgono un ruolo fondamentale nella detossificazione di sostanze potenzialmente cancerogene quali gli idrocarburi aromatici policiclici. In alcuni casi tuttavia si è osservata la loro induzione anche in presenza di metalli pesanti quali Cu, Hg e Cd. In particolare, in uno studio condotto su *M. galloprovincialis* è stato osservato un aumento dell'espressione di GST in branchie e ghiandola digestiva di mitili trattati con HgCl_2 (Khessiba *et al.*, 2001) e Cd (Hoarau *et al.*, 2006). Nel *MytArray* 1.0 è presente un'isoforma della GST che ha mostrato una sovra-espressione dose-dipendente nelle branchie dei mitili trattati rispetto il controllo.

Nelle branchie si osserva anche un incremento della trascrizione di *gadd45 γ* (*growth arrest and DNA damage inducible*), notoriamente coinvolto nei meccanismi di riparazione del danno al DNA. L'espressione di *gadd45* è regolata da *p53* in condizioni di stress. Esso contribuisce all'arresto del ciclo cellulare in G_2/M , alla riparazione del DNA danneggiato e al controllo della stabilità del genoma (Mak e Kültz, 2004; Carrier *et al.*, 1999); la sua induzione permette quindi di ipotizzare la presenza di danno genetico, in accordo con i risultati ottenuti dal test del MN nei medesimi campioni. Vi sono inoltre evidenze che dimostrano come l'espressione di *gadd45 γ* sia indotta durante l'apoptosi, anche se rimane ancora da chiarire se tale proteina sia coinvolta nell'induzione dell'evento o nella protezione da esso (Sheikh *et al.*, 2000). L'alterazione dell'espressione di altri trascritti implicati nei processi apoptotici nei mitili trattati alle dosi 0.10 e 0.20 μM , sembra indicare che l'apoptosi sia una delle risposte attuate dalle cellule più danneggiate quando la tossicità diventa maggiore: ad esempio, si riscontra una significativa sottoespressione dose-dipendente di *iap2* (*apoptosis inhibitor 2*). Le IAPs sono una famiglia di proteine caratterizzate dalla presenza di uno o più domini BIR (*baculoviral inhibitory repeat*) e agiscono come inibitori di apoptosi perchè interagiscono con le caspasi bloccandone l'attività. Inoltre è stato dimostrato che IAPs possiedono attività di ubiquitin-ligasi, che determina il trasporto e la degradazione nel proteasoma di molecole coinvolte nella morte cellulare (Mosley *et al.*, 2006; Liston *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2001). Altri trascritti sovraespressi quali *translationally-controlled tumor protein (tctp)*, *p8 nuclear protein*, *prohibitin*, sono coinvolti nell'induzione e nella regolazione dell'apoptosi. Anche l'incremento dose-correlato del citocromo c è indice di

apoptosi; infatti proteine pro-apototiche sono in grado di promuovere il rilascio del *cytc* dal mitocondrio al citoplasma, dove, si lega all' ATP, all' enzima Apaf-1 e alla caspasi 9, formando l'apoptosoma, un complesso che attiva la caspasi 3, fattore di iniziodella degradazione cellulare (Mondragón *et al.*, 2008).

Allo stesso modo, la sovra-espressione di *sHsp27* suggerisce la tendenza verso l'apoptosi nei mitili trattati con le dosi maggiori. Studi dimostrano che le *shsp27* sono in grado di formare aggregati nel citosol: questi oligomeri sono indispensabili perché le *sHSPs* svolgano la loro attività di *chaperone*, riconsentano resistenza allo stress ossidativo (Arrigo *et al.*, 2005) ed interferiscano con il meccanismo apoptotico prevenendo la morte cellulare (Bruey *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 1999). L'esposizione delle cellule a composti chimici, in particolare cloruro di cadmio, provoca la dissociazione delle *sHsp27* ostacolando la loro funzione fisiologica di protezione dall'apoptosi (Ferns *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2001).

Tra gli effetti di alcuni metalli pesanti a livello cellulare va ricordata l'alterazione dell'omeostasi del calcio e l'influenza su determinati componenti del citoscheletro (Nawaz *et al.*, 2005; Del Carmen *et al.*, 2002). Infatti, nei mitili trattati si osserva una sottoespressione di trascritti la cui attività è modulata dal legame con il calcio (ad, es. calmodulina, proteine del collagene, ependimine). Nelle branchie si nota la sottoespressione dell'actina citoplasmatica, Myt01-012D12, e di alcune tubuline (*tubulin 3 α* , *4 α* e β); anche nella ghiandola digestiva risulta sottoespressa l'actina citoplasmatica ed alcune proteine della matrice extracellulare (*matrilin 2* e *3*).

Nella ghiandola digestiva dei mitili trattati, è sovra-espressa con andamento dose-correlato la catepsina L. Le catepsine sono una famiglia di idrolasi lisosomiali coinvolte in numerosi processi cellulari, come il *turnover* delle proteine, la risposta immunitaria, l'attivazione degli ormoni, il rimodellamento della matrice extracellulare. La loro sovraespressione può essere interpretata come un aumento dell'attività lisosomiale. Si pensa inoltre che, come risposta a determinati segnali, tali idrolasi siano rilasciate dai lisosomi nel citoplasma, dove contribuiscono all'apoptosi attraverso vari meccanismi, come l'attivazione delle caspasi o il rilascio di fattori proapoptotici dai mitocondri (Chwieralski *et al.*, 2006; Zavasnik-Bergant e Turk, 2006).

Tra le proteine che sono notoriamente indice di esposizione a metalli pesanti, vi sono le metallotioneine che, in generale, giocano un ruolo importante nel controllo dell'omeostasi di metalli essenziali e nella detossificazione dall'eccesso di metalli non essenziali (Viarengo *et al.*, 1999; Soazig *et al.*, 2003; Par. 1.1.4., Introduzione). Negli esperimenti relativi al trattamento con diverse dosi di metalli pesanti è emersa in modo rilevante la sovraespressione/dose correlata del gene che codifica per la metallotioneina 10IV in entrambi i tessuti. La *mt10IV* è un'isoforma modulabile presente sia nella ghiandola digestiva sia nelle branchie,

la cui trascrizione è notevolmente aumentata dal cadmio e, in minor grado, dal mercurio (Dondero *et al.*, 2005; Vergani *et al.*, 2005). La sovraespressione osservata nei mitili trattati conferma il ruolo detossificante delle *MTs* a livello cellulare.

Data la scarsità delle informazioni sui geni di mitilo e sulle funzioni da essi codificate, non deve stupire il fatto che, tra i geni che mostrano alterazioni trascrizionali significative numerosi sono ancora privi di annotazione funzionale, ma contribuiscono in maniera determinante alla definizione dei profili di espressione. Tra questi, potrebbero essere ulteriormente indagati quelli che presentano un particolare andamento trascrizionale al crescere della dose (per es. Myt01-006H04, Myt01-008B03 e Myt01-014C10).

3.3.3 VALIDAZIONE CON QRT-PCR DI GENI SOVRAESPRESI IN MITILI TRATTATI CON METALLI PESANTI

Per confermare le alterazioni trascrizionali osservate negli esperimenti di *microarray*, sono state condotte delle analisi di qRT-PCR usando il metodo SYBR-Green (Par 2.14, Mat e Met). Sono stati selezionati 8 trascritti (*hsp70*, *90*, *shsp24*, *ferritin*, *gadd45γ*, *mt10IV*, *sequestosoma*) che mostravano una sovraespressione dose-crescente ed è stato misurato il livello di espressione nelle branchie dei mitili trattati rispetto ai controlli. E' stato valutato anche il livello di mRNA relativo alla metallotioneina 20 di mitilo (*mt20*), non inclusa nel *MytArray* 1.0, ma che, notoriamente, mostra un' induzione dose-dipendente in risposta all'esposizione di Cd^{2+} and Hg^{2+} (Bourdineaud *et al.*, 2006; Lemoine, 2000). Come controllo endogeno è stato utilizzato il trascritto *housekeeping* 18S rRNA (Dondero *et al.*, 2005). Una prima difficoltà è stata incontrata nella progettazione dei primer per l'amplificazione dei trascritti designati. Infatti, come spiegato nell'introduzione (Par. 1.1.5), le conoscenze sul genoma di mitilo sono scarse e di conseguenza le porzioni di sequenza disponibile sulle quali individuare la coppia di *primers* ottimali sono pressoché limitate alle poche EST depositate presso l'NCBI e ad alcuni trascritti completamente sequenziati perché utilizzati come biomarcatori.

Per tutti i trascritti per i quali è stato possibile condurre l'analisi di *real-time*, i risultati ottenuti sono in completo accordo con l'andamento ottenuto dall'analisi su *MytArray* 1.0 (fig 24 e 23b). Tuttavia, questi risultati confermano che l'utilizzo della *real-time* PCR risulta essere quantitativamente più sensibile nella valutazione dell'espressione genica rispetto alla tecnologia dei *microarray*.

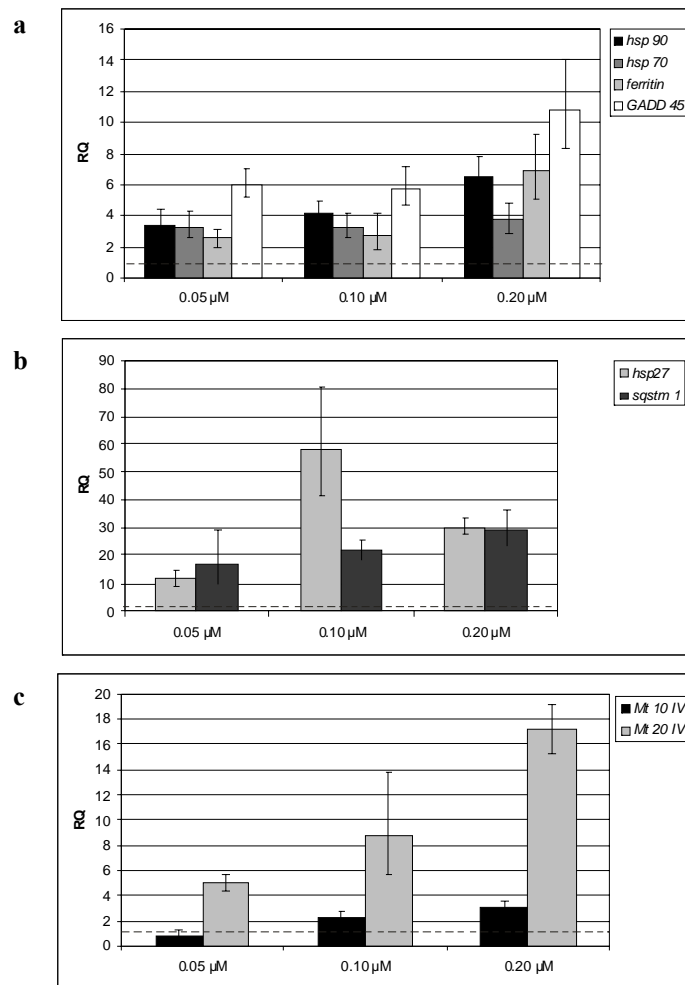


Fig 24 a, b, c Quantità relative (RQ) dei trascritti analizzati con qRT PCR, raggruppati per chiarezza interpretativa, a seconda dei diversi livelli di espressione. La linea tratteggiata indica il livello di espressione relativo dei singoli trascritti (RQ=1) nei mitili di controllo (dose 0).

In entrambi i tessuti analizzati con *MytArray* 1.0, l'espressione della *mt10IV* è aumentata all'aumentare della dose di trattamento; in particolare, alla concentrazione 0.05 μM la quantità di mRNA è risultata lievemente inferiore rispetto al controllo (0.78 volte), mentre la sua trascrizione è indotta alle dosi 0.10 μM (fino a 1.43 volte) e 0.20 μM (3 volte). Tale andamento è stato pienamente confermato dalla quantificazione in *real-time* (figura 8c). Abbiamo ritenuto interessante testare sugli stessi campioni anche il livello relativo del trascritto codificante per *mt20*, non presente nella piattaforma, ma completamente sequenziato e ampiamente studiato a livello proteico (Leignel e Laulier, 2006; Grattarola *et al.*, 2006). I risultati qRT-PCR hanno evidenziato una forte induzione dell'mRNA (dose 0.05 μM, RQ=4.9; dose 0.10 μM, RQ=8.8; dose 0.20 μM, RQ=17.2). In effetti, le due isoforme proteiche sono regolate in maniera diversa dalla presenza di metalli: *mt10* è espressa costitutivamente a livelli basali, poiché coinvolta nell'omeostasi e sequestro dei metalli sia essenziali sia tossici (Cu, Zn, Cd); *mt20* è notoriamente più responsiva all'esposizione dei metalli pesanti e indotta soprattutto dal Cd⁺² (Lemoine e Laulier, 2003; Dondero *et al.*,

2005). La loro trascrizione, inoltre, è modulata anche da radicali idrossilici (OH^\bullet); questo permette di ipotizzare il loro coinvolgimento in caso di stress ossidativo, che può essere generato anche dai metalli (Giguère *et al.*, 2003). Il meccanismo di attivazione dei geni *mt* si basa sul legame di uno specifico fattore di trascrizione (MTF) a determinate zone del promotore, chiamate MREs (*Metal Responsive Elements*) (Haq *et al.* 2003; Zhang B. *et al.*, 2003). MTF è in grado di legarsi agli MREs solo se fosforilata da specifiche chinasi (ser-thr-PKC e *mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) sensibili all'aumento di Ca^{2+} intracellulare. In realtà si è visto che l'attività delle fosfo-chinasi è indotta anche dall'aumento del Cd^{2+} , in grado di entrare nelle cellule sfruttando i canali del calcio o interagendo con recettori di membrana e, di conseguenza di attivare la trascrizione del gene *mt* (Ding e Templeton, 2000) (fig 25). In accordo con queste indicazioni, è rilevante il fatto che, dalle analisi *microarray* eseguite, due trascritti codificanti la *serine/threonine kinase 22A* e la *MAP kinase phosphatase 3* sono sovraespressi in modo significativo nelle branchie dopo trattamento dei mitili con la dose $0.20 \mu\text{M}$ (rispettivamente di 1.3 e 1.5 volte rispetto al controllo).

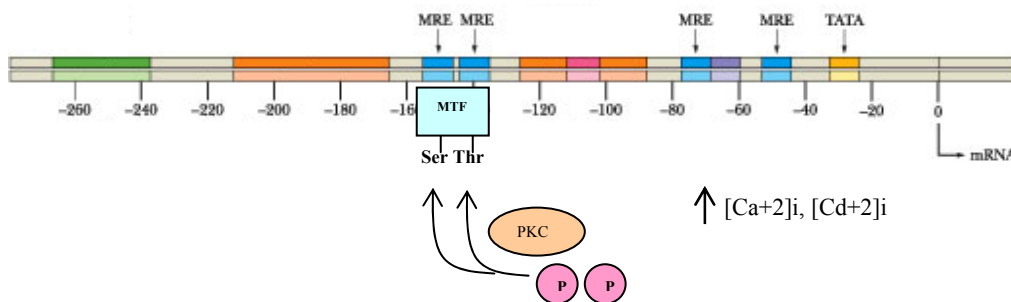


Figura 25. Meccanismo di trascrizione del gene della metallothioneina. MRE (*Metal Responsive Elements*), MTF (*Metal Transcription Factor*) con residui di serina e treonina, PKC (fosfochinasi), P: gruppi fosfato.

Anche l'induzione dose-dipendente del trascritto che codifica per la ferritina, può essere ricondotta ad un meccanismo di difesa delle cellule epiteliali branchiali in risposta ad insulti ossidativi. E' stato dimostrato, infatti, che il sistema ferritina – transferrina oltre a regolare l'omeostasi del ferro (Drysdale *et al.*, 2002; Harrison e Arrosio, 1996) è importante nella protezione dal danno ossidativo mediato dai radicali liberi dell'ossigeno (Orino *et al.*, 2001). In condizioni fisiologiche, la sua trascrizione è inibita dall'aconitasi, una *iron-responsive protein (IRP)*, che è legata a specifici elementi presenti nella porzione 5'UTR a monte del messaggero codificante (*iron-responsive elements*, IREs) (Kim *et al.*, 2004, Durand *et al.*, 2004). Un aumento della concentrazione del Fe intracellulare provoca lo spiazzamento dell'aconitasi e la trascrizione della ferritina, e che può quindi immagazzinare fino a 4500 atomi di Fe^{2+} (Kim *et al.*, 2004).

E' stato dimostrato, tuttavia, che anche il cadmio è in grado di legarsi all'aconitasi attivando la trascrizione della ferritina (Filipic *et al.*, 2006), come

rilevato anche in questi studi, sia dagli esperimenti di microarray sia in *real time* quantitativa (fig. 24a), soprattutto nei mitili esposti alla dose maggiore della miscela contenente CdCl₂.

In generale si può quindi affermare che il trattamento effettuato ha causato una varietà di risposte biologiche incluse l'attivazione trascrizionale di geni che regolano la riparazione del DNA, la sopravvivenza e la morte cellulare, le vie di detossificazione dei metalli pesanti. La presenza di danno genotossico è stata confermata anche dall'incremento di MN e AN nelle cellule branchiali dei mitili trattati.

I risultati finora descritti confermano le potenzialità della piattaforma *MytArray* 1.0 a discriminare mitili trattati con una miscela di metalli pesanti anche a dosi nominali dell'ordine delle parti per miliardo. Il mantenimento e l'uso della collezione d'EST di mitilo in esperimenti di ibridazione competitiva su vetrino ha inoltre consentito di individuare i geni differenzialmente espressi diversi a seconda del tessuto in esame. Numerosi tra questi trascritti, in seguito a studi più approfonditi, potrebbero rivelarsi potenziali marcatori del trattamento effettuato.

Questo studio potrà essere ampliato in futuro, analizzando alterazioni dell'espressione genica indotte da dosi diverse ed altre miscele di metalli, da altre categorie di inquinanti, oppure da altri tipi di variazioni ambientali ed agenti biologici.

3.4 PROFILI TRASCRIZIONALI DI MITILI DELLA LAGUNA DI VENEZIA

I trattamenti condotti in laboratorio rappresentano soltanto una possibile condizione tra quelle che possono realizzarsi in ambiente marino, dove invece le variazioni trascrizionali sono influenzate da molteplici fattori ambientali, (ad esempio, temperatura, salinità, disponibilità di nutrienti, carenza di ossigeno), anche quando correlabili alla presenza di inquinanti e/o patogeni.

Con l'applicazione del *MytArray* 1.0 allo studio del trascrittoma di mitili prelevati da siti lagunari a diverso grado di inquinamento si intendono affrontare molteplici tematiche. Da un lato, l'individuazione e la caratterizzazione dei trascritti differenzialmente espressi possono aiutare a comprendere i processi biologici fondamentali e le risposte funzionali dei mitili all'inquinamento e ad altri fattori nocivi. La molteplicità di dati risultanti dall'analisi su DNA *microarray* può fornire sia una visione d'insieme delle condizioni ambientali sia portare all'identificazione di marcatori molecolari interessanti su cui definire metodi di monitoraggio di semplice esecuzione e basso costo.

3.4.1 CAMPIONAMENTO DEI MITILI LAGUNARI

Allo scopo di analizzare i profili di espressione di mitili dell'ambiente lagunare, ho partecipato al campionamento, condotto in tre estati successive (2005, 2006 e 2007), ed alla sperimentazione su mitili nativi della laguna di Venezia, provenienti da siti con diverse caratteristiche idrodinamiche e potenzialmente esposti a contaminanti tossici.

Sono state messe a confronto due zone di campionamento, diverse per caratteristiche idrodinamiche e, soprattutto, per diverso grado di inquinamento. I siti 1-3 sono localizzati nei canali all'interno del porto industriale di Marghera (fig. 26). Il sito 4 è invece localizzato alla bocca di Porto di Lido, quindi in una zona soggetta a continuo ricambio d'acqua e relativamente poco inquinata. Una mitilicoltura in mare aperto, sito 5, ha fornito mitili usati come controllo negli esperimenti di seguito illustrati. In ogni campionamento, i mitili dell'area industriale presentavano incrostazioni dovute alla presenza di organismi epifiti e, alla dissezione della ghiandola digestiva, risultavano talvolta infestati da copepodi endoparassiti (*Mytilicola spp.*). Lo stato di sviluppo delle gonadi è apparso lievemente più avanzato nei mitili dell'area industriale rispetto ai mitili della bocca di porto, e in questi ultimi rispetto ai mitili dell'allevamento in mare aperto. Nel 2007 non è stato possibile trovare mitili nel sito 1 dell'area industriale.

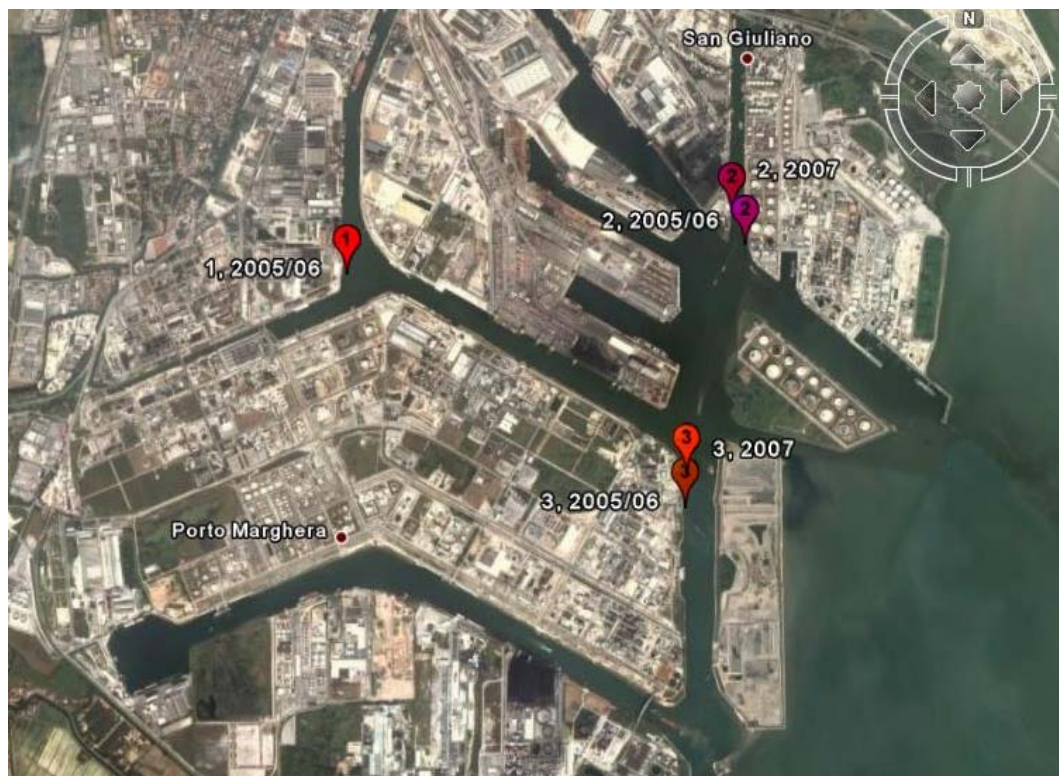


Figura 26. Siti di campionamento nei canali della zona industriale di Porto Marghera (siti 1, 2, 3, anni 2005/06 e 2007). Per una visione completa che comprende anche il sito 4 e il sito 5 di controllo vedere fig. 13 (Par. 2.7, Mat. e Met.).

3.4.2. DISEGNO SPERIMENTALE

In particolare, i risultati descritti in questa seconda parte della tesi si riferiscono all'analisi di espressione genica in ghiandola digestiva. La scelta di utilizzare questo tessuto è sostenuta dal fatto che è sede dei principali processi metabolici di detossificazione. Infatti in tutte le analisi di tipo ambientale che utilizzano i mitili, e non solo, è il primo tessuto che viene valutato (Argese *et al.*, 2005; Da Ros *et al.*, 2000). Inoltre, nella prima applicazione del *MytArray* 1.0, la ghiandola digestiva si è rivelata un tessuto in grado di discriminare nettamente mitili trattati con una miscela di metalli pesanti da quelli esposti a contaminanti organici, e l'unico a fornire, in entrambe le situazioni, un alto numero di trascritti differenzialmente espressi rispetto alla condizione di controllo (Venier *et al.*, 2006).

Per ciascuno dei 4 siti indicati (in ogni anno di campionamento) sono stati selezionati 5 mitili da cui è stato estratto separatamente l'RNA totale della ghiandola digestiva. Dopo purificazione ed analisi qualitativa mediante *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Par 2.8, Mat e Met), solo i campioni di buona qualità sono stati utilizzati per la marcatura e per gli esperimenti di ibridazione competitiva su *MytArray* 1.0. Un campione costituito dal *pool* di uguali quantità di RNA estratto da 30 individui provenienti dal sito 5 nel 2005, ed è stato utilizzato come controllo universale in tutti gli esperimenti.

3.4.3. PROFILI DI ESPRESSIONE DI SINGOLI MITILI (2005)

Per quanto riguarda i mitili campionati nel 2005, si è deciso di applicare in parallelo due tipi di analisi *microarray*: su singoli individui (5 mitili/sito) e sul *pool* degli stessi mitili (N=5).

Poiché i valori di espressione che si studiano sono dati di tipo relativo, si calcola il \log_2 del rapporto tra l'intensità di fluorescenza del campione test ed il controllo.

Per poter, quindi, verificare la similarità dei profili di espressione ottenuti dai due esperimenti condotti in reciproco (*dye-swap*, A e B) è stata applicata un'analisi gerarchica sui dati normalizzati. Sperimentalmente si opera l'analisi *cluster* utilizzando il programma J-Express e applicando la correlazione di Pearson, che permette di valutare qualitativamente i dati, raggruppando i profili trascrizionali con andamento omogeneo (Par. 2.11.3, Mat. e Met.). In fig. 27a sono riportati i risultati ottenuti relativi ai cinque mitili provenienti dai quattro siti lagunari: tutti gli esperimenti di ibridazione competitiva condotti in reciproco (A e B) per ogni mitilo analizzato risultano raggruppati insieme, confermando l'affidabilità dei dati di espressione ottenuti. E' stato dunque possibile ripetere l'analisi sui valori medi di espressione relativi a ciascun *probe* dei cinque mitili appartenenti ad uno stesso sito, ottenendo il dendrogramma di sintesi riportato in fig. 27b

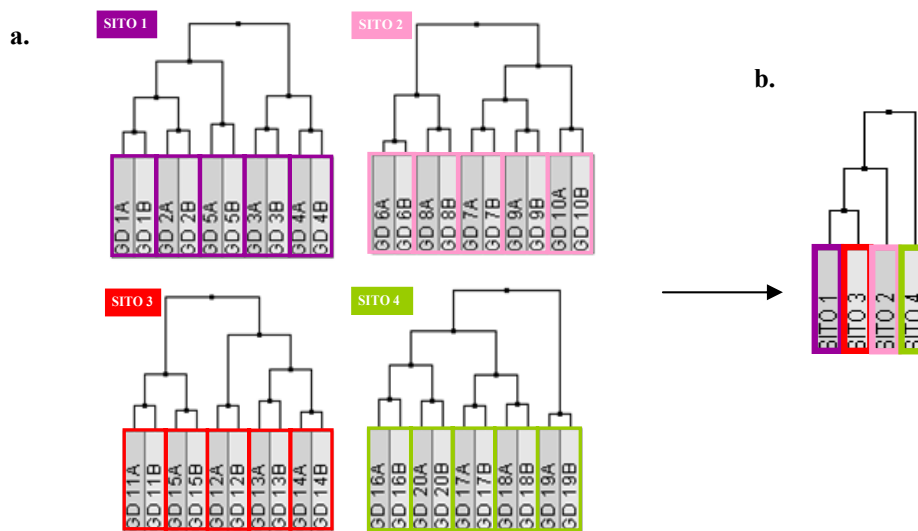


Figura 27. Raggruppamenti gerarchici (correlazione di Pearson) dei profili di espressione della ghiandola digestiva (GD) **a)** dei mitili prelevati dai siti 1-4 della laguna veneziana (analisi in singolo) e **b)** dei 4 profili di espressione totali ricavati dai valori di fluorescenza medi dei 5 mitili/sito. Nel dendrogramma sono indicati gli esperimenti di ibridazione competitiva condotti in reciproco, A e B, e i cinque mitili singoli analizzati per ciascun sito, identificati con un numero progressivo da 1 a 20.

Si può osservare che il *MytArray* 1.0 è in grado di distinguere i mitili provenienti dai siti industriali (1-3) da quelli prelevati alla Bocca di Lido (4) classificando i profili trascrizionali in 2 *cluster* nettamente separati. In particolare, i mitili dei siti 1 e 3 mostrano una maggiore somiglianza rispetto a quelli del sito 2.

Anche le analisi chimiche effettuate sulla polpa di mitili (N=30/sito, siti 1-5) provenienti dallo stesso campionamento hanno evidenziato un diverso grado di inquinamento e la molteplicità della contaminazione.

Le concentrazioni di metalli elementari sono apparse sostanzialmente simili nei cinque siti eccetto che per un limitato incremento di Pb e Ni rilevato soprattutto nel sito 1. Diversamente, la concentrazione di contaminanti organici è risultato molto più rilevante nei siti dell'area industriale rispetto alla bocca di Lido e al mare aperto, con livelli consistenti di diossine, IPA, benzo[a]pirene e PCB nei siti 1 e 2. I profili trascrizionali sembrano quindi confermare l'inquinamento dei siti industriali, sia perché i mitili prelevati da quei siti hanno mostrato molte alterazioni trascrizionali sia perché molti geni differenzialmente espressi sono possibili indicatori molecolari di esposizione a composti organici, organoclorurati e metalli pesanti.

Per identificare i geni differenzialmente espressi all'interno di uno stesso sito di campionamento, si è utilizzato SAM, *Significance Analysis of Microarray* (Par. 2.12.1, Mat. e Met.), applicando l'opzione *One Class* che considera i dati relativi dei cinque mitili (4 repliche tecniche e 5 repliche biologiche /sito) come appartenenti ad un'unica classe. In questo modo si possono identificare i geni la

cui trascrizione viene attivata o repressa nella ghiandola digestiva dei mitili di un determinato sito di campionamento rispetto al sito di riferimento. L'analisi SAM ha permesso quindi di stilare la lista di trascritti che risultano, in modo statisticamente robusto, sovraespressi o sottoespressi nei siti in esame.

In realtà, sugli stessi valori di espressione è stato effettuato anche un altro tipo di analisi statistica ovvero l'analisi *Rank Product*, applicando prima un filtro per individuare solo i trascritti con valore di espressione omogeneo tra le repliche e quindi l'analisi RP solo sui dati robusti (Par. 2.12.2, Mat. e Met.). Questo passaggio non è necessario se si utilizza SAM poiché già previsto dal programma stesso. RP offre il vantaggio di individuare il livello di confidenza di ciascun gene, mentre SAM fornisce una percentuale di falsi positivi sul totale, ovvero indica la percentuale di trascritti appartenenti alla lista di *out-put* che possono essere stati identificati come differenzialmente espressi ma non lo sono.

Tuttavia sono entrambi metodi non parametrici utilizzati nell'analisi dei dati di esperimenti su DNA *microarray* (Hong *et al.*, 2006, Moscatiello *et al.*, 2006, Ohtsu *et al.*, 2007)

Considerando come omogenee solo le repliche aventi rapporto tra media e deviazione standard maggiore ($1 + 0.3$ deviazione standard) e ponendo il *p value* < 10%, i geni individuati come differenzialmente espressi sono risultati sostanzialmente gli stessi individuati da SAM con i valori di FDR riportati in tab. 4. La numerosità assoluta dei gruppi dipende dalla diversa definizione dei parametri FDR e *p*.

Siti lagunari 2005	SAM		RP	
	n° geni differenzialmente espressi	FDR%	n° geni differenzialmente espressi	<i>p value</i>
Sito 1	139 (82, 57)	0.9	154 (92, 62)	< 0.1
Sito 2	82 (41, 41)	0.9	97 (50, 47)	< 0.1
Sito 3	74 (29, 45)	0.9	94 (37, 57)	< 0.1
Sito 4	25 (15, 10)	3.3	55 (30, 25)	< 0.1

Tabella 4. Geni differenzialmente espressi individuati con *Significance Analysis of Microarray* e *Rank product*. Queste analisi si riferiscono agli esperimenti di ibridazione competitiva condotti per ognuno dei 5 mitili (GD) dei siti 1-4 nel 2005.

Si nota che i tre siti della zona industriale (1-3), ed in particolare il sito 1, hanno un numero rilevante di geni differenzialmente espressi (sia sovra- sia sotto- espressi) avvalorati da un basso FDR. Per quando concerne il sito 4, il numero di geni che dimostrano un livello di espressione diverso rispetto al controllo è limitato e ulteriormente ridotto se si considera il maggior numero di possibili falsi positivi. Da una prima osservazione delle liste dei geni emerge, tra i sovraespressi,

la consistente presenza di trascritti codificanti per proteine ribosomiali, con un notevole incremento del loro livello di espressione, soprattutto nei tre siti dell'area industriale. Da un confronto più ampio è evidente che molti geni che sono attivati o repressi in maniera differenziale rispetto al controllo, mostrano un andamento abbastanza simile nei siti 1, 2, 3, mentre nel sito 4 non risultano differenzialmente espressi o hanno perfino tendenza opposta. (ad es., *metallothionein 10IV*; *ATP-dependent RNA helicase*).

Questi esperimenti rinforzano la tesi che l'analisi su DNA *microarray* può discriminare mitili provenienti da zone diverse della laguna e che i profili trascrizionali possono essere informativi dello stato complessivo del tessuto in esame. Tuttavia, da un'analisi più approfondita, è stato inevitabile osservare come ogni mitilo avesse una propria impronta trascrizionale con valori di espressione dei singoli trascritti varianti in diverso grado da individuo a individuo (tab. 6). Ciò nonostante, l'analisi sopra descritta mette in luce aspetti comuni e peculiarità dei profili trascrizionali di uno stesso gruppo di mitili rispetto a quelli di altri siti.

3.4.4. PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA DA CAMPIONI *POOL* (N=5, 2005, 2006, 2007)

Per praticabilità, l'analisi trascrizionale *MytArray* 1.0 su della ghiandola digestiva è stata effettuata in tre diversi anni di campionamento su campioni composti di mitili prelevati dalle stesse zone lagunari descritte sopra (*pool* di 5 mitili/sito; nel sito 1 il campionamento 2007 non è stato possibile). I profili di espressione genica risultanti dagli esperimenti di ibridazione competitiva sono stati sottoposti a raggruppamento gerarchico con l'ausilio del programma J-Express (Par. 2.11.3, Mat. e Met.). Una prima analisi di raggruppamento gerarchico è stata svolta per verificare se i profili trascrizionali ottenuti dai due esperimenti condotti in reciproco (invertendo la marcatura dei campioni) mostrassero andamento simile e quindi se le repliche tecniche fossero omogenee (fig. 28).

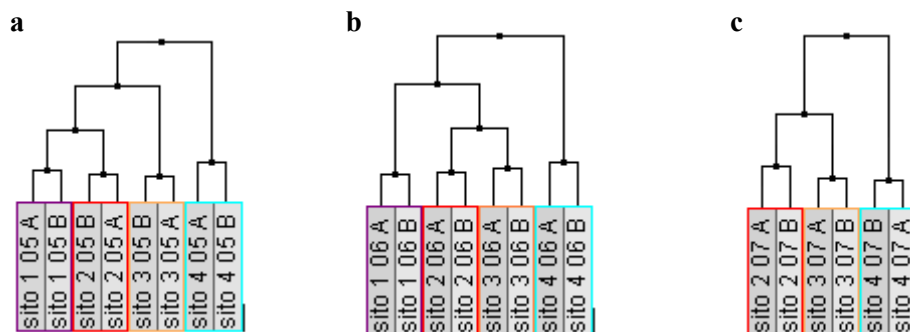


Figura 28. Raggruppamento gerarchico (J-Express, correlazione di Pearson) dei profili dei mitili (GD, *pool*) prelevati dai siti 1-4 **a)** nel 2005, **b)** nel 2006 e dai siti 2-4 **c)** nel 2007. Nei dendrogrammi, A e B indicano gli esperimenti di ibridazione competitiva condotti in reciproco.

A seguito del buon risultato di tale verifica, si è ripetuta l'analisi mediando i valori di espressione relativi ad ogni trascritto (N=4) per ogni sito. Considerando nel loro insieme i profili trascrizionali ottenuti il risultato più evidente è la netta e costante distinzione tra i mitili della bocca di porto di Lido e quelli dei tre siti industriali, in tutti e tre anni di campionamento (fig. 29). Numerosi trascritti presentano, in tutti tre gli anni, un livello di espressione nettamente opposto se riferiti ai canali industriali di porto Marghera e alla bocca di Porto di Lido, ad esempio, *mt 10IV*, *ATP-binding cassette B1A*. Altri invece sembrano caratterizzare specificatamente una determinata condizione, avendo espressione differenziale in unico sito rispetto agli altri, ad esempio i trascritti *Myt01-010F07* e *Myt01-0090F07* (2005). Queste ed altre variazioni di espressione genica rilevate nei mitili dei siti 1-3 suggeriscono l'effetto di inquinanti biodisponibili tuttavia un'analisi più approfondita dei risultati complessivamente ottenuti è necessaria per trarre conclusioni definitive.

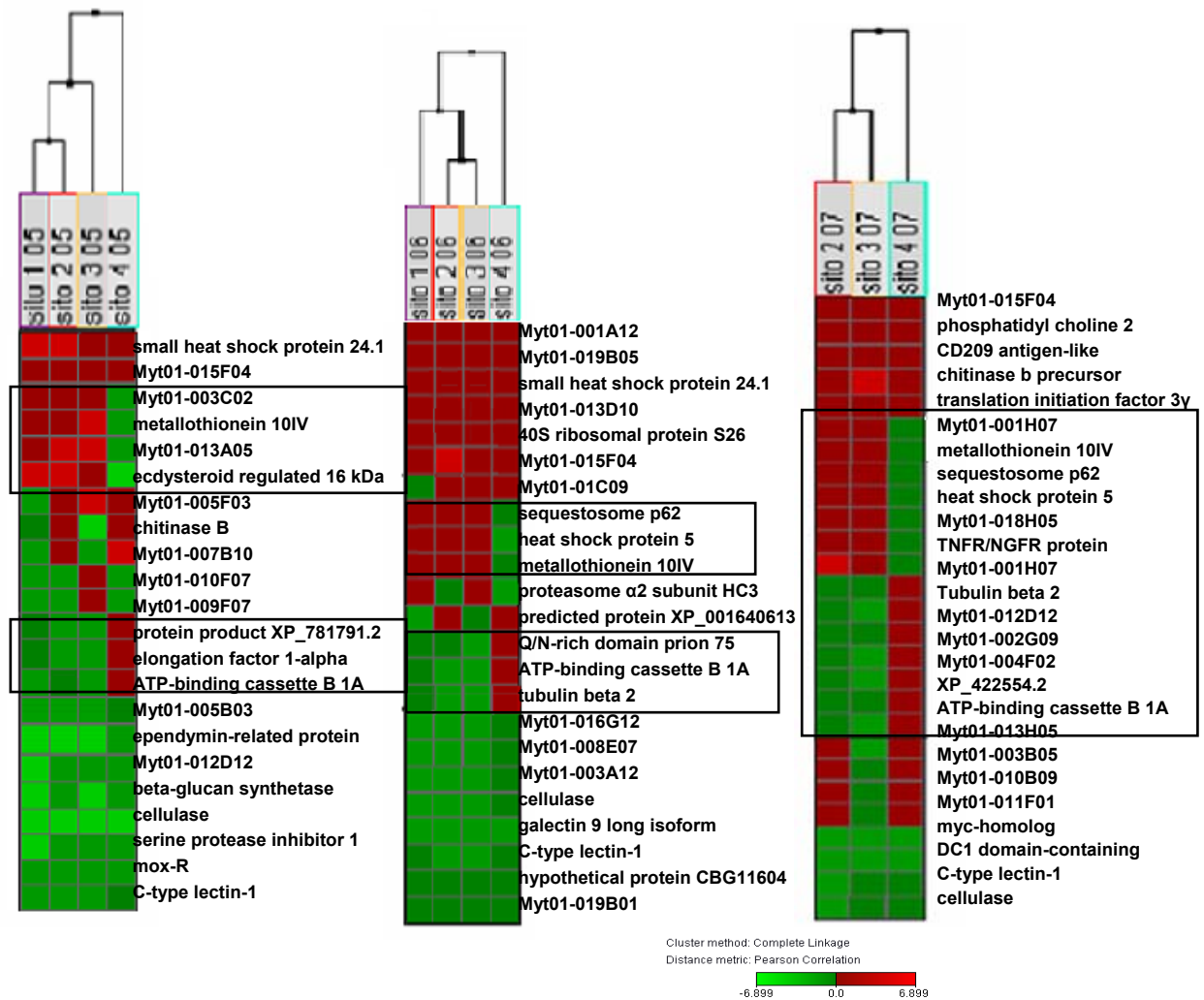


Figura 29. Raggruppamento gerarchico dei profili di espressione ottenuti nei diversi siti lagunari e nei 3 anni di campionamento. E' riportata solo una parte dei dati che li hanno generati. Nei riquadri sono evidenziati trascritti il cui livello di espressione (\log_2) discrimina i canali industriali dalla bocca di Lido.

3.4.5. IDENTIFICAZIONE DEI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI

Per poter identificare tra tutti i trascritti, quelli differenzialmente espressi rispetto al controllo è necessario applicare un test statistico che associ un valore di significatività ad ogni livello di espressione.

Bisogna premettere che l'analisi di singoli mitili aumenta la numerosità degli esperimenti ma fornisce molte più repliche per ogni sito analizzato (5 mitili per sito per 4 repliche sperimentali).

I risultati riportati in questo paragrafo, invece, si riferiscono ad esperimenti di ibridazione competitiva di un *pool* di 5 mitili per sito (4 repliche sperimentali per sito). Come spiegato nel Par. 2.12 di Mat e Met, un limite del programma SAM è di essere ottimizzato per esperimenti con un numero elevato repliche (almeno otto). Quindi si è proprio reso necessario utilizzare un metodo alternativo che operasse come SAM ma potesse essere applicato ad un numero limitato di repliche tecniche: *Rank Product* (RP). Entrambi i metodi consentono di individuare i geni differenzialmente espressi considerando l'omogeneità nelle repliche tecniche, tuttavia RP consente di selezionare geni anche con un numero di repliche relativamente basso (Breitling *et al.*, 2004). Come già illustrato (Par. 2.12.2, Mat. e Met.), le liste dei dati risultanti dagli esperimenti condotti su *pool* (siti 1-4; 2005, 2006, 2007) sono state inizialmente filtrate per eliminare i trascritti che presentano repliche tecniche discordi ed effettuando così l'identificazione dei trascritti significativamente alterati più robusta (con SAM non era necessario fare questa operazione perché già prevista). La tab. 5 riassume il numero di geni differenzialmente espressi rilevati in ogni sito di campionamento nei diversi anni.

	SITO1	SITO2	SITO3	SITO4
2005	73 (35, 38)	61 (28, 33)	74 (35, 39)	36 (18, 18)
2006	89 (38, 51)	90 (41, 49)	69 (30, 39)	55 (23, 32)
2007	/	104 (47, 57)	92 (57, 35)	53 (25, 28)

Tabella 5. Numero di trascritti differenzialmente espressi in ghiandola digestiva dei mitili prelevati dai siti lagunari 1-4 nei 3 anni di campionamento. In rosso è riportato il numero dei sovra-espressi, in verde quello dei sotto-espressi)

Nei mitili provenienti dalla zona industriale si osserva un elevato numero di trascritti alterati rispetto ai mitili di controllo, tendenza che si accentua nell'arco dei tre anni analizzati. Come già evidente dalla somiglianza dei profili trascrizionali (analisi *cluster*) i mitili del sito 4 risultano sempre più simili a quelli di controllo (minor numero di geni differenzialmente espressi). Le liste complete dei trascritti significativamente sovra- e sotto-espressi (p value < 10%) sono riportate altrove, ma in fig.29 e tab. 6 sono rappresentati alcuni trascritti.

Per il 2005, è stato possibile confrontare il numero di geni differenzialmente espressi ed i relativi valori di espressione ottenuti dall'analisi *microarray* condotta su singole ghiandole digestive (Par. 3.4.3, Risult. e Discuss.) o su *pool* (N=5), limitatamente ai trascritti con repliche tecniche omogenee in entrambi gli esperimenti. Benché analizzando i *pool* si ottenga un numero inferiore di geni differenzialmente espressi (l'analisi su *pool* pare attenuare le differenze interindividuali) i livelli di espressione sono assimilabili alla media dei 5 valori individuali (tab. 6).

In primo luogo, si è osservato che il numero di geni differenzialmente espressi individuati era maggiore nei mitili analizzati singolarmente piuttosto che nelle analisi condotte sul *pool*. Limitando, poi, il confronto ai trascritti con repliche tecniche omogenee in entrambi i tipi di esperimenti, i geni significativamente sovra- o sotto-espressi nel singolo mitilo, si ritrovano come differenzialmente espressi anche nel profilo di gruppo e questa analisi *pool* continua ad essere discriminante del sito in esame. Anche i valori di espressione di gruppo (*pool*) sono confrontabili con la media dei 5 valori individuali. Sebbene quindi l'analisi di gruppo appiattisca la variabilità inter-individuale essa produce un profilo ancora rappresentativo del sito considerato ed è in grado di far emergere comunque trascritti per i quali la variazione trascrizionale è statisticamente robusta. Se da un lato l'analisi su singoli individui permette di avere informazioni sulle variazioni inter-individuali, l'analisi di gruppo risulta informativa e molto meno dispendiosa, riducendo di molto i tempi e i costi di lavoro particolarmente elevati delle indagini ambientali. Una robusta analisi statistica rimane d'obbligo per confrontare i valori di espressione e stabilire la numerosità ottimale per la costituzione del *pool* (Zhang *et al.*, 2007; Shih *et al.*, 2004).

Tabella 6 di pag. 75. Trascritti differenzialmente espressi in ghiandola digestiva dei mitili capionati nel 2005 (1-4). Sono riportati i trascritti comuni dopo esperimenti di ibridazioni competitiva condotti su 5 singoli mitili e sul *pool* degli stessi (N=5/sito).

I valori (log₂ test/controllo) riportati sono rispettivamente quelli dei singoli mitili (GD 1-20), la media degli stessi ed il valore di espressione derivato dagli esperimenti su *pool*.

Sito 1 2005		Valore di espressione log2 (lagunare/controllo)						
ID	Descrizione	GD1	GD2	GD3	GD4	GD5	media (N=5)	pool
Myt01-017C08	Without similarity	0,96	1,37	1,58	1,32	0,46	1,14	1,71
Myt01-009A08	ecdysteroid regulated 16 kDa protein precursor [<i>L. vannamei</i>]	0,96	1,21	1,79	3,23	1,95	1,83	1,56
Myt01-007B11	Without similarity	1,46	1,10	0,34	0,12	0,06	0,62	1,16
Myt01-018E11	subtilisin-like serine protease [<i>Pediococcus pentosaceus</i>]	0,60	1,04	0,44	2,16	1,20	1,09	1,15
Myt01-013D02	variable surface lipoprotein Vsp422-3 [<i>Mycoplasma bovis</i>]	0,14	0,75	0,84	1,68	1,15	0,91	1,10
Myt01-016C08	metallothionein 10IV [<i>Mytilus edulis</i>]	1,51	1,94	1,91	2,48	-0,73	1,42	1,08
Myt01-005F12	Without similarity	0,00	1,28	0,80	2,01	1,67	1,15	1,08
Myt01-018A02	synaptotagmin-like 2 [<i>Xenopus laevis</i>]	0,93	0,68	2,44	0,66	0,41	1,02	1,06
Myt01-010H07	Without similarity	0,51	2,01	2,06	0,07	0,04	0,94	1,03
Myt01-011G05	small heat shock protein 24.1 [<i>Branchiostoma lanceolatum</i>]	0,43	0,53	1,57	1,07	0,28	0,78	0,98
Myt01-018G01	Without similarity	0,55	1,10	1,39	0,74	0,28	0,81	0,96
Myt01-018F05	Without similarity	0,93	0,69	0,87	0,00	0,85	0,67	0,93
Myt01-011E01	Without similarity	0,91	0,68	0,66	1,57	2,09	1,18	0,93
Myt01-013E03	Without similarity	0,28	0,92	0,51	1,60	0,28	0,72	0,84
Myt01-019B10	Mitochondrial-ND2 [<i>Mytilus edulis</i>]	0,62	1,19	0,72	0,68	0,34	0,71	0,82
Myt01-003B06	hepatic lectin [<i>Gallus gallus</i>]	-0,28	-1,68	-1,29	-0,13	-2,61	-1,20	-0,96
Myt01-008C04	cysteine proteinase inhibitor-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	-1,21	-0,89	-1,14	-0,56	-0,93	-0,95	-1,05
Myt01-009C02	Without similarity	-1,18	-0,12	-0,74	-0,70	-1,09	-0,77	-1,09
Myt01-004H10	putative period clock protein [<i>Mytilus galloprovincialis</i>]	-1,66	-1,41	-1,26	-0,67	0,29	-0,94	-1,12
Myt01-009D08	plasminogen activator sPA [<i>Scolopendra subspinipes</i>]	-0,74	-0,62	-0,97	-1,32	-2,46	-1,22	-1,16
Myt01-005C12	dopamine beta hydroxylase [<i>Homarus americanus</i>]	-1,38	-0,80	-0,78	-0,01	0,00	-0,59	-1,17
Myt01-009A04	beta-glucan synthetase [<i>Microbulifer hydroalticus</i>]	-0,72	-1,65	-1,55	-1,01	-2,27	-1,44	-1,18
Myt01-009E08	moxR protein [<i>Brucella suis</i> 1330]	-1,21	-1,96	-2,09	-0,26	-0,62	-1,23	-1,27
Myt01-016F08	serine protease inhibitor 1 [<i>Crassostrea virginica</i>]	-0,89	-0,90	-0,95	-2,14	-2,11	-1,40	-1,35
Myt01-009A01	hypothetical protein [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	-1,72	-1,35	-1,57	-1,19	-0,85	-1,34	-1,39
Myt01-009E10	ganglioside M2 activator-like protein [<i>Aurelia aurita</i>]	0,18	-1,23	-1,61	-1,48	-3,37	-1,50	-1,41
Myt01-005C07	slit homolog 1 [<i>Mus musculus</i>]	-1,06	-1,00	-1,25	-1,38	-1,61	-1,26	-1,42
Myt01-009B02	ten-m3 [<i>Danio rerio</i>]	-1,36	-0,84	-0,93	-2,35	-2,58	-1,61	-1,50
Myt01-009E03	cellulase [<i>Haliothis discus</i>]	-1,46	-1,86	-1,54	-2,95	-0,79	-1,72	-1,52
Myt01-005D06	defensin isoform B2 [<i>Aedes aegypti</i>]	-1,59	-1,34	-0,96	-0,51	-1,91	-1,26	-1,69
Myt01-002B04	hypothetical protein XP_795472 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	-0,38	-1,30	-1,46	-1,87	-1,29	-1,26	-1,72
Myt01-003D06	C-type lectin-1 [<i>Crassostrea gigas</i>]	-1,61	-2,92	-2,14	-2,71	-1,70	-2,22	-2,35
Myt01-004C02	cellulase [<i>Haliothis discus</i>]	-2,37	-2,76	-1,65	-2,89	-2,44	-2,42	-2,36
Myt01-001E12	ependymin-related protein [<i>Branchiostoma belcheri tsingtaunense</i>]	-2,93	-0,84	-1,43	-0,08	-0,08	-1,07	-2,38

Sito 2 2005		GD6	GD7	GD8	GD9	GD10	media (N=5)	pool
Myt01-010H04	Without similarity	0,14	1,35	0,92	0,59	1,63	0,93	1,26
Myt01-016C08	metallothionein 10IV [<i>Mytilus edulis</i>]	2,04	1,85	1,21	-0,34	4,26	1,80	1,22
Myt01-008C07	Elongation factor 2b [<i>Drosophila melanogaster</i>]	0,99	0,41	0,40	1,01	0,32	0,62	0,96
Myt01-002B04	hypothetical protein XP_795472 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	0,10	-1,38	-1,17	-1,11	-1,07	-0,92	-0,96
Myt01-009A04	beta-glucan synthetase [<i>Microbulifer hydroalticus</i>]	-1,24	-0,91	-0,56	-1,17	-0,40	-0,86	-1,03
Myt01-004E01	lipase, member H [<i>Mus musculus</i>]	-0,71	-0,85	-0,89	-0,86	-1,55	-0,97	-1,08
Myt01-008C04	cysteine proteinase inhibitor-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	-1,93	-1,33	-0,35	-1,24	-0,72	-1,11	-1,16
Myt01-002D11	Without similarity	-1,84	-2,13	-1,67	-1,09	-0,85	-1,51	-1,18
Myt01-006D10	dopamine beta-hydroxylase-like 1 [<i>Mus musculus</i>]	-4,52	-1,17	-0,31	-1,08	-1,18	-1,65	-1,24
Myt01-004E10	Without similarity	-3,05	-1,39	-0,47	-1,87	-1,95	-1,75	-1,28
Myt01-009E03	cellulase [<i>Haliothis discus</i>]	-2,28	-2,16	-0,88	-1,81	-0,92	-1,61	-1,30
Myt01-007B10	Without similarity	-1,50	-2,29	0,33	-0,59	-2,68	-1,35	-1,37
Myt01-003D06	C-type lectin-1 [<i>Crassostrea gigas</i>]	-5,58	-1,43	-1,35	-2,03	-0,26	-2,13	-1,39
Myt01-016F08	serine protease inhibitor 1 [<i>Crassostrea virginica</i>]	-2,27	-0,76	-0,82	-1,63	-1,13	-1,32	-1,39
Myt01-005C07	slit homolog 1 [<i>Mus musculus</i>]	-5,41	-1,27	-1,16	-1,52	-0,41	-1,95	-1,71
Myt01-004C02	cellulase [<i>Haliothis discus</i>]	-3,24	-1,87	-1,26	-2,21	-3,51	-2,42	-1,87
Myt01-001E12	Without similarity	-0,15	-1,86	-0,80	-2,35	-0,73	-1,18	-1,95
Myt01-009E10	ganglioside M2 activator-like protein [<i>Aurelia aurita</i>]	-4,26	-3,42	-2,35	0,04	-0,98	-2,19	-2,14

Sito 3 2005		GD11	GD12	GD13	GD14	GD15	media (N=5)	pool
Myt01-016C08	metallothionein 10IV [<i>Mytilus edulis</i>]	0,30	1,21	2,04	2,69	0,67	1,38	1,86
Myt01-005F03	Without similarity	1,06	2,05	1,41	0,16	1,12	1,16	1,25
Myt01-011G05	small heat shock protein 24.1 [<i>Branchiostoma lanceolatum</i>]	0,52	1,85	1,38	0,81	1,13	1,14	1,40
Myt01-018B04	phosphatase regulatory subunit (39.5 kD) [<i>C. elegans</i>]	0,83	0,67	0,23	1,28	0,02	0,61	-1,67
Myt01-017B09	Without similarity	-0,75	-0,51	-0,62	-0,36	-1,27	-0,70	-1,72
Myt01-010F07	Without similarity	-1,40	-0,77	-0,20	-0,28	-1,01	-0,73	-0,95
Myt01-004B07	Without similarity	-1,00	-1,51	-0,90	-0,74	0,02	-0,83	-0,98
Myt01-002D11	Without similarity	-0,92	-0,99	-1,28	-0,90	-0,58	-0,93	-1,16
Myt01-003G07	Without similarity	-1,04	-1,29	-0,41	-0,61	-1,80	-1,03	-1,00
Myt01-004D07	Without similarity	-1,17	-0,93	-0,30	-0,70	-2,23	-1,07	-0,99
Myt01-008C04	cysteine proteinase inhibitor-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	-0,98	-1,23	0,24	-1,10	-3,01	-1,22	-1,93
Myt01-005C07	slit homolog 1 [<i>Mus musculus</i>]	-1,45	-1,81	-0,82	-1,09	-1,00	-1,23	-1,40
Myt01-009A01	hypothetical protein [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	-0,76	-1,99	-1,29	-0,93	-1,20	-1,24	-1,02
Myt01-001E12	Without similarity	-2,64	-1,41	0,04	-1,78	-0,55	-1,27	-1,29
Myt01-004E12	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP),1A [<i>S. purpuratus</i>]	-1,79	-0,92	-1,26	-1,31	-1,92	-1,44	-1,36

Sito 4 2005		GD16	GD17	GD18	GD19	GD20	media (N=5)	pool
Myt01-004B08	variable region-containing chitin-binding protein 3 [<i>B. floridae</i>]	1,38	0,74	1,48	0,81	0,74	1,03	1,07
Myt01-006E05	zygote arrest 1 isoform 1 [<i>Danio rerio</i>]	0,57	0,41	0,91	0,35	1,55	0,76	0,84
Myt01-009E09	cAMP responsive element binding protein-like 2 [<i>Homo sapiens</i>]	-0,78	-0,34	-1,03	-0,43	-0,18	-0,55	-1,16
Myt01-011D05	cathepsin L precursor [<i>Hydra vulgaris</i>]	-0,67	-0,84	-1,03	-1,37	-0,67	-0,92	-1,44
Myt01-003D06	C-type lectin-1 [<i>Crassostrea gigas</i>]	-1,51	-1,12	-1,16	-1,43	-0,22	-1,09	-1,24
Myt01-005B11	Without similarity	-1,62	-1,36	-1,76	-1,65	-0,39	-1,36	-2,31
Myt01-008H08	scavenger receptor cysteine-rich protein [<i>S. purpuratus</i>]	-0,29	-2,53	-2,10	-0,51	-1,89	-1,46	-1,24
Myt01-007H04	Without similarity	-1,38	-1,83	-2,13	-2,48	0,01	-1,56	-2,03
Myt01-009A08	ecdysteroid regulated 16 kDa protein precursor [<i>L. vannamei</i>]	-1,04	0,02	-3,07	-2,75	-1,38	-1,64	-1,49

3.4.6. CATEGORIZZAZIONE FUNZIONALE DEI TRASCRITTI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI NEI MITILI LAGUNARI

Per procedere nell'interpretazione dei profili trascrizionali della ghiandola digestiva dei mitili lagunari e nell'individuazione dei processi cellulari alterati, i trascritti per i quali era disponibile un'annotazione genica sono stati suddivisi in categorie funzionali e rappresentati graficamente, distinguendoli in sovraespressi e in sottoespressi. La categorizzazione funzionale ha mostrato distribuzioni sostanzialmente simili nei diversi siti e nei tre anni di campionamento, tanto da riportarla unitariamente (fig. 30) anche includendo i mitili del sito 4. Infatti questi ultimi sono funzionalmente poco diversi da quelli di controllo e, di per sé, contribuiscono poco alla numerosità delle diverse categorie che riflette meglio lo stato funzionale dei mitili della zona industriale

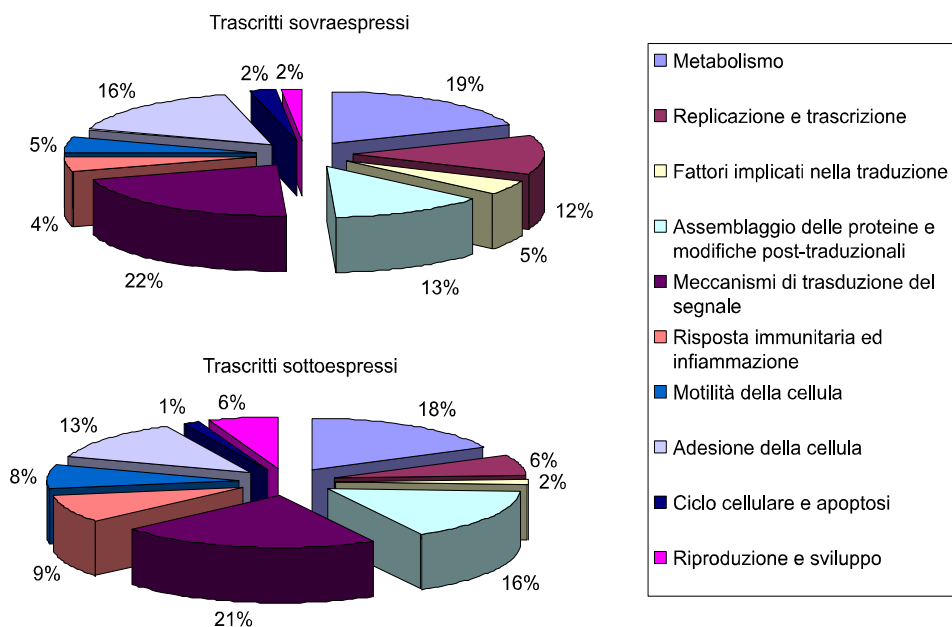


Figura 30. Suddivisione in categorie funzionali dei trascritti differenzialmente espressi nei siti 1-4 e nei tre anni di campionamento. Nelle rappresentazioni grafiche sono esclusi i trascritti privi di annotazione (~50%).

Alcune categorie funzionali mostrano un numero sorprendentemente simile di geni sovra- e sotto-espressi (es. metabolismo, meccanismi di trasduzione del segnale, processi di assemblaggio e modificazione post-traduzionale delle proteine). Va tuttavia ricordato che si tratta di categorie molto ampie.

E' evidente che non solo l'inquinamento ma anche altri fattori naturali tipici della laguna interna o di normali risposte fisiologiche degli organismi analizzati possono aver contribuito alla definizione dei profili trascrizionali ottenuti, tuttavia è emersa chiaramente la diversa espressione (induzione o repressione) di numerosi geni di mitili provenienti i siti industriali e Lido, con, nella maggioranza dei casi andamenti significativamente opposti.

Ad un'analisi più dettagliata delle similarità di sequenza, è possibile notare fra i sovraespressi dei siti 1-3, trascritti coinvolti nei processi metabolici e potenzialmente indotti da agenti inquinanti (es. citocromo P450, subunità 2d9, siti 2 e 3 nel 2007), nella sintesi di ATP e trasporto di elettroni mitocondriali (*mtATP synthase coupling factor 6*, *NADH dehydrogenase ND2*, *ND5*, *ND6*, *cytochrome oxidase CO1*, *cytochrome b*).

Nei profili trascrizionali riferiti ai siti dell'area industriale, ed in particolare al sito 1, risultano significativamente sovraespressi geni codificanti isoforme del citocromo-P450 e la glutatione-S-transferasi. Queste proteine sono notoriamente coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici (Bebiano *et al.*, 2007; Lyons *et al.*, 2003; Arun *et al.*, 2006) e sono utilizzate anche in mitilo come marcatori dell'esposizione di a contaminanti organici (Shaw *et al.* 2004; Manduzio *et al.*, 2004). La NADH deidrogenasi e il citocromo b, sono rispettivamente una proteina integrale e periferica della membrana interna del mitocondrio deputate al trasporto di elettroni durante la fosforilazione ossidativa. L'ATP sintasi è una proteina transmembrana deputata alla sintesi di ATP a partire da ADP e ioni fosfato. Numerosi studi riportati in letteratura confermano, in linea generale, che l'esposizione a contaminanti ambientali quali cadmio, B(a)P e congeneri della TCDD, sono in grado di promuovere la sovraespressione dei geni coinvolti nella produzione di energia, nel metabolismo degli ioni metallici e di proteine mitocondriali (Koskinen *et al.*, 2004, Dondero *et al.*, 2006).

Inoltre, nei mitili dei canali industriali (in maniera pressoché invariata nei tre anni) osserviamo l'alterazione di trascritti che mediano la trasduzione del segnale, particolarmente proteine con attività chinasi (*cyclin dependent protein kinase 5*, *ficolin B*, *Tis 11*, *PIP4K2A*, *protein kinase C*, *fringe*) che, modulando l'attività di *target* a valle, conferiscono cambiamenti nella funzionalità cellulare. Uno dei primi e più evidenti effetti che si riscontrano nei sistemi biologici dopo esposizione a contaminanti ambientali è, infatti, la perturbazione del *signalling*. (Canesi *et al.*, 2003; Kefaloyianni *et al.*, 2005)

D'altra parte, nei mitili di tutti 4 i siti lagunari risultano sotto-espressi fino a 7 volte rispetto ai mitili di controllo alcuni trascritti riconducibili ad enzimi idrolitici implicati nella digestione dei carboidrati (cellulasi, β -glucanasi), normalmente espressi in ghiandola digestiva.

È interessante notare come sia alterata la trascrizione di proteine ribosomiali e di geni implicati nei processi di trascrizione (*RNA helicase*) e di traduzione (*eukaryotic translation initiation factor 3* e *4A2*, *elongation factor 2*). Questo suggerisce un aumento dell'attività di sintesi proteica nella ghiandola digestiva; in particolare nei siti 1-3 risultano sovraespressi anche i geni codificanti per alcune *heat shock protein* (5kDa, 24kDa e 40kDa). Anche trascritti implicati nei processi di assemblaggio, modificazione post-trascrizionale e degradazione delle proteine subiscono sia attivazione che repressione trascrizionale. Nei mitili prelevati dai

canali industriali risultano sopra-espresse numerose proteasi, peptidasi (*peptidase D*, *carboxypeptidase O*), componenti del proteasoma (*sequestosome 1* –fig. 32b-, *26S non-ATPase subunit 8*, *subunit Z*, *subunit HC3*) e alcune chaperonine (*small heat shock protein 24.1*) mentre appaiono sotto-espresse gli inibitori delle proteasi (*cysteine proteinase inhibitor-like protein*, *serine protease inhibitor 1*). Anche la sovraespressione di geni codificanti per l'ubiquitina (*polyubiquitin* e *ubiquitin/ribosomal proteins*) nei siti 1-3, potrebbe indicare che i siti del polo industriale sono variamente inquinati da sostanze che provocano alterazioni strutturali delle proteine. L'ubiquitina infatti, è una piccola molecola (85 kDa) che si lega covalentemente a i residui di lisina delle proteine da degradare, indirizzandole al proteasoma anch'esso sovraregolato. Ciò è in accordo con precedenti studi su mitili (*M. trossulus* e *M. edulis*) che dimostrano come la presenza di inquinanti provochi alterazioni proteiche tali da richiedere un rapido *turnover* delle proteine endogene (Hofmann e Somero, 1995; Mc Donagh e Sheehan, 2006).

Anche in questi esperimenti è emersa in modo rilevante la sovraespressione del gene che codifica per la metallotioneina 10IV nei tre siti della zona industriale (fig 32a), indice di esposizione a metalli pesanti, come precedentemente discusso nei par. 3.3.2/3 di Risult. e Discuss..

In misura minore si nota una sovrapproduzione di trascritti indicatori di apoptosi e di alterata omeostasi replicativa come *nRas* e *p63/73*. La proteina *Ras* è un membro di una famiglia di piccole proteine che nella conformazione attiva legano il GTP, innescando la fosforilazione a cascata di una serie di protein chinasi, le MAP-chinasi. Le MAPKs agiscono fosforilando determinati residui di proteine regolatrici di geni bersaglio, modificando le loro capacità di controllo della trascrizione. L'importanza di *Ras* in questo processo di regolazione è stato ampiamente dimostrata; infatti se rimane sempre attivo trasmette segnali di continua proliferazione che alterano la normale progressione del ciclo conducendo la cellula ad apoptosi o a tumorigenesi (Jeffrey *et al.*, 2006). Inoltre è noto che il gene *Ras* è implicato in almeno il 30% dei tumori umani e vi sono indicazioni che vi sia correlazione anche con l'esposizione al piombo, IPA, benzo(a)pirene, nickel e cromo (Alguacil *et al.*, 2003).

P63 e *p73* sono membri della famiglia di *p53*, hanno similarità di struttura e analoga funzione biologica di soppressore di tumore e promotore dell'apoptosi, tuttavia queste proteine possono agire sia in maniera sinergica sia in antagonismo rispetto alla stessa *p53*. Se alterate possono causare degenerazione a livello di *checkpoint* e cancerogenesi (Moll, 2003).

A livello dei siti contaminati abbiamo osservato una sovraespressione del trascritto codificante per la selectina; ciò potrebbe essere indicativo della presenza di infiammazione dovuta all'esposizione ad agenti inquinanti, come suggerito dallo studio di Alfaro-Moreno *et al.*, 2002.

Nei siti 1-3 è risultata inibita anche l'espressione del gene che codifica per la proteina attivatore del ganglioside (GM2a), co-fattore dell'enzima lisosomiale per la beta-esosaminidasi A, che catalizza la degradazione del ganglioside M2, e di altre molecole contenenti il gruppo N-acetil-esosamina terminale. E' stato dimostrato che GM2a inoltre ha funzione di trasporto inter- intra-cellulare dei lipidi. Una sua deficienza porta all'accumulo del GM2 e un'alterazione della degradazione di glicolipidi. (Yanai *et al.*, 2006). Anche l'alterata espressione di trascritti lisosomiali (*cathepsin L*, *ecdysteroid regulated protein precursor*) nella ghiandola digestiva dei mitili di Marghera è interessante per lo studio dei meccanismi coinvolti in risposta agli inquinanti.

I trascritti coinvolti nella risposta immunitaria e infiammazione, e limitatamente rappresentati nel *MytArray* 1.0, mostrano invece una interessante differenza tra numero di sovra (9) e sotto espressi (18) (fig. 31). Di seguito è riportata una selezione di questi trascritti, con i relativi valori di espressione.

ID	description	2005				2006				2007			
		1	2	3	4	1	2	3	4	2	3	4	
Myt01-003D06	C-type lectin-1 [Crassostrea gigas]	-2.35	-1.39	-1.56	-1.24	-2.10	-2.11	-2.23	-1.84	-2.48	-2.05	-1.16	
Myt01-009D08	plasminogen activator [Scolopendra subspinipes]	-1.16	-0.86	-0.38	1.07	-1.44	-1.60	0.09	-1.22	-1.08	-0.56	-0.27	
Myt01-009E11	macrophage expressed protein [Haliotis rufescens]	0.81	-1.04	-0.82	-0.31	-1.68	-1.54	-0.26	-1.58	-2.56	-2.14	-2.99	
Myt01-010F02	macrophage galactose specific lectin 2 [M. musculus]	-0.09	0.77	-0.41	0.40	-2.98	-2.57	0.55	-3.32	0.17	-3.84	-2.54	
Myt01-004B08	variable region chitin-binding protein 3 [B. floridae]	-1.16	-0.65	-0.48	1.07	-0.49	-0.33	-1.06	-0.73	-1.08	-0.51	-0.33	
Myt01-005D06	defensin isoform B2 [Aedes aegypti]	-1.69	1.38	0.13	0.14	0.60	0.58	2.37	0.72	0.91	0.92	1.46	

Log₂ (test/reference) 

Tabella 7. Trascritti della risposta immunitaria ed infiammatoria differenzialmente espressi (i valori individuati come significativi dall'analisi RP sono sottolineati).

Tra i sottoespressi troviamo geni che codificano per proteine coinvolte nella risposta immunitaria (*C-lectin* –fig. 32e-, *Fc receptor IgE*, *plasminogen activator sPA*, *macrophage specific lectin*); questo suggerisce un generale indebolimento del sistema immunitario innato, la principale strategia difensiva verso i patogeni, dei mitili lagunari rispetto a quelli allevati in mare. Un'eccezione riguarda uno dei peptidi antimicrobici finora individuati in mitilo (defensina b2) che tende ad essere sovraespresso in tutti i siti tranne il sito 1-2005 (fig. 32f).

Oltre a quanto sopra descritto, nei siti lagunari si nota una particolare diminuzione di trascritti che codificano per proteine regolate dal calcio (*beta tubulin* – fig. 32d, *actin*, *myosinase III*, *sarcoplasmic calcium binding-protein*, *ependymin*, *calmodulin*), già osservato anche nei mitili esposti a contaminanti organici e metalli pesanti e in mitili nativi di Marghera (Venier *et al.*, 2006); il motivo di questa riduzione è tuttavia ancora sconosciuto. La sottoespressione di trascritti quali tubulina β , troponina T, α actina, miosina e dineina, invece, potrebbe essere spiegata con un ridotto assemblaggio e malfunzionamento del citoscheletro, in conseguenza di stress ossidativo indotto da sostanze tossiche quali polibifenili bromurati (Apraiz *et al.*, 2006).

Nonostante la variabilità inter-annuale dei livelli di espressione, molti trascritti mostrano andamenti ben interpretabili. Riporto di seguito gli istogrammi

esemplificativi di alcuni di questi trascritti, potenzialmente interessanti anche per lo studio delle risposte ad agenti inquinanti presenti nell'ambiente lagunare.

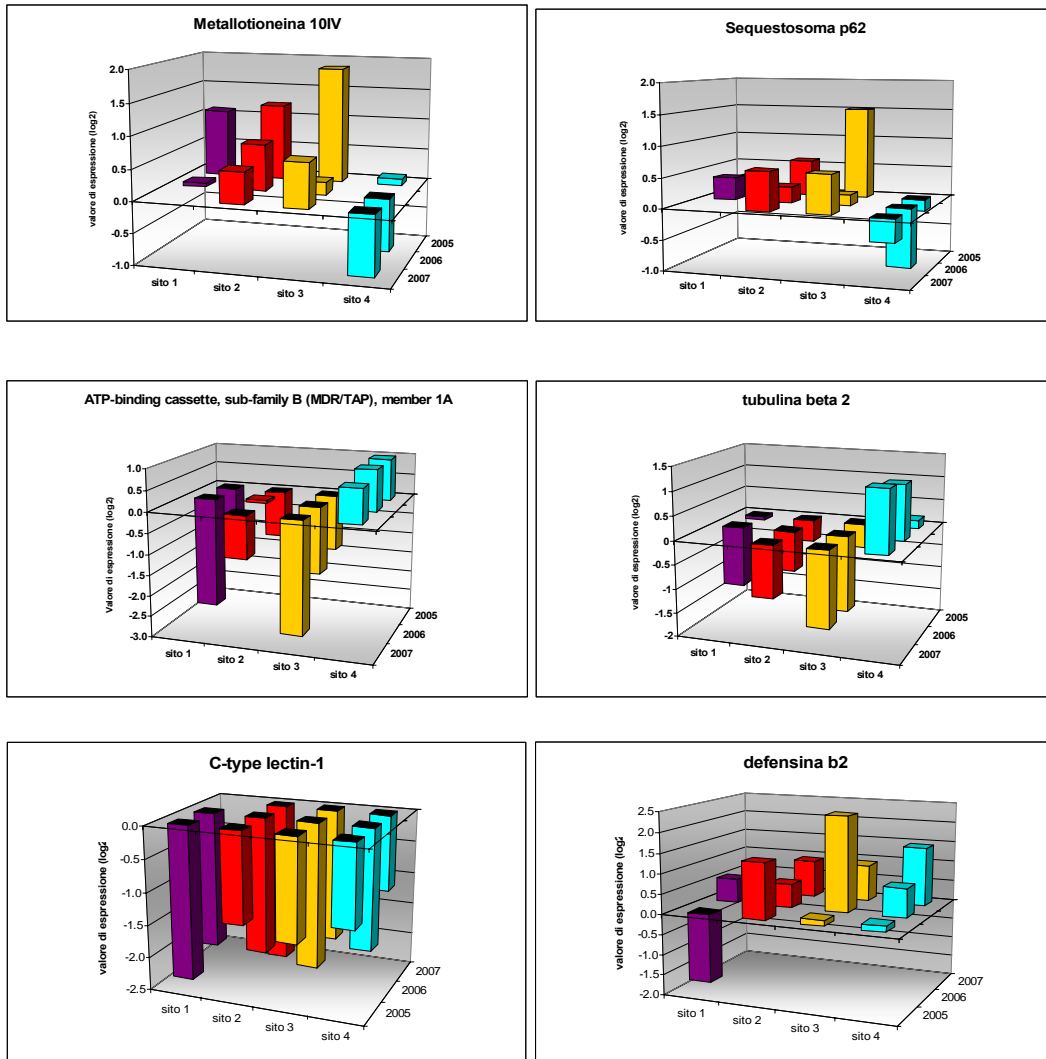


Figura 32. Variazioni trascrizionali di alcuni trascritti rappresentativi, nei 4 siti analizzati nei tre anni. In ascissa sono riportati i valori relativi di espressione in log₂.

Così come rivelato dai profili sui mitili trattati, anche in questi studi sono emersi molti trascritti privi di annotazione con livelli di espressione significativamente alterati (~50%) e che contribuiscono sostanzialmente alla definizione del profilo trascrizionale del sito considerato.

Molti di questi hanno un andamento chiaramente opposto tra i siti dei canali industriali e Lido (fig. 33) e, se convalidati e identificati, potrebbero essere utilizzati, ad esempio, come potenziali marcatori di inquinamento o di esposizione a stress ambientali.

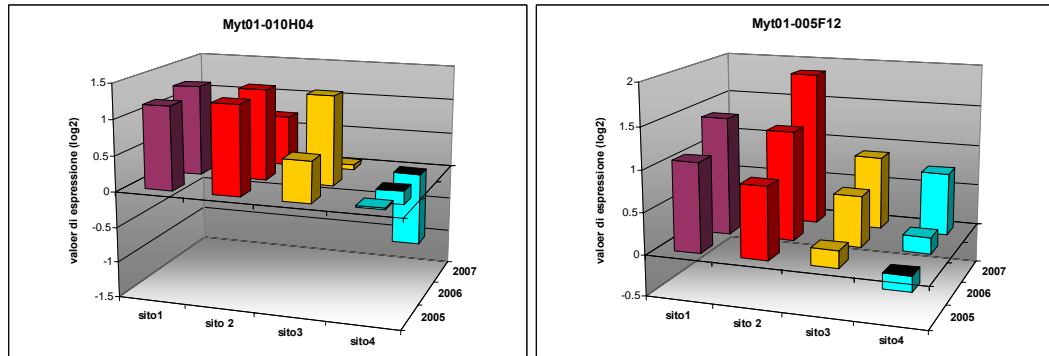


Figura 33 Nei siti industriali, la sovraespressione di due geni ancora funzionalmente sconosciuti persiste nei tre anni esaminati.

3.5. NUOVE LIBRERIE DI MITILI STRESSATI

Le potenzialità dimostrate dall'applicazione del *MytArray* 1.0 e i risultati ottenuti dallo studio del trascrittoma in mitilo, hanno stimolato il nostro gruppo di ricerca ad ampliare la collezione di ESTs di *M. galloprovincialis* e, in un futuro prossimo, a realizzare una nuova e più ampia piattaforma *microarray*. Per meglio comprendere i meccanismi molecolari, i normali processi fisiologici e le risposte funzionali indotte da agenti inquinanti e patogeni, sono state realizzate delle librerie primarie e una libreria normalizzata rappresentative di tessuti di mitili separatamente sottoposti a stress di diverso tipo, quali l'infezione con batteri, l'esposizione a tossine algali ed il trattamento con miscele di contaminanti ambientali (composti organici e metalli pesanti) (Par. 2.15, Mat. e Met.). Il notevole lavoro di produzione e sequenziamento sistematico degli inserti purificati dai cloni batterici ricombinati, ha reso disponibili circa 20'000 ESTs 3' terminali e l'individuazione di più di 7000 *cluster* di sequenze e relativi consensi. Queste sequenze e le relative informazioni sono in via di organizzazione per la realizzazione del primo database di sequenze *Mytilus galloprovincialis* (F. Bernante, C.R.I.B.I.). Inoltre potranno essere utilizzate per la sintesi di oligonucleotidi da depositare su supporti adeguati e per la realizzazione di una versione più completa del *MytArray*. Tale piattaforma assieme alla messa a punto di protocolli di ibridazione, alla deposizione di sequenze *spike* di controllo (Wilkes et al., 2007) e all'uso di nuovi strumenti di rilevazione del dato di espressione (par. 1.4.3, Introduzione), potranno essere un efficace strumento per lo studio dell'espressione genica in mitilo.

CONCLUSIONI

I risultati descritti mostrano le potenzialità della piattaforma *MytArray* 1.0 nello studio dell'espressione genica in mitilo, organismo per il quale esistono poche informazioni sui geni e sulle funzioni da essi codificate. Nonostante la complessità intrinseca della tecnologia applicata ed i possibili fattori di variazione che influenzano le risposte funzionali soprattutto in ambiente, le impronte trascrizionali rilevate mediante *MytArray* 1.0 hanno classificato correttamente diverse condizioni di trattamento e stati funzionali in mitilo. In particolare, è stato possibile discriminare gruppi di mitili trattati con contaminanti metallici a diverse dosi di esposizione (dell'ordine di parti per miliardo); inoltre sono stati caratterizzati i profili trascrizionali di mitili provenienti da diversi siti dell'ambiente lagunare veneziano, confermando i risultati in 3 anni successivi.

Pertanto, un approccio di tipo genomico per l'analisi del trascrittoma e di singoli trascritti di mitilo risulta di estrema importanza non solo per valutare le risposte indotte da contaminanti ambientali ma anche per vagliare ipotesi sui meccanismi molecolari di azione dei contaminanti, sulla loro rilevanza tossicologica, e, in parallelo con analisi tradizionali, per stabilire nuovi metodi da applicare nella sorveglianza dell'ambiente costiero.

Con la realizzazione di una piattaforma più ampia e rappresentativa di trascritti di mitili variamente stressati sarà possibile acquisire nuove conoscenze biologiche e svelare le strategie ed i meccanismi molecolari dell'adattamento fisiologico e genetico ad una varietà di cambiamenti dell'ambiente esterni, in particolare le risposte difensive attuate nei confronti di organismi patogeni. Resta d'obbligo un intenso lavoro sperimentale per l'identificazione di quei trascritti ancora poco caratterizzati o del tutto privi di annotazione genica, sfruttando e mettendo a punto in mitilo tecniche come la *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) e utilizzando le crescenti informazioni di sequenza disponibili per organismi affini al mitilo.

BIBLIOGRAFIA

- Adams M.D., Kelley J.M., Gocayne J.D., Dubnick M., Polymeropoulos M.H., Xiao H., Merri C.R., Wu A., Olde B., Moreno R.F., 1991. Complementary DNA sequencing: Expressed Sequence Tags and human genomic project. *Sci*, 252: 1651-1656.
- Akaishi F.M., St-Jean S.D., Bishay F., Clarke J., da S Rabitto I., de Oliveira Ribeiro C.A., 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat Toxicol*, 82(1): 1-14.
- Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Bonner J.C., Murray J.C., Rosas I., Rosales S.P., Osornio-Vargas A.R., 2002. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City *Environ Health Perspect*, 110(7): 715-20.
- Alguacil J., Porta M., Kauppinen T., Malats N., Kogevinas M., Carrato A., 2003. Occupational exposure to dyes, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and other agents and K-ras activation in human exocrine pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 107: 635-641.
- Almada-Villela P.C., Davenport J., Gruffyd L.L.D., 1982. The effect of temperature on the shell growth of young *Mytilus edulis*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 59: 275-288.
- Almada-Villela P.C., 1984. The effect of reduced salinity on the shell growth of small *Mytilus edulis*. *J Mar Biol Ass UK*, 64: 171-182.
- Ankley G.T., Daston G.P., Degitz S.J., Denslow N.D., Hoke R.A., Kennedy S.W., Miracle A.L., Perkins E.J., Snape J., Tillitt D.E., Tyler C.R., Versteeg D., 2006. Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environ Sci Technol*, 40(13): 4055-65.
- Apraiz I., Mi J., Cristobal S., 2006. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Mol Cell Proteomics*, 5(7): 1274-85.
- Argese E., Bettiol C., Rigo C., Bertini S., Colomban S., Ghetti P.F., 2005. Distribution of arsenic compounds in *Mytilus galloprovincialis* of the Venice lagoon (Italy). *Sci Total Environ*, 348(1-3):267-77.
- Arrigo A.P., Firdaus W.J.J., Mellier G., Moulin M., Paul C., Diazlatoud C., Kretzremy C., 2005. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods*, 35, 126-138.
- Arun S., Rajendran E.A., Subramanian E.P., 2006. Subcellular/tissue distribution and responses to oil exposure of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and glutathione S-transferase in freshwater prawns (*Macrobrachium malcolmsonii*, *M. lamarrei lamarrei*). *Ecotoxicology*, 15: 341-346.
- Auffret M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Baron J., Moraga D., Duchemin M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol Environ Safe*, 63(3): 393-405.
- Aunaas T., Denstad J.P., Zachariassen K.E., 1988. Ecophysiological importance of the isolation response of hibernating blue mussels (*Mytilus edulis*). *Mar Biol*, 98: 415-419.
- Balaam J.L., Thomas K.V., 2007. Bioanalytical characterisation of estrogen and arylhydrocarbon receptor agonists in transplanted blue mussels (*Mytilus edulis*): proof of concept. *J Environ Monit*, 9(5): 419-23.
- Banni M., Dondero F., Jebali J., Guerbej H., Boussetta H., Viarengo A., 2007. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers*, 12(4): 369-83.

- Bao W.Y., Satuito C., Yang J., Kitamura H., 2007. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms. *Mar Biol*, 150(4): 565-574.
- Barrett T., Edgar R., 2006. Gene expression omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods Enzymol*, 411: 352-369.
- Barsyte D., White K.N., Lovejoy D.A., 1999. Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. *Comp Biochem Physiol, C* 122, 287-296.
- Barucca M., Olmo E., Canapa A., 2003. *Hox* and *paraHox* genes in bivalve molluscs. *Gene* 317, 97-102.
- Bebianno M.J., Lopes B., Guerra L., Hoarau P., Ferreira A.M., 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. *Environ Int*, 33(4): 550-8.
- Beyersmann D., 2002. Effects of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicol Lett*, 127(1-3):63-8.
- Bierne N., Bonhomme F., Boudry P., Szulkin M., David P., 2006. Fitness landscapes support the dominance theory of post-zygotic isolation in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Proc Biol Sci*, 273(1591):1253-60.
- Bickham J.W., Sandhu S., Hebert P.D.N., Chikhi L., Athwal R., 2000. Effects of chemical contaminants and genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat Res*, 463(1): 33-51.
- Bolognesi C., Frenzilli G., Lasagna C., Perrone E., Roggieri P., 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutat Res*, 552: 153-162.
- Bolognesi C., Landini E., Roggieri P., Fabbri R., Viarengo A., 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ Mol Mutagen*, 33: 287-292.
- Borković S.S., Saponjić J.S., Pavlović S.Z., Blagojević D.P., Milosević S.M., Kovacević T.B., Radojčić R.M., Spasić M.B., Zikić R.V., Saicić Z.S., 2007. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 141(4):366-74
- Boscolo E., Giovanardi O., 2002. *Polydora ciliata* shell infestation in *Tapes philippinarum* Manila clam held out of the substrate in the Adriatic sea, Italy. *J Invertebr Pathol*, 79(3):197-8.
- Bourdineaud J.P., Baudrimont M., Gonzalez P., Moreau J.L., 2006. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie*, 88, 1787-92.
- Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P, 2004. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett*, 573(1-3):83-92.
- Bresler V., Abelson A., Fishelson L., Feldstein T., Rosenfeld M., Mokady O., 2003. Marine molluscs in environmental monitoring. *Helgol Mar Res*, 57:157-165.
- Bruey J.M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S.A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A.P., Kroemer G., Solary E., Garrido C., 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2, 645-652.
- Brunk U.T., Terman A., 2002. Lipofuscin: Mechanism of age related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*, 33 (5): 611-619.
- Burlando B., Bonomo M., Capri F., Mancinelli G., Pons G., Viarengo A., 2004. Different effects of Hg²⁺ and Cu²⁺ on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane Ca²⁺-ATPase: Hg²⁺ induction of protein expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 139(4):201-7.
- Canesi L., Ciacci C., Betti M., Scarpato A., Citterio B., Pruzzo C., Gallo G., 2003. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquat Toxicol*, 63(3):293-306.

- Canova S., Degan P., Peters L.D., Livingstone D.R., Voltan R., Venier P., 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutat Res*, 399: 17-30.
- Carlos S., Utales L., Borrell I., Hunt D.F., Ausio J., 1993. Sequence and characterization of a sperm-specific histone H1-like protein of *Mytilus californianus*. *J Biol Chem* 268, 185-194.
- Carrier F., Georgel P.T., Pourquier P., Blake M., Kontny H.U., Antinore M.J., Gariboldi M., Myers T.G., Weinstein J.N., Pommier Y., Fornace A.J. Jr, 1999. Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol*, 19 (3):1673-85.
- Carvalho B., Ouwerkerk E., Meijer G.A., Ylstra B., 2004. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *Am J Clin Pathol*, 57: 644-646
- Chwieralski C.E., T. Welte T. and F. Buhling F., 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*, 11: 143-149.
- Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*, 247: 295-311.
- Coe B., Antler C., 2004. Spot your genes- an overview of the microarray. Accessed on www.scq.ubc.ca.
- Cognetti G., Maltagliati F., 2004. Strategies of genetic biodiversity conservation in the marine environment. *Mar Pollut Bullet*, 48: 811-812.
- Coutryman P.I., Heddle J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 41: 321-332.
- Coustau C., Combes C., Maillard C., Renaud F., Delay B., 1990. *Prosorhynchus squamatus* (Trematoda) parasitosis in the *Mytilus edulis-Mytilus galloprovincialis* complex: specificity and host-parasite relationships. *Pathol in Mar Sci*, 291-298.
- Dagnino A., Allen J.I., Moore M.N., Broeg K., Canesi L., Viarengo A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*, 12(2): 155-72.
- Dahlmann B., 2005. Proteasomes. *Essay Biochem*. 41: 31-48.
- Dailianis S., Domouhtsidou G.P., Raftopoulou E., Kaloyianni M., Dimitriadis V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Mar Environ Res*, 56: 443-470.
- Damiens G., Gnassia-Barelli M., Loquès F., Roméo M., Salbert V., 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66(3): 574-83.
- Da Ros L., Nasci C., Marigomez I., Soto M., 2000. Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. *Mar Environ Res*, 50(1-5):417-23.
- Da Ros L., Nesto N., 2005. Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) as biomarkers of environmental stress: field studies in the Lagoon of Venice (Italy). *Environ Int*, 31(7):1078-88.
- Decreto ministeriale 367/03. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio. Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose, ai sensi dell'articolo 3, comma 4, del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152.
- Del Carmen E.M., Souza V., Bucio L., Hernandez E., Damian-Matsumura P., Zaga V., Gutierrez-Ruiz M.C., 2002. Cadmium induces α_1 collagen (I) and metallothionein

- II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology*, 170: 63–73.
- Denslow N.D., Garcia-Reyero N., Barber D.S., 2007. Fish 'n' chips: the use of *microarrays* for aquatic toxicology. *Mol Biosyst*, 2007, 3(3): 172-7.
- Ding W., Templeton D.M., 2000. Activation of parallel mitogen-activated protein kinase cascades and induction of c-fos by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 162(2):93-9.
- Dolcetti L., Venier P., 2002. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. *Mar Environ Res*, 54: 487-491.
- Domouhtsidou G.P. e Dimitriadis V.K., 2000. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental stress. *Environ pollut*, 115: 123-137.
- Donald K.M., Hawkins A.J.S. Smerdon, G.R., 2001. Transcript analysis of the genes encoding aminopeptidase N and alanine aminotransferase, two enzymes involved in protein turnover, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 128, 459-467.
- Dondero F., Piacentini L., Banni M., Rebelo M., Burlando B., Viarengo A., 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*, 345, 259-270.
- Dondero F., Piacentini L., Marsano F., Rebelo M., Vergani L., Venier P., Viarengo A., 2006. Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene*, 376: 24-36.
- Drysdale J., Arosio P., Invernizzi R., Cazzola M., Volz A., Corsi B., Biasiotto G., Levi S., 2002. Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis*, 29(3):376-83.
- Dubos, M.P., Badariotti F., Rodet F., Lelong C., Favrel P., 2003. Molecular and physiological characterization of an invertebrate homologue of a calcitonin-related receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 310, 972-978.
- Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M., 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet Suppl*, 21: 10-14.
- Duffus J.H., 2002. "Heavy metals" - a meaningless term?. *Pure Appl Chem*, 74: 793-807.
- Durand J.F., Goudard F., Pieri J., Escoubas J.M., Schreiber N., Cadoret J.P., 2004. *Crassostrea gigas* ferritin: cDNA sequence analysis for two heavy chain type subunits and protein purification. *Gene*, 338: 187-195.
- Dysvik B., Jonassen J., 2001. J-Express Exploring Gene Expression Data using Java. *Bioinformatics*; 17: 369-370.
- Emmanouil C., Sheehan T.M., Chipman J.K., 2007. Macromolecule oxidation and DNA repair in mussel (*Mytilus edulis* L.) gill following exposure to Cd and Cr(VI). *Aquat Toxicol*, 82(1):27-35.
- Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*, (6):529-39.
- Ferns G., Shams S., Shafi S., 2006. Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. *Int. J. Exp. Path.*, 87, 253-274.
- Filipic M., Fatur T., Vudrag M., 2006. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity, *Hum Exp Toxicol*. 25(2):67-77.
- Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D., Walsh A.R., 1997. Assessment of glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2: 51-56.
- Franzellitti S., Fabbri E., 2005. Differential hsp70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem Biophys Res Commun*, 336: 1157-1163.
- Fremont M., Vaeyens f., Herst C.V., De Meirleir K.L., Englebienne P., 2006. Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKP) is a stress-responsive kinase that

- induces NFkB-mediated resistance against mercury cytotoxicity. *Life Science*, 78:1845-1856.
- Funabara, D., Nakaya, M., Watabe, S., 2001. Isolation and characterization of a novel 45 kDa calponin-like protein from anterior byssus retractor muscle of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Sci*, 67. 511-517.
- Garrido C., Bruey J.M., Fromentin A., Hammann A., Arrigo A.P., Solary E., 1999. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J*, 13, 2061–2070.
- Gene Ontology Consortium, 2006. The Gene Ontology (GO) project in 2006. *Nucleic Acids Res*, 34 (Database issue):D322-6.
- Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5(10): R80.
- Ghindilis AL, Smith MW, Schwarzkopf KR, Roth KM, Peyvan K, Munro SB, Lodes MJ, Stöver AG, Bernards K, Dill K, McShea A., 2007. CombiMatrix oligonucleotide arrays: genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection. *Biosens Bioelectron* 22(9-10):1853-60
- Gibson G., 2002. Microarrays in ecology and evolution: a preview. *Mol Ecol*, 11:17-24.
- Giguère A, Couillard Y, Campbell PG, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, Pellerin J., 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol*, 64(2):185-200.
- Gilg M.R., Hilbish T.J., 2003. Patterns of larval dispersal and their effect on the maintenance of a blue mussel hybrid zone in SouthWestern England. *Evolution Int J Org Evolution*, 57(5): 1061-77.
- Goldberg E.D., 1975. The Mussel Watch a first step in global marine monitoring. *Mar Pollut Bull* 6; 111.
- Goldberg E.D., Bertine K.K., 2000. Beyond the Mussel Watch--new directions for monitoring marine pollution. *Sci Total Environ*, 247(2-3):165-74.
- Gosling E.M., 1992. Systematic and geographic distribution of *Mytilus*. In: Gosling E.M., The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 25: 1-20.
- Gottschalg E., Moore N.E., Ryan A.K., Travis L.C., Waller R.C., Pratt S., Atmaca M., Kind C.N., Fry J.R., 2006. Phenotypic anchoring of arsenic and cadmium toxicity in three hepatic-related cell systems reveals compound- and cell-specific selective up-regulation of stress protein expression: implications for fingerprint profiling of cytotoxicity. *Chem Biol Interact*, 161(3):251-61.
- Grattarola M., Carloni M., Dondero F., Viarengo A., Vergani L., 2006. Expression, purification and preliminary characterization of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) metallothionein MT20. *Mol Biol Rep*, 33: 265-272.
- Gregory T.R., 2005. Animal genome size database (<http://www.genomesize.com>).
- Hamer B., Hamer D.P., Muller W.E.G., Batel R., 2004. Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study. *Environ Int*, 30: 873-882.
- Harbers M. e Carninci P., 2005. Tag-based approaches for transcriptome research and genome annotation. *Nat Methods* 2(7): 495-502.
- Harrison P.M., Arosio P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1275(3):161-203.
- Hedgecock, D., Gaffney, P., Gouilletquer, P., Guo, X., Reece, K., Warr, G.W., 2005. The case for sequencing the oyster genome. *J Shellfish Res* 24, 429-442.

- Hedgecock D., Lin J.Z., DeCola S., Haudenschild C.D., Meyer E., Manahan D.T., Bowen B., 2007. Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Proc Natl Acad Sci*, 13;104(7):2313-8.
- Hegde P., Qi R., Abernathy K., Gay C., Dharap S., Gaspard R., Hughes J.E., Snesrud E., Lee N., Quackenbush J., 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. *BioTechniques*, 29: 548-556.
- Hoarau P., Damiens G., Romeo M., Gnassia-Barelli M., Bebianno M.J., 2006. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143:196-203.
- Hofmann G.E., Somero G.N., 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures. Seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J Exp Biol* 198:1509-1518.
- Hong F., Breitling R., McEntee C.W., Wittner B.S., Nemhauser J.L., Chory J., 2006. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics*, 22(22): 2825-7.
- Haq F., Mahoney M., Koropatnick J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, 533: 211-226.
- Hellou J., Law R.J. 2003. Stress on stress response of wild mussels, *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*, as an indicator of ecosystem health. *Environ Pollut*, 126(3):407-16.
- Hook S.E., Skillman A.D., Small J.A., Schultz I.R., 2006. Gene expression patterns in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a suite of model toxicants. *Aquat Toxicol*, 25;77(4):372-85.
- Hughes T.R., Mao M., Jones A.R., Burchard J., Marton M.J., Shannon K.W., Lefkowitz S.M., Ziman M., Schelter J.M., Meyer M. R., Kobayashi S., Davis C., Dai H., He Y.D., Stephanians S.B., Cavet G., Walker W.L., West A., Coffey E., Shoemaker D.D., Stoughton R., Blanchard A.P., Friend S.H., Linsley P.S., 2001. Expression profiling using microarray fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnol*, 19: 342-347.
- Jeffery I.B., Higgins D.G., Culhane A.C., 2006. Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. *BMC Bioinformatics*, 7: 359.
- Jeffrey A.K., Ouyang B., Knudsen E., Fukasawa K., Babcock G., Fagin J., 2006. Oncogenic RAS Induces Accelerated Transition through G2/M and Promotes Defects in the G2 DNA Damage and Mitotic Spindle Checkpoints. *J Biol Chem*, 281(7): 3800-3809.
- Jenny M.J., Chapman R.W., Mancina A., Chen Y.A., McKillen D.J., Trent H., Lang P., Escoubas J.M., Bachere E., Boulo V., Liu Z.J., Gross P.S., Cunningham C., Cupit P.M., Tanguy A., Guo X., Moraga D., Boutet I., Huvet A., De Guise S., Almeida J.S., Warr G.W., 2007. A cDNA microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Mar Biotechnol*, 9(5): 577-91.
- Kalpaxis D.L., Theos C., Xaplanteri M.A., Dinos G.P., Catsiki A.V., Leotsinidis M., 2004. Biomonitoring of Gulf of Patras, N. Peloponnesus, Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in *Mytilus galloprovincialis* cells. *Environ Res*, 94: 211-220.
- Kaloyianni M., Ragia V., Tzeranaki I., Dailianis S., 2006. The influence of Zn on signaling pathways and attachment of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes to extracellular matrix proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 144(1):93-100.
- Kane M.D., Jatko T., Stumpf C., Lu J., Thomas J., Madore S., 2000. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res*, 28 (22): 4552-4557.

- Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita K.F., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M., 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res*, 34 (Database issue):D354-7.
- Kato K., Ito H., Iwamoto I., Iida K., Inaguma Y., 2001. Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. *Cell Stress Chaperones* 6, 16–20.
- Kausch U., Alberti M., Haindl S., Budczies J., Hock B., 2008. Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: Gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol*, in press.
- Kefaloyianni E., Gourgou E., Ferle V., Kotsakis E., Gaitanaki C., Beis I., 2005. Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *J Exp Biol*, 208 (23): 4427-36
- Khessiba A., Hoarau P., Gnassia-Barelli M., Aissa P., Romeo M., 2001. Biochemical response of mussel *Mytilus galloprovincialis* from bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*, 4: 222-229.
- Kim Y.I., Cho J.H., Yoo O.J., Ahnn J., 2004. Transcriptional regulation and life-span modulation of aconitase and ferritin genes in *C. elegans*. *J Mol Biol*, 342: 421-433.
- Kimura, T., Nakano, T., Yamaguchi, T., Sato, M., Ogawa, T., Muramoto, K., Yokoyama, T., Kan-no, N., Nagahisa, E., Janssen, F., Grieshaber, M.K., 2005. Complementary cDNA cloning and molecular evolution of opine dehydrogenases in some marine invertebrates. *Mar Biotechnol* 6, 493-502.
- Kirby J., Heath P.R., Shaw P.J., Hamdy F.C., 2007. Gene expression assays. *Adv Clin Chem*, 44: 247-92.
- Korashy H.M., El-Kadi A.O., 2007. The role of redox-sensitive transcription factors NF-kappaB and AP-1 in the modulation of the Cyp1a1 gene by mercury, lead, and copper. *Free Radic Biol Med*, in press.
- Koskinen H., Pehkonen P., Vehniainen E., Krasnov A., Rexroad C., Afanasyer S., Molsa H., Oikari A., 2004. Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. *Biochem Biophys Res Commun*, 320: 745-753.
- Koukouzika N., Dimitriadis V.K., 2005. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: "lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress". *Ecotox*, 14(4): 449-63.
- Kucuksezgin F., Kayatekin B.M., Uluturhan E., Uysal N., Acikgoz O., Gonenc S., 2007. Preliminary investigation of sensitive biomarkers of trace metal pollution in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Izmir Bay (Turkey). *Environ Monit Assess*; in press.
- Lemoine S., Bigot Y., Sellos D., Cosson R.P., Laulier M., 2000. Methallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper, *Mar Biotechnol*-NY 2, 195-203.
- Lemoine S., Bigot Y., Sellos D., Cosson R.P., Laulier M., 2000. Metallothionein Isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA Characterization and Quantification of Expression in Different Organs after Exposure to Cadmium, Zinc, and Copper. *Mar Biotechnol*, (2):195-203.
- Leignel V., Laulier M., 2006. Isolation and characterization of *Mytilus edulis* metallothionein genes. *Comp Biochem Physiol C* 142: 12-18.
- Lettieri T., 2006. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ Health Perspect*, 114(1): 4-9.
- Li S., Xie L., Zhang C., Zhang Y., Gu M., Zhang R., 2004. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp Biochem Physiol B* 138, 235-243.

- Liang P. e Pardee A.B., 1992. Differential display of eukaryotic RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257(5072): 967-971.
- Lindner G., 1999. Muschel und Schnecken der Weltmeer: Aussehen, Vorkommen, Systematik. bearb und erw. Aufl., Neuausg-Munchn: BLV. (accessed www.weichtiere.at).
- Liston P., Fong W.G., Korneluk R.G., 2003. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 22, 8568–8580.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Livingstone D.R., Pipe R.K., 1992. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling E.M., The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 25: 425-464.
- Lloyd D.R., Phillips D.H., Carmichael P.L. 1997. Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem Res Tox*, 10: 393-400.
- Lyons C., Bowling V., Tedengren M., Gardeström J., et al., 2003. Variability of heat-shock proteins and glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res*, 56: 585-597
- Lutz R.A., Kennish M.J., 1992. Ecology and morphology of larval and early postlarval mussels. In: Gosling E.M., The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 25: 53-80
- Mak S.K., Kültz D., 2004. Gadd45 proteins induce G2/M arrest and modulate apoptosis in kidney cells exposed to hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, 279(37):39075-84.
- Manduzio H., Monsinjon T., Galap c., Leboulenger F., Rocher B., 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicol*, 70: 83-93.
- Marigómez I., Soto M., Cajaraville M.P., Angulo E., Giamberini L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Micros Res Tech*, 56: 358–392.
- Marin M.G., Boscolo R., Cella A., Degetto S., Da Ros L., 2006. Field validation of autometallographical black silver deposit (BSD) extent in three bivalve species from the Lagoon of Venice, Italy (*Mytilus galloprovincialis*, *Tapes philippinarum*, *Scapharca inaequivalvis*) for metal bioavailability assessment. *Sci Total Environ*. 371(1-3): 156-67.
- Martin D.E., Demougin P., Hall M.N., Bellis M., 2004. Rank difference analysis of Microarray (RDAM), a novel approach to statistical analysis of microarray expression profiling data. *BCM Bioinformatics*, 5(1): 1-48.
- Mc Donagh B., Sheehan D., 2006. Redox proteomics in the blue mussel *Mytilus edulis*: Carbonylation is not a pre-requisite for ubiquitination in acute free radical-mediated oxidative stress. *Mar Environ Res*, 62: 101-104.
- Mengoli, 1998. Documento consultabile a (www.regione.emilia-romagna.it)
- Møhlenberg F., Riisgard H.U., 1977. Efficiency of particle retention in thirteen species of suspension feeding bivalves. *Ophelia*, 17: 239-246.
- Moll U.M., 2003. The role of p63 and p73 in tumor formation and progression: coming of age toward clinical usefulness, 2003 *Clin Cancer Res*, 9: 5501-5507.
- Mondragón L, Orzáez M, Sancelimens G, Moure A, Armiñán A, Sepúlveda P, Messeguer A, Vicent MJ, Pérez-Payá E., 2008. Modulation of Cellular Apoptosis with Apoptotic Protease-Activating Factor 1 (Apaf-1) Inhibitors. *J Med Chem*, in press.
- Moscatiello R., Mariani P., Sanders D., Maathuis F.J., 2006. Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *J Exp Bot*, 57(11): 2847-65.

- Mosley J. D., Keri R. A., 2006. Splice variants of mIAP1 have an enhanced ability to inhibit apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 1174–1183.
- Mubiana V. e Blust R., 2006. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu, and Pb by marine bivalve *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 63: 219-235.
- Nawaz M., Manzl C., Krumschnabel G., 2005. *In vitro* toxicity of copper, cadmium, and chromium to isolated hepatocytes from carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull Environ Contam Toxicol* 75: 652–661.
- Nesto N., Nasci C., Pra Levis F., Meneghetti F., Meschino V., Da Ros L., 2003. CoRiLa. Scientific Research and Safeguarding of Venice. Volume III: pag. 215-226. Campostrini ed.
- Nicholson S. e Lam P.K., 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (*Mytilidae*: Bivalvia). *Environ Int*, 31: 121-132.
- Nigro M., Falleni A., Barga I.D., Scarcelli V., Lucchesi P., Regoli F., Frenzilli G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. *Aquat Toxicol*, 77(4): 339-47.
- Obata M, Sano N, Kawamura K, Komaru A, 2007. Inheritance of two M type mitochondrial DNA from sperm and unfertilized eggs to offspring in *Mytilus galloprovincialis*. *Dev Growth Differ*, 49(4):335-44.
- Ohtsu K, Smith MB, Emrich SJ, Borsuk LA, Zhou R, Chen T, Zhang X, Timmermans MC, Beck J, Buckner B, Janick-Buckner D, Nettleton D, Scanlon MJ, Schnable PS., 2007. Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.). *Plant J*, 52(3):391-404.
- Ohtsuka K., Kawashima D., Gu Y., Saito K., 2005. Inducers and co-inducers of molecular chaperones. *Int. J. Hypert.*, 21(8): 703–711.
- Ordas M.C., Albaiges J., Bayona J.M., Ordas A., Figueras A., 2007. Assessment of *in vivo* effects of the prestige fuel oil spill on the mediterranean mussel immune system. *Arch Environ Contam Toxicol*, 52(2): 200-6.
- Orino K., Lehman L., Tsuji Y., Ayaki H., Torti S.V., Torti F.M., 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J*, 357: 241-247.
- Pallavicini A., Del Mar Costa M., Gestal C., Dreos R., Figueras A., Venier P., Novoa B., 2008. High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. *Dev Comp Immunol*, (3):213-26.
- Peng R.H., Xiong A.S., Xue Y., Li X., Liu J., Cai B., Yao Q. H., 2008. Kamchatka crab duplex-specific nuclease-mediated transcriptome subtraction method for identifying long cDNAs of differentially expressed genes. *Analytical Biochemistry* 372 (2008) 148–155
- Prato E, Biandolino F., 2007. Combined toxicity of mercury, copper and cadmium on embryogenesis and early larval stages of the *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Technol*, 28(8):915-20.
- Ravera O., 2000. The Lagoon of Venice: the result of both natural factors and human influence. *J Limnol*, 59(1): 19-30.
- Rayyan A., Photis G., Chintiroglou C.C., 2004. Metazoan parasite species in cultured mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Thermaikos Gulf (North Aegean Sea, Greece). *Dis Aquat Organ*, 58(1): 55-62.
- Rebrikov D.V., Desai S.M., Siebert P.D., Lukyanov S.A., 2004. Suppression subtractive hybridization. *Methods Mol Biol*, 258:107-134
- Riginos C., Cunningham C.W., 2005. Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* x *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Mol. Ecol.*, 14(2):381-400.
- Rivera S.P., Wang F., Saarikoski S.T., Taylor R.T., Chapman B., Zhang R., Hankinson O., 2007. A novel promoter element containing multiple overlapping xenobiotic

- and hypoxia response elements mediates induction of cytochrome P450S1 by both dioxin and hypoxia. *J Biol Chem*, 282(15): 10881-93.
- Saavedra C., Bachère E., 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture*, 256: 1-14.
- Saeed A.I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Sturn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z., Vinsavich A., Trush V., Quackenbush J., 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 34, 374–378.
- Santovito G., Piccinni E., Cassini A., Irato P., Albergoni V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 140(3-4): 321-9.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235): 467-470.
- Secco, T., 2004. The changing state of contamination in the lagoon of Venice. Part 1: organic pollution. *Chemosphere*, 58: 279-290.
- Seibenhener M.L., Babu J.R., Geetha T., Wong H.C., Krishna N.R., Wooten M.W., 2004. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*, 24(18): 8055-8068.
- Shaw J.P., Large A.T., Donkin P., Evans S.V., Staff F.J., Livingstone D.R., Chipman J.K., Peters L.D., 2004. Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol*, 67(4):325-36.
- Sheikh M.S., Hollander M.C., Fornace Jr A.J., 2000. Role of Gadd45 in apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 59: 43–45.
- Shih J.H., Michalowska A.M., Dobbin K., Qiu T.H., Green J.E., 2004. Effects of pooling mRNA in microarray class comparisons. *Bioinformatics*, 20(18):3318-25.
- Simpson S.A., Alexander D.J., Reed C.J., 2005. Induction of heat shock protein 70 in rat olfactory epithelium by toxic chemicals: in vitro and in vivo studies. *Arch Toxicol*, 79: 224-230.
- Skibinski D.O.F., Gallagher C., Beynon C.M., 1994. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138, 801-809.
- Snyder M.J., Girvetz E., Mulder E.P., 2001. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch Environ Contam Toxicol*, 41: 22-29.
- Soazig L., Marc L., 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Mar Pollut Bull*, 46(11): 1450-1455.
- Sokal R.R., Rohlf F.J., 1995. Assumptions of Analysis of Variance. In: *Biometry*, 3rd edn. Freeman, New York, USA, pp. 390–450.
- Southern E.M., Maskos U., 1994. Parallel synthesis and analysis of large numbers of related chemical compounds: applications to oligonucleotides. *J Biotechnol*, 35: 217-227.
- Steiner, G., Müller, M., 1996. What can 18S rDNA do for bivalve Phylogeny? *J. Mol. Evol.* 43, 58-70.
- Stoughton R.B., 2005. Applications of DNA Microarrays in Biology. *Annu Rev Biochem*, 74: 53-82.
- Sun C., Lucas J.M, Waite J.H., 2002. Collagen-binding matrix proteins from elastomeric extraorganismic byssal fibers. *Biomacromolecules*, 3(6): 1240-8.
- Suzuki, T., Sugimura, N., Taniguchi, T., Unemi, Y., Murata, T., Hayashida, M., Yokouchi, K., Uda, K., Furukohri, T., 2002. Two-domain arginine kinases from the clams *Solen strictus* and *Corbicula japonica*: exceptional amino acid replacement of the functionally important D62 by G. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1221-1229.

- Suzuki Y., Nakabayashi Y., Takahashi R., 2001. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci, U.S.A.* 98, 8662-8667.
- Tanguy A., Bierne N., Saavedra C., Pina B., Bachère E., Kube M., Bazin E., Bonhomme F., Boudry P., Boulo V., Boutet I., Cancela L., Dossat C., Favrel P., Huvet A., Jarque S., Jollivet D., Klages S., Lapègue S., Leite R., Moal J., Moraga D., Reinhardt R., Samain J.F., Zouros E., Canario A., 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene*, 408 (1-2): 27-36.
- Takeuchi M, Mizuta C, Uda K, Fujimoto N, Okamoto M, Suzuki T, 2004. Unique evolution of *Bivalvia* arginine kinases. *Cell Mol Life Sci*, 61, 110-117.
- Tesniere C., Vayda M.E., 1991. Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Mol Biol*, 9: 242-251.
- Tusher V.G., Tibshirani R., Chu G., 2001. Significance Analysis of Microarrays applied to the ionizing radiation exposure. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98(9): 5116-5121.
- Usero J., Morillo J., Gracia I., 2005. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere.*; 59(8):1175-81.
- Vasseur P., Cossu-Leguille C. 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere*, 62(7):1033-42.
- Velculescu V.E., 2000. Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. *TIG*, 16(10): 423-425.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. 2005. Metal, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med Chem*, 12: 1161-1208.
- Venier P., 1999. Individuazione di danno genetico in organismi dell'ecosistema lagunare. Progetto 2023, Rapporto finale (Università di Padova, Magistrato alle Acque, Consorzio Venezia Nuova), pp. 34.
- Venier P., Pallavicini A., De Nardi B., Lanfranchi G., 2003. Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene* 314, 29-40.
- Venier P., Zampieron C., 2005. Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. *Environ Int*, 31(7): 1053-64.
- Venier P., De Pittà C., Pallavicini A., Marsano F., Varotto L., Romualdi C., Dondero F., Viarengo A., Lanfranchi G., 2006. Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutat Res*, 602(1-2): 121-34.
- Vergani L., Grattarola M., Borghi C., Dondero F., Viarengo A., 2005. Fish and molluscan metallothioneins. *FEBS Journal*, 272(23): 6014-6023.
- Vergani L., Grattarola M., Grasselli E., Pondero F., Viarengo A., 2007. Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Biochem Biophys*, 465(1): 247-253.
- Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E., Blasco J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 277:1612-1619.
- Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M.J., Valavanidis A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar Pollut Bull*; 54(9): 1361-71.
- Waite J.H., Quin X., 2001. Polyphosphoprotein from the adhesive pads of *Mytilus edulis*. *Biochemistry* 40, 2887-2893.

- Wang Z., Templeton D.M., 1998. Induction of c-fos proto-oncogene in mesangial cells by cadmium. *J Biol Chem*, 273(1):73-9.
- Widdows J., Donkin P., 1992. Mussel and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling E.M., The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Developments in *Aquaculture and Fisheries Science*, vol. 25, pp. 383-417.
- Williams T., Gensberg K., Minchin S., Chipman J., 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquat Toxicol*, 65: 141-57.
- Wilkes T., Laux H, Foy CA, 2007. *Microarray* data quality - review of current developments. 11(1):1-13.
- Wu B., 2005. Differential gene expression detection using penalized linear regression models: the improved SAM statistics. *Bioinformatics*, 21 (8): 1565-1571.
- Wu L., Liu X., Schadt C.W., Zhou J., 2006. Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. *Appl Environ Microbiol*.72(7):4931-41.
- Xiang C.C., Chen Y., 2000. cDNA *microarray* technology and its applications. *Biotechnol Adv*, 18: 35-46.
- Xiao P., Bu Y., Zhang X., Wu H., Zhou G., Lu Z., 2005. Assembly fabrication of oligonucleotides arrays. *J Nanosci Nanotechnol*, 5(8): 1211-1215.
- Xu, B., Janson, J.C., Sellos, D., 2001. Cloning and sequencing of a molluscan endo- β -1,4-glucanase gene from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Eur J Biochem* 268, 3718-3727.
- Yanai H., Yoshida H., Tomono Y., Tada N., Chiba H., 2006. The possible contribution of a general glycosphingolipid transporter, GM2 activator protein, to atherosclerosis, *J Atheroscler Thromb* 13(6): 281-5.
- Yang H. L., Zeng Q. Y., Li E. Q., Zhu S. G., Zhou X.W., 2004. Molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase from *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol B* 139, 175-182.
- Yang Y. H., Dudoit S., Luu P., Speed T.P., 2001. Normalization for cDNA microarray data. In *Microarrays: optical technologies and informatics* vol. 4266, Bittner M., Chen Y., Dorsel A., Dougherty E. R. (eds), San Jose, CA, USA: SPIE, 141-152.
- Yu J., Othman M., Farjo R., Zarepari S., MacNee S., Yoshida S., Swaroop A., 2002. Evaluation and optimization of procedures for target labeling and hybridization of cDNA microarray. *Mol vis*, 8: 130-137.
- Yuan Z., Courtenay S., Chambers R.C., Wirgin I., 2006. Evidence of spatially extensive resistance to PCBs in an anadromous fish of the Hudson River. *Environ Health Perspect*, 114(1): 77-84.
- Zhang B., Georgiev O., Hagmann M., Gunes C., Cramer M., Faller P., Vasak M., Schaffner W., 2003. Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol*, 23: 8471-8485.
- Zhang, Y., Meng, Q., Jiang, T., Wang, H., Xie, L., Zhang, R., 2003. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp Biochem Physiol B* 135, 43-54.
- Zhang W., Carriquiry A., Nettleton D., Dekkers J. C. M., 2007. Pooling mRNA in microarray experiments and its effect on power. *Bioinformatics*, 23(10): 1217-24.
- Zavasnik-Bergant T., Turk B., 2006. Cysteine cathepsins in the immune response. *J compilation*, 67: 349-355.
- Zorita I., Bilbao E., Schad A., Cancio I., Soto M., Cajaraville M.P., 2007. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220(2):186-96.

PUBBLICAZIONI DEL DOTTORANDO

Venier P, De Pittà C., Pallavicini A, Marsano F, **Varotto L**, Romualdi C, Dondero F, Viarengo A, Lanfranchi G, 2006. Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutat Res*, 602: 121-134.

De Pittà C, Pallavicini A, Marsano F, **Varotto L**, Lanfranchi G, Viarengo A, Romualdi C, Venier P., 2005. Understanding the functional responses of *M. galloprovincialis* and *Z. ophiocephalus* by gene identification and gene expression profiling. *Scientific Research and Safeguarding of Venice. Research Programme 2001-2003*. Vol III (2003 results), P.P. Campostrini Ed., CORILA (Venezia) pp. 437-442.

Varotto L. et al., 2008. Transcriptional changes and genotoxicity of a metal mixture in gills of *Mytilus galloprovincialis*. In preparazione.

Varotto L. et al., 2008. Transcriptional profiles in Venice Lagoon mussels. In preparazione.

Varotto L., Domeneghetti S., Rosani U., Pallavicini A., Bisol P.M., Lanfranchi G., Venier P., 2008. DNA microarray analysis in *Mytilus galloprovincialis* from the Venice lagoon.

COMUNICAZIONI A CONGRESSO

Nasci C., Capodaglio G., Lanfranchi G., Venier P., Delaney E., Picone M., **Varotto L.** *Quicksilver*: trasferimento di metodologie avanzate di chimica ed ecotossicologia, da applicarsi nell'ambito dei monitoraggi degli ambienti marino-costieri, per la valutazione della qualità degli ecosistemi acquatici. Convegno di Azione Biotech II, Ricerca per le Biotecnologie nel Veneto, CNR - Istituto di Ingegneria Biomedica, Padova, 16 ottobre 2007.

Lanfranchi G., Nasci C., Delaney E., Venier P., De Pittà C., **Varotto L.**, Barbanti A. *BIOMIT*: sviluppo ed applicazione di biotecnologie genomiche in mitilo per il controllo dell'ambiente costiero e degli stock alimentari. Azione Biotech II, Ricerca per le biotecnologie nel Veneto, CNR - Istituto di Ingegneria Biomedica, Padova, 16 ottobre 2007.

Varotto L., De Nardi B., Pallavicini A., De Pittà C., Lanfranchi G., Venier P. *Advancements in the functional genomics of Mytilus galloprovincialis*. Marine Genomics, an International Conference, Sorrento (Na), Italy, 28 Oct-1 Nov 2006.

Pallavicini A., De Pittà C., De Nardi B., **Varotto L.**, Dreos R., Gasperini D., Venier P. Gene transcription profiling and innate immune responses in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. ISDCI 2006 1-7 July 2006, Charleston, NC, USA, p. 242.

Varotto L., De Pittà C., Pallavicini A., Lanfranchi G., Venier P. Understanding stress-induced responses by gene expression profiling (*MytArray* 1.0) in *Mytilus galloprovincialis*. Aqua 2006: The Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Firenze, Italy, 9-13 May 2006.

Varotto L., De Pittà C., Pallavicini A., Lanfranchi G., Venier P. Advancement of gene expression profiling in *M. galloprovincialis*. Quinta Riunione Annuale programma di ricerca 2004-2006 risultati del secondo anno, Palazzo Franchetti, Venezia, 26- 28 aprile 2006.

De Pittà C., Pallavicini A., Marsano F., **Varotto L.**, Lanfranchi G., Venier P. EST identification in *Z. ophiocephalus*. 3rd Fish Immunology Workshop. Wageningen (The Netherlands), 10-14 April 2005.

De Pittà C., Pallavicini A., Marsano F., **Varotto L.**, Lanfranchi G., Viarengo A., Venier P. Gene identification and gene expression profiling for understanding the organism's response to environmental variation. Quarta Riunione Annuale programma di ricerca 2004-2007 risultati del primo anno, Palazzo Franchetti, Venezia, 14-16 aprile 2005