

**ALMA MATER STUDIORUM**

**UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

**SCUOLA DI SCIENZE**

**Corso di laurea magistrale in Biologia Marina**

**Titolo tesi**

Studio di profili di espressione di geni coinvolti nello sviluppo larvale del Mitilo *Mytilus galloprovincialis*.

**Tesi di laurea in**

Adattamenti degli animali all'ambiente marino

**Relatore**

Prof. Elena Fabbri

**Presentata da**

Francesco Pretolani

**Correlatore**

Dott. Silvia Franzellitti

III sessione

Anno accademico 2014/15

## INDICE

<b>1) INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 Morfologia strutturale	2
1.2 Riproduzione e sviluppo larvale	4
1.3 Biomineralizzazione	8
1.4 Protein chinasi A	12
1.5 Recettori della serotonina	13
1.6 Proteine Strutturali	14
1.7 Meccanismi di citoprotezione	17
1.7.1 Stress ossidativo e catalasi	18
1.7.2 Detossificazione e glutazione S-transferasi	19
1.7.3 Trasporto di membrana	20
<b>2) SCOPO DELLA TESI</b>	<b>24</b>
<b>3) MATERIALI E METODI</b>	<b>26</b>
3.1 Fertilizzazione in vitro	26
3.1.1 Caratterizzazione di profili trascrizionali, attività basale della PKA, attività basale dei trasportatori MXR	27
3.1.2 Sviluppo larvale in presenza di modulatori del sistema di traduzione cAMP/PKA dipendente	27
3.2 Analisi dell'espressione genica	27
3.2.1 Estrazione e purificazione RNA totale	28
3.2.2 Retrotrascrizione	28
3.2.3 Real Time PCR	28
3.3 Selezione dei geni di riferimento	30
3.4 Attività del sistema di multixenobiotic resistance	31

3.5 Attività dell'enzima protein-chinasi A	32
3.6 Dosaggio delle proteine	33
3.7 Analisi statistica	34
<b>4) RISULTATI</b>	<b>35</b>
4.1 Geni di riferimento	35
4.2 Espressione geni target	37
4.3 Attività di resistenza multixenobiotica	43
4.4 Attività della protein-chinasi A	44
<b>5) DISCUSSIONE</b>	<b>45</b>
<b>6) BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>

## (1) INTRODUZIONE

Il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) è un mollusco appartenente alla classe Bivalvia, ordine Mytiloida e famiglia Mytilidae. Questa specie è endemica nell'Atlantico nord-orientale fino alle Isole Britanniche, nel Mare del Nord, nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero. come specie aliena invece il mitilo mediterraneo è presente in diverse regioni del mondo, motivo per cui è stato inserito nella lista “*100 of the World's Worst Invasive Alien Species*” stilata dalla IUNC (Unione Internazionale per la Conservazione della Natura). Questo mollusco viene largamente allevato tramite mitilicoltura a causa dell'elevato interesse commerciale; assume inoltre notevole importanza dal punto di vista ambientale essendo uno fra gli organismi sentinella più utilizzati e studiati. I mitili sono filtratori sessili bentonici che vivono solitamente in comunità numerose, capaci di colonizzare una vasta gamma di substrati naturali e artificiali, come scogliere artificiali, in materiale plastico o in metallo, e banchine portuali, ma anche corde galleggianti, legname e boe; non di rado si trovano mitili persino in frammenti di polistirolo o buste di plastica. Questi molluschi hanno una straordinaria capacità di adattamento e possono tollerare elevate variazioni dei parametri fisico-chimici marini. In condizioni ottimali di temperatura (~20°C) un singolo esemplare è capace di filtrare fino a 5 litri di acqua al minuto, mentre, al calare della temperatura, la velocità di filtraggio si riduce (~5 l/h a 15°C) e conseguentemente anche il tasso di accrescimento. Nonostante siano apparentemente in grado di tollerare pressioni molto elevate, a causa dello stile di alimentazione che necessita della presenza di abbondante nutrimento, composto principalmente da alghe unicellulari, protozoi e piccoli invertebrati, questi organismi sono presenti solo dalla superficie fino a pochi metri di profondità. Questo accade poiché, a profondità maggiori, il cibo non è sufficiente al sostentamento.

Al fine di comprendere il motivo per il quale i mitili vengono considerati buoni organismi sentinella non basta conoscerne l'ecologia, ma è necessario approfondirne gli aspetti anatomici e fisiologici. Non essendo tuttavia negli intenti di questo testo un'esaustiva spiegazione delle caratteristiche e delle capacità dei mitili, nelle pagine a seguire saranno dunque riportate informazioni di base, atte alla miglior comprensione dell'elaborato.

## 1.1 MORFOLOGIA STRUTTURALE

Come già accennato *M. galloprovincialis* fa parte dei Bivalvi (o Lamellibranchi); questi animali sono compressi lateralmente ed il loro corpo molle è parzialmente o completamente racchiuso all'interno della conchiglia. La conchiglia è strutturata in due valve in genere simmetriche, destra e sinistra, con funzione protettiva. Le valve sono unite da un legamento e si articolano tramite la cerniera. La conchiglia è costituita da una matrice organica formata da proteine, da mucopolisaccaridi e da una frazione inorganica formata da cristalli di carbonato di calcio sotto forma di calcite (cristalli esagonali) o di aragonite (cristalli romboidali). Il legamento elastico ha forma cilindrica ed è fissato ai bordi dorsali delle valve. Grazie al suo posizionamento ed alla sua elasticità è possibile l'apertura delle valve. Il legamento è caratterizzato da una sostanza con caratteristiche analoghe alla chitina: la conchiolina. L'azione svolta dal legamento è antagonista a quella dei muscoli adduttori, che permettono la chiusura delle valve. Nel punto di inserzione di questi muscoli, situato nella facciata interna delle valve, le inserzioni sono riconoscibili da impronte ben evidenti. Nella quasi totalità dei molluschi Bivalvi i muscoli sono composti da fibre muscolari lisce e striate, le prime caratterizzate dall'aspetto madreperlaceo, le seconde vitreo. Le fibre lisce garantiscono la contrazione lenta che consta di un basso consumo energetico, mentre le fibre striate permettono un'azione rapida, ma ad un più elevato costo energetico. Quando è richiesta una rapida chiusura delle valve l'organismo mette in funzione la muscolatura striata che, dato l'alto costo energetico, è di breve durata. Quando invece l'animale necessita di trattenere a lungo le valve chiuse, come nel caso di prolungata emersione dovuta alla bassa marea, viene estrinsecata la funzione della muscolatura liscia. L'azione dei muscoli adduttori non è costante ma presenta ritmicità. Questa ritmicità è rappresentata da un lento periodo di rilassamento, durante il quale le valve sono parzialmente aperte, seguito da un periodo di contrazione più rapido che provoca la chiusura delle valve stesse. All'attività muscolare partecipano entrambe le tipologie di fibre.

Il mantello è composto da tessuto a struttura molle ed ha la funzione di avvolgere i visceri del mollusco. E' fissato alla regione dorsale strutturandosi in due lobi e presenta un'apertura inalante nella regione ventrale, attraverso la quale entra acqua, ed un'apertura esalante vicino al muscolo adduttore posteriore, dalla quale l'acqua viene espulsa dopo l'estrazione di particelle alimentari e di ossigeno disciolto. Spesso i bordi del mantello si protraggono formando due sifoni, uno inalante e l'altro esalante. Grazie alla presenza di particolari prolungamenti che si intrecciano quando le valve vengono aperte, si viene a definire una struttura filtrante che impedisce a particelle di grosse dimensioni di entrare e venire a contatto con i visceri. Il mantello è a stretto contatto con tre muscoli

adduttori che lo attraversano, due sottili anteriori e uno di più grosse dimensioni posizionato posteriormente.

La bocca è subterminale e non presenta radula. È formata da una fenditura trasversale le cui labbra si prolungano in entrambi i lati dell'orifizio tramite i palpi labiali. Medio-ventralmente, la massa viscerale forma una sacca, dietro la quale è presente il piede; quest'ultimo assume forme molto diversificate in base alla specie ed al suo adattamento. Troviamo infatti un piede estremamente sviluppato in quegli organismi Bivalvi a vita fossoria per i quali il piede svolge la fondamentale funzione di scavare nel substrato o di locomozione. Nelle specie fisse come il mitilo, nelle quali il suo utilizzo è scarso, il piede è di molto ridotto o addirittura assente. In molte specie, fra cui il mitilo mediterraneo, sulla linea medio-ventrale del piede è visibile una ghiandola chiamata ghiandola bel bisso, che produce un secreto organico filamentoso principalmente composto da proteine afferenti al gruppo collagene. Il bisso, se a contatto con acqua, coagula legando l'organismo al substrato solido. Per molti aspetti le fibre del bisso sono simili alle altre fibre naturali ma differiscono per due caratteristiche: la sezione trasversale è sempre ellittica ed il contenuto di azoto è molto basso ( $13,0 \pm 0,3$  %). Nei Mitilidi la capacità di secernere bisso si conserva per tutta la vita dell'animale, indice di alta affinità con habitat caratterizzati da correnti che permettono una buona resa in quanto a microfagia per filtrazione e ad assimilazione di ossigeno.

L'apparato digerente consta di un breve esofago che si getta in un ampio stomaco e di un lungo intestino. Lo stomaco è caratterizzato da ripiegamenti e fori nelle pareti, rappresentanti gli orifizi dei diverticoli digerenti. I diverticoli sono particolarmente ramificati e terminano in sacche a fondo cieco che costituiscono gli acini ghiandolari. I tubuli digerenti sono formati da cellule cigliate, ritrovabili anche nell'esofago e nel resto dello stomaco, e da cellule caratterizzate da vacuoli ricchi di pigmenti e lipidi. È probabile che i tubuli adempiano sia alla digestione extracellulare che intracellulare. Lo stomaco presenta un lungo diverticolo detto sacco dello stilo, contenete lo stilo del cristallino: fusto trasparente che appoggia su di un duro scudo gastrico. Lo stilo, grazie alla presenza di ciglia vibranti, compie rapidi movimenti rotatori (fino ad 80 rpm) che agiscono contro il rivestimento sclerificato della parte superiore dello stomaco, permettendogli di sbriciolare anche le più grosse particelle ingerite, che ora possono essere digerite dalle cellule della ghiandola digestiva. Lo stilo appare traslucido o giallognolo e di dimensioni notevoli, se paragonato alle dimensioni effettive del resto delle viscere. È costituito da strati concentrici di mucoproteine secrete dalle pareti ghiandolari del tiflosolio (fondo della sacca). L'intestino dei Bivalvi è relativamente lungo ed eventualmente ripiegato su se stesso. Esso si apre sotto il muscolo adduttore posteriore e presenta anch'esso cellule cigliate che ne garantiscono il flusso interno. Nel suo percorso, l'intestino, passa

attraverso il pericardio e spesso attraverso il ventricolo del cuore, terminando infine nell'ano. Le feci, contenenti residui di digestione intracellulare e particelle non totalmente digerite, sono relativamente compatte e sedimentano facilmente in acqua.

L'apparato escretore dei Bivalvi presenta due nefridi (o reni) a entrambi i lati del cuore, nei quali avviene la filtrazione ed il cui filtrato si riversa nella cavità del mantello e quindi all'esterno. Viene espulsa principalmente ammoniaca, ossido di trimetilammina e urea. In condizioni di disequilibrio osmotico, l'interscambio osmotico viene gravemente alterato e ciò causa gravi ripercussioni fisiologiche, eventualmente anche il decesso dell'animale in tempi brevi. La concentrazione ionica nei bivalvi si adatta a quella esterna (organismi osmoconformi), perciò al variare della salinità esterna varia anche quella interna, causando variazioni di volume del corpo del bivalve.

## **1.2 RIPRODUZIONE E SVILUPPO LARVALE**

Ad eccezione di occasionale ermafroditismo, i sessi nel mitilo sono separati e non sono presenti segni esterni di dimorfismo sessuale. La riproduzione avviene per emissione di sperma e uova all'esterno, dove avviene la fecondazione (fecondazione esterna). La maturazione avviene nel primo anno di vita (solitamente 6 – 7 mesi), ma la taglia di maturità varia considerevolmente in base al tasso di crescita. Sede della gametogenesi è il mantello, strutturato in due lobi di tessuto connettivo entro il quale troviamo molti vasi emolinfatici, fibre muscolari e fibre nervose. Al suo interno delimita la cavità palleale, mentre all'esterno prende contatto con le valve lungo una linea chiamata linea palleale. L'apparato riproduttivo consiste di numerosi dotti che ramificano attraverso gran parte del corpo, ognuno terminante in un follicolo genitale. I gonodotti, accoppiati due a due, si immettono in papille situate anteriormente al muscolo adduttore posteriore, fra il mesosoma e le lamelle interne branchiali. I gonodotti portano a cinque canali principali caratterizzati da pareti attorcigliate con bordi cigliati. A loro volta questi portano ad una serie di canali minori dotati di epitelio colonnare cigliato. L'oogenesi e la spermatogenesi hanno luogo nell'epitelio germinale follicolare. L'oocita è inizialmente connesso all'epitelio da un gambo che si assottiglia gradualmente fino alla rottura, dopo la quale l'uovo maturo viene liberato nel follicolo. La spermatogenesi passa invece attraverso tre stadi: spermatozoi, spermatozoidi e spermatozoi. Una volta raggiunta la maturità, gli spermatozoi vengono convogliati presso il centro dei follicoli formando dense lamelle (Bayne, 1976). Al raggiungimento della completa maturazione delle gonadi, il mantello appare trasparente, permettendoci di osservare le gonadi, solitamente rosate negli esemplari femminili e bianco-giallastre negli esemplari maschili.

Dal punto di vista istologico è possibile distinguere quattro fasi nel ciclo riproduttivo: riposo, sviluppo gonadico, maturità gonadica, rilascio. Le fasi di sviluppo e di rilascio possono essere ulteriormente suddivise in quattro sottofasi ciascuna. Sono quindi presenti un totale di dieci stadi, di seguito brevemente riassunti.

(a) Fase di riposo:

Stadio 0: In questo stadio rientrano sia organismi vergini che organismi maturi al termine della fase di rilascio dei gameti.

(b) Fase di sviluppo gonadico:

Stadio 1: Inizio della gametogenesi, non sono ancora presenti gameti maturi.

Stadio 2: Appaiono i primi gameti maturi. Le gonadi durante questo stadio raggiungono un terzo del loro volume finale.

Stadio 3: In questo stadio avviene un aumento volumetrico delle gonadi fino a metà del volume finale. In ogni follicolo troviamo circa la stessa proporzione di gameti maturi ed in sviluppo.

Stadio 4: Le gonadi raggiungono i due terzi del volume finale e all'interno dei follicoli troviamo principalmente gameti maturi.

(c) Fase di maturità gonadica:

Stadio 5: Completa maturità. Le fasi iniziali della gametogenesi sono ridotte al minimo o assenti. Le uova risultano compattate in configurazioni poligonali, mentre le gonadi maschili sono distese con sperma morfologicamente maturo. È importante precisare che la maturità morfologica può non coincidere con la maturità fisiologica e il tempo necessario fra l'uno e l'altro è molto variabile, finanche a mesi.

(d) Fase di rilascio:

Stadio 6: Inizio dell'emissione. È caratterizzato da un calo di densità di sperma e variazione morfologica delle uova, dalla forma poligonale a rotonda, causata dalla riduzione della pressione nei follicoli.

Stadio 7: Le gonadi risultano circa metà del volume alla maturità.

Stadio 8: I follicoli contengono circa un terzo dei gameti presenti ad inizio rilascio. L'area occupata dalle gonadi si riduce drasticamente.

Stadio 9: Sono presenti solo gameti residui, spesso soggetti a citolisi da parte degli amebociti.

A seguito dell'emissione dei gameti, avviene la fecondazione in ambiente acquatico. L'uovo fecondato passa attraverso due stadi larvali prima di fissarsi su di un substrato. Gli stadi larvali

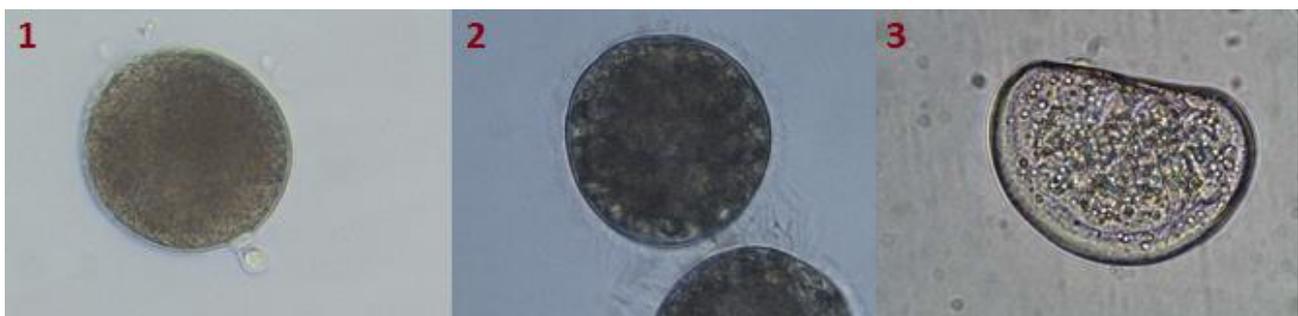
occupano un lasso di tempo variabile in base al tasso di crescita, a sua volta correlato a fattori ambientali, primo fra tutti la temperatura. È stata infatti riscontrata, per la specie *Mytilus galloprovincialis*, una variazione significativa nella velocità di sviluppo larvale e metamorfosi a seguito del raffreddamento dell'acqua di pochi gradi, evidenziando migliori performance a temperature comprese tra 20 e 24 °C (Lazo et al., 2012).

Lo sviluppo embrionale dei molluschi è generalmente di tipo indiretto perché l'embrione, prima di assumere un aspetto simile a quello definitivo della specie di mollusco cui appartiene, deve prima passare attraverso una fase larvale intermedia e successivamente trasformarsi nell'adulto mediante metamorfosi; pertanto lo sviluppo embrionale non si svolge tutto all'interno della struttura che deriva dall'ovocita fecondato, ma si completa solo grazie ad una fase larvale. Il processo biologico dello sviluppo embrionale dei molluschi può essere suddiviso in tre fasi successive: la segmentazione dello zigote, la gastrulazione della blastula e la morfogenesi. Nei molluschi la segmentazione consiste in una sequenza di mitosi dello zigote che portano inizialmente alla sua divisione in vari blastomeri totipotenti (ovvero in grado di produrre singolarmente tutto il necessario allo sviluppo embrionale) e, in seguito, alla formazione dello stadio di blastula, caratterizzato da forma sferica e cava, il cui contorno è delimitato dai suddetti blastomeri. La segmentazione nei molluschi è meroblastica poiché gli ovociti di questi animali sono in genere abbastanza ricchi di sostanza di riserva e, conseguentemente, lo zigote può dividersi in blastomeri solo parzialmente, sfruttando le zone in cui non è presente il deutoplasma. Oltre che meroblastica, la segmentazione è anche detta spirale. Nella segmentazione spirale, a causa della presenza del deutoplasma, i piani di segmentazione dei blastomeri sono disposti in senso obliquo rispetto all'asse principale dello zigote, per cui tendono a sovrapporsi parzialmente e a distribuirsi nella blastula con un andamento detto "spiralato".

Alla segmentazione fa seguito la gastrulazione, mediante la quale ha luogo una serie di spostamenti dei blastomeri finalizzati alla formazione dello stadio embrionale detto gastrula, al cui livello la totipotenza iniziale dei primi blastomeri dello zigote va via via riducendosi, lasciando il posto a tre strati di cellule con funzionalità più specifiche. Durante questa fase, la calotta di cellule del blastoderma che contiene più sostanze di riserva tende a introflettersi nel blastocele, mentre i restanti blastomeri vanno a scorrere al di sopra delle cellule invaginate. Il risultato di questi movimenti è una struttura sacciforme, le cui pareti sono formate da due strati contigui di cellule e delimitano una cavità interna chiamata archenteron (rappresentante l'intestino primitivo), che comunica con l'esterno tramite una sorta di forame chiamato blastoporo. Lo strato di cellule interne della gastrula che si trova a contatto con l'archenteron rappresenta l'endoderma, mentre quello

posizionato esternamente rappresenta l'ectoderma. Mediante ulteriori spostamenti dei blastomeri, tra i due strati sopraccitati se ne viene a definire un terzo, detto mesoderma. Perciò a fine gastrulazione l'embrione dei molluschi risulta triblastico, essendo costituito da tre strati cellulari contigui che, dall'esterno verso l'interno, sono rispettivamente ectoderma, mesoderma ed endoderma.

La morfogenesi è un processo biologico che, a partire dalla gastrula, porta al differenziamento dei tessuti (istogenesi) e quindi degli organi (organogenesi) embrionali che, maturando, diverranno tessuti e organi dell'adulto. Nei Molluschi le modalità con cui si realizza la morfogenesi variano in base a caratteri evolutivi ed ecologici. Fatta eccezione per Cefalopodi e Gasteropodi, tutti i molluschi necessitano di completare il loro sviluppo embrionale attraverso una o più fasi larvali planctoniche prima di poter assumere, tramite metamorfosi, l'aspetto dell'organismo adulto. A seguito della morfogenesi sono riconoscibili diversi cambiamenti: l'ectoderma si differenzia in epidermide, costituendo anche eventuali scaglie e piastre cutanee, in mantello, in conchiglia (se presente), in tessuto nervoso ed in organi sensoriali. Dal mesoderma derivano muscolatura, sistema circolatorio, apparato respiratorio, gonadi e apparato escretore; inoltre all'interno del mesoderma, per schizocelia, si genera il celoma. Dall'endoderma derivano l'apparato digerente e le ghiandole digestive connesse. Dal blastoporo dell'archenteron (nei protostomi) si forma la bocca, mentre l'ano si apre in posizione opposta, alla terminazione del tratto intestinale. Le fasi larvali planctoniche più tipiche di questi animali sono la trocofora e il veliger, che si formano dall'embrione in avanzata morfogenesi. Generalmente la morfogenesi si completa durante lo sviluppo larvale, eventualmente dopo la metamorfosi, che ha luogo in seguito al fissaggio della larva su di un substrato.



**Figura 1 – Stadi larvali del mitilo *M.galloprovincialis*.** (1) Oocita fecondato con evidente globulo polare. (2) Stadio di trocofora, sono evidenti le cilia vibranti. (3) Stadio di veliger, riconoscibile dalla caratteristica forma a D per la quale viene anche chiamato D-veliger.

La trocofora è una larva caratteristica delle specie più primitive, più vicine agli Anellidi, con i quali, derivando da un antenato comune di probabile appartenenza ai Platelmini, i Molluschi hanno molta affinità embriologica. Quando completamente sviluppata, la trocofora ha l'aspetto di una piccola trottola, caratterizzata da un ciuffo di cilia sensorie posizionate sull'estremità apicale; queste cilia

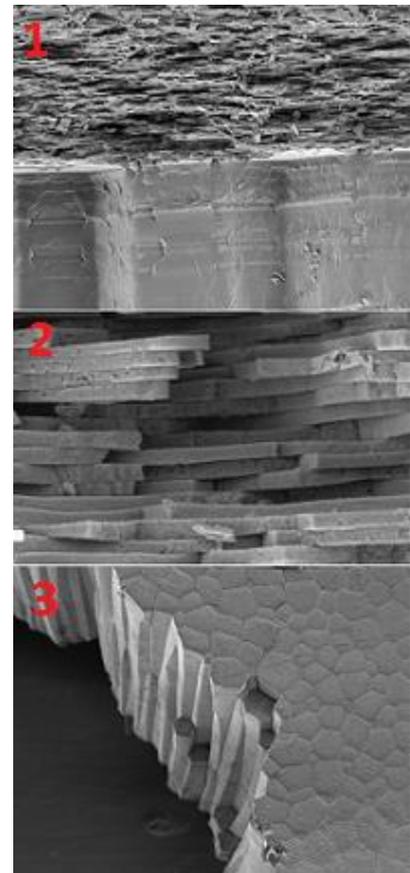
sensorie sono connesse al ganglio cerebrale del rudimentale sistema nervoso, che reagisce più o meno efficacemente agli stimoli tattili e chimico-fisici provenienti dall'ambiente. La trocofora si nutre di particelle organiche e componenti del plancton, che convoglia alla bocca mediante l'attività di una cintura mediana di cellule ciliate, il cui battito, oltre a svolgere la funzione trofica, permette alla larva di muoversi attivamente nel mezzo. Alla bocca segue poi un rudimentale intestino, che si apre con l'ano presso l'estremità opposta. Quando in fase di trocofora, il mollusco non presenta ancora né piede, né conchiglia, né sistema circolatorio; tutti gli scambi gassosi necessari alla respirazione avvengono esclusivamente a livello cutaneo, mentre l'escrezione dei cataboliti metabolici è affidata ai proto-nefridi. Tutti gli organi e gli apparati del mollusco adulto, ad ora mancanti o non interamente sviluppati, verranno ultimati nel periodo giovanile successivo alla metamorfosi.

Il veliger è la larva caratteristica dei molluschi a sviluppo embrionale indiretto più evoluti, dei quali fanno parte anche i Lamellibranchi. Possiamo osservare due vie di sviluppo diverse: in taluni organismi dall'embrione si forma direttamente il veliger, in altri (fra cui i mitili) dall'embrione si forma dapprima la trocofora e successivamente, dopo un breve lasso di tempo, il veliger. Quest'ultima è una larva ben più complessa della trocofora, in quanto alla sua maturità possiamo già osservare un rudimentale piede, una piccola conchiglia o protoconca (secretata dalla ghiandola della conchiglia) e gli abbozzi di numerosi organi e apparati tipici del mollusco adulto. Alla comparsa degli occhi e dei tentacoli, il veliger è pronto a scendere sul fondo, dove, a seguito della metamorfosi, passerà alla fase giovanile; quindi si accrescerà sino al raggiungimento della fase adulta. Il nome di veliger viene attribuito a questa larva a causa dei due grandi lobi ciliati che si estendono dalla zona mediana e, nel loro complesso, ricordano la forma di un velo. Tali lobi hanno sia funzione natatoria che alimentare, in quanto con il battito spostano l'acqua per ottenere propulsione e convogliare alla bocca le particelle organiche in sospensione ed il plancton. Con la fase di morfogenesi termina lo sviluppo embrionale che porta alla formazione di un giovane mollusco del tutto simile all'adulto, anche se di dimensioni ridotte, dovendosi ancora accrescere con tempi e modalità che variano a seconda della specie di appartenenza.

### **1.3 BIOMINERALIZZAZIONE**

Il termine biomineralizzazione si riferisce al dinamico processo fisiologico attraverso il quale un organismo vivente elabora una struttura mineralizzata. Il guscio di molluschi, o conchiglia, è un composto organo-minerale nel quale il minerale dominante, solitamente aragonite o calcite, è

intimamente associato a una matrice organica, che rappresenta solo lo 0,1-5% in peso del guscio. Questa matrice rappresenta una amalgama di proteine, glicoproteine, chitina e polisaccaridi acidi, secreta dai tessuti calcificanti durante la scheletogenesi. Il primo passo nella formazione della conchiglia avviene allo stadio di trocofora. La conchiglia, di origine ectodermica, è prodotta da un gruppo di cellule localizzate sul lato posteriore della larva. Queste cellule definiscono la zona della conchiglia. La zona della conchiglia si differenzia, alla fine della gastrulazione, dall'ispessimento della porzione mediana dell'ectoderma nella regione post-trocale dorsale. Le cellule di questa zona subiscono un'invaginazione, e producono la ghiandola transitoria della conchiglia (Kniprath, 1981). Questa invaginazione è un passo fondamentale al fine di permettere alle cellule situate alla periferia della ghiandola la formazione di una membrana organica precoce, la quale rappresenterà il primo substrato in cui può avvenire la deposizione del carbonato di calcio (Kniprath, 1977, 1980). In seguito la ghiandola si amplia tramite divisione mitotica e poco alla volta diverrà l'epitelio del mantello larvale. La membrana organica, che rappresenta il periostraco precoce, si espande. Fra il nuovo periostraco e le cellule della zona della conchiglia avviene infine la prima deposizione del carbonato di calcio. Nei bivalvi, dei quali il mitilo è uno dei principali esponenti, la prima conchiglia secreta in questo stadio è detta prodissoconca I, ed è caratterizzata da un aspetto granuloso. Durante il passaggio da trocofora a veliger viene secreta la conchiglia prodissoconca II e questo passaggio comporta un cambiamento notevole nel regime secretorio. Lo stadio finale della conchiglia è però raggiunto solo nella fase post-metamorfica, dove la conchiglia, ormai ben formata, ha aspetto identico allo stadio adulto e viene detta teleoconca (Mao Che et al., 2001). Una volta che la metamorfosi del veliger è avvenuta, la conchiglia dell'individuo giovanile calcifica rapidamente e la sua crescita segue approssimativamente la legge di Von Bertalanffy durante l'intera vita dell'animale (Seed, 1980). La conchiglia è composta da 3 strati distinti: uno strato esterno non calcificato e di origine proteica definito periostraco, uno strato intermedio prismatico, calcificato, strutturato da una matrice proteica, ed uno nacreo interno anch'esso composto da una frazione organica (proteica) e da una inorganica (carbonato di calcio).



**Figura 2 - In figura sono mostrate le differenze strutturali presenti fra strato nacreo e prismatico. (1) gli strati nacreo (sopra) e prismatico (sotto) sono organizzati in modo totalmente differente. (2) In immagine è rappresentato il tessuto nacreo *in cross-section*. (3) Visione superficiale dello strato prismatico.**

Lo strato prismatico segue un modello di formazione che, almeno nelle prime fasi, è dato dalla competizione chimica per lo spazio, nella quale si hanno inizialmente punti di nucleazione, distribuiti uniformemente su una superficie, dai quali si origina una crescita concentrica. Quando avviene contatto fra due o più punti di nucleazione in crescita (sferuliti) viene forzata una unidirezionalità di accrescimento perpendicolare alla superficie. Questo fenomeno è frequente in natura e non necessita di particolari e sofisticate strutture organiche. Resta comunque molto dubbia l'affidabilità di questo modello incompleto. A differenza dello strato prismatico, dove il carbonato di calcio è strutturato in prismi a blocchi, lo strato nacreo presenta una struttura a più foglietti, composti da tavolette ed intervallati da interlamelle. Nel tempo sono stati elaborati diversi modelli per il tessuto nacreo; il più recente ed aggiornato di questi è stato formulato da Addadi et al. (2006) ed è una rielaborazione del precedente modello di Levi-Kalishman et al. (2001). Il modello Addadi prevede una successione di quattro stadi di formazione: (1) assemblaggio della matrice, operato inizialmente dalla  $\beta$ -chitina organizzando l'orientamento dei cristalli, quindi dal "silk gel" che permette la nucleazione dei cristalli; (2) formazione del primo minerale, sotto forma di carbonato di calcio amorfo (ACC); (3) nucleazione delle tavolette di aragonite attraverso polimeri polianionici; (4) crescita dei cristalli, prima in spessore, fino al raggiungimento dell'interlamella superiore, poi lateralmente (Marin et al., 2008). Negli organismi calcificanti adulti, il carbonato di calcio è principalmente presente come aragonite, in rari casi come calcite o ACC. Nel mitilo, il primo minerale che viene formato è ACC, ma la sua abbondanza cala drasticamente solo 40 ore dopo la fertilizzazione, a favore dell'aragonite (Medakovic, 2000). I foglietti di aragonite e le stesse tavolette che li compongono sono tenuti assieme, come già detto, da interlamelle, composte da una sostanza organica complessa chiamata conchiolina, formata da polisaccaridi e fibre proteiche. La conchiglia dei molluschi si forma dal mantello che, presso i suoi bordi, ne secerne i costituenti fondamentali. La parte organica è data in gran parte da polisaccaridi e glicoproteine ma la sua composizione può variare molto. La componente organica svolge il ruolo di controllo nella formazione dei cristalli di carbonato di calcio, controllando finemente come e quando questi si sviluppino ed a quale tasso si accrescano (Marin et Luquet, 2004). Alcune proteine permettono inoltre il controllo della deposizione di cristalli polimorfi e se necessario possono provocare l'interruzione e la ripresa del loro accrescimento. La componente inorganica della conchiglia è depositata entro lo spazio extrapalliale, separato dall'ambiente esterno dal periostraco; in questa zona avviene l'accrescimento. Lo spazio extrapalliale risulta quindi connesso sia al mantello che alla porzione di conchiglia eventualmente già in parte formata. Durante la formazione della conchiglia, il mantello e il periostraco sigillano il compartimento interno (cavità extrapalliale), permettendo l'accumulo degli ioni in concentrazione sufficientemente alta da permetterne la

cristallizzazione. L'accumulo di ioni è garantito dall'azione di pompe situate nell'epitelio calcificante che permettono il passaggio del calcio conservato all'interno o all'esterno delle cellule sotto forma di granuli, pronti ad essere dissolti e utilizzati (Marin et Luquet, 2004). Il calcio giunge all'epitelio calcificante trasportato dall'emolinfa, che lo ottiene a sua volta da branchie e intestino. Data l'elevata concentrazione di ioni si potrebbe pensare che la presenza della matrice organica non faciliti la cristallizzazione, ma non è così, in quanto è proprio questa matrice a favorirne la formazione agendo come punto di nucleazione e controllandoli finemente fino al raggiungimento di dimensione e forma ideali (Marin et Luquet, 2004). La formazione della conchiglia coinvolge numerosi geni e fattori di trascrizione. In generale, i fattori di trascrizione ed i geni segnale appaiono molto conservati nei molluschi, ma non si può dire lo stesso per le proteine del secretoma, che sono invece soggette ad elevata variabilità. In questo studio l'attenzione è stata rivolta a due elementi chiave della biomineralizzazione: l'enzima anidrasi(CA) carbonica e la proteina extrapalliale(EP).

L'anidrasi carbonica (CA) è un enzima il cui compito è quello di catalizzare la reazione tra  $H_2O$  e  $CO_2$  per produrre  $H_2CO_3$  e la reazione inversa con la quale l'acido carbonico è scisso in acqua ed anidride carbonica, secondo la reazione chimica  $H_2O + CO_2 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ . La direzionalità della reazione dipende dalla concentrazione di anidride carbonica, al cui aumento corrisponde uno spostamento della reazione verso la formazione di acido carbonico il quale, essendo un acido relativamente forte ( $pka \sim 3.5$ ), si dissocia in ione bicarbonato ed idrogeno. L'attività di questo metalloenzima nei molluschi è stata studiata da molti autori (Wilbur e Anderson 1950; Kawai 1955; Freeman 1960; Nielsen e Frieden 1972; Wilbur e Saleuddin 1983; Erlichman et al. 1994; Miyamoto et al. 1996), ma sono pochi gli studi relativi a questo enzima in ambito embrionale. Tali studi hanno mostrato come CA presenti picchi di attività in corrispondenza delle fasi finali degli stadi larvali correlati alla biomineralizzazione nel mitilo comune (*M.edulis*). Più precisamente l'attività risulta bassa nelle uova non fertilizzate ma 5 ore dopo la fertilizzazione, quando è formato il somatoblasto 2d, si denota il primo picco dell'enzima (Medakovic, 2000). Secondo Verdonk e Cather (1983) il somatoblasto 2d ed in rari casi il 2c sono le uniche cellule embrionali responsabili dello sviluppo della conchiglia. L'enzima raggiunge il suo minimo dopo la formazione del somatoblasto 2d per poi aumentare nuovamente nel tardo stadio di gastrula, quando si ha la formazione della ghiandola della conchiglia; inoltre l'attività dell'enzima si incrementa ulteriormente nel periodo subito seguente, che segna il passaggio da gastrula a trocofora, durante il quale si ha la formazione del campo della conchiglia. Gli ultimi picchi di attività dell'enzima nel mitilo *M.edulis* compaiono 55 e 72 ore dopo la fertilizzazione e corrispondono rispettivamente alla completa formazione delle conchiglie prodissoconca I e prodissoconca II. Considerando quanto detto e quanto è noto in bibliografia, si

ipotizza che, durante i primi stadi nel mitilo *M.edulis*, una elevata attività di CA preceda cambiamenti fisiologici e processi chiave nella biomineralizzazione (Wilbur e Jodrey 1955; Freeman 1960; Medakovic e Lucu 1994; Medakovic 1995). Considerando che già da tempo è nota l'elevata similarità fisiologica fra *M.edulis* e *M.galloprovincialis*, è fortemente presa in considerazione la possibilità che l'anidraasi carbonica giochi un ruolo chiave anche nello sviluppo di quest'ultima specie.

Di recente identificazione è una proteina situata nel fluido extrapalliale, scoperta e caratterizzata nel mitilo *M.edulis*: la proteina extrapalliale (EP). Essa sembra contribuire allo sviluppo della conchiglia garantendo la formazione e l'organizzazione dei cristalli di carbonato di calcio e la loro crescita (Hattan et al., 2001). Questa nuova glicoproteina rappresenta più del 50% delle proteine totali del fluido extrapalliale e si presenta come un dimero costituito da monomeri di 28,340 Da, il cui 14,3% circa del peso è rappresentato da carboidrati. EP è una proteina acidica (pI =4.43) e presenta all'estremità N-terminale una insolita ripetizione di sequenze di residui di istidina ed aspartato che si presentano in coppie: NPVDDHHDDHHDAPIVEHHD~. Questa proteina lega il calcio e facendo ciò si assembla in una serie di protomeri di ordine maggiore. Il suo legame con il calcio sembra essere legato ad un significativo riarrangiamento della struttura secondaria portando ad una riduzione in foglietti  $\beta$  e ad un incremento in  $\alpha$ -eliche (Hattan et al., 2001).

#### **1.4 PROTEIN CHINASI A**

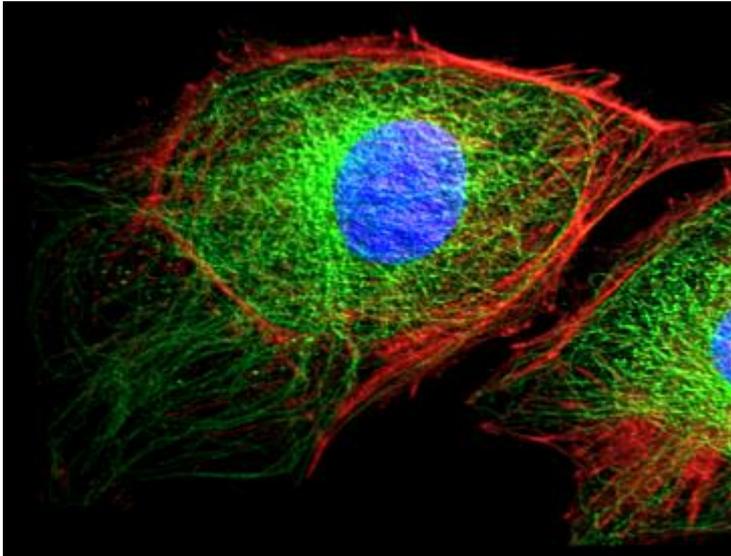
La proteina chinasi cAMP-dipendente (Protein chinasi A, PKA) è il principale mediatore degli effetti del cAMP negli eucarioti (Taylor et al., 1990; Taylor et al., 2004). L'oloenzima è costituito da un dimero di subunità regolatrici (R) e da due subunità catalitiche monomeriche (C). In assenza di cAMP l'enzima rimane inattivo poiché le subunità regolatrici occupano il sito attivo delle subunità catalitiche, impedendo il legame di proteine substrato. L'aumento dei livelli di cAMP all'interno della cellula in risposta ad una segnalazione extracellulare provoca la dissociazione dell'enzima. Le subunità catalitiche libere possono ora fosforilare diverse proteine bersaglio sia nel citoplasma che nel nucleo. Le proprietà biochimiche e il ruolo della PKA sono poco studiati negli organismi non mammiferi. Nel mitilo *Mytilus galloprovincialis* gli oloenzimi contenenti come subunità regolatrici due isoforme chiamate  $R_{myt1}$  e  $R_{myt2}$ , sono stati nominati  $PKA_{myt1}$  e  $PKA_{myt2}$  (Cao et al., 1995; Cao et al., 1996; Barcia et al., 1998; Díaz-Enrich et al., 2003). Le proprietà biochimiche di  $R_{myt1}$  e  $R_{myt2}$  sono rispettivamente simili alle subunità R di tipo I e II di mammifero. Sia cAMP che cGMP possono attivare le due isoforme di PKA, anche se queste mostrano una

affinità circa 100 volte maggiore con il cAMP piuttosto che con il cGMP. Per entrambi i messaggeri è stato notato che, l'affinità di PKA<sub>myt1</sub>, rispetto a quella di PKA<sub>myt2</sub>, è 2 volte superiore con il cAMP e 3.5 volte con il cGMP (Bardales et al., 2004).

## 1.5 RECETTORI DELLA SEROTONINA

La serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) è un neurotrasmettitore sintetizzato dai neuroni serotoninergici del sistema nervoso centrale e dalle cellule enterocromaffini dell'apparato intestinale. Questa molecola è estremamente importante in quanto è responsabile della regolazione di una vasta gamma di funzioni fra le quali vi sono anche il metabolismo, la riproduzione e lo sviluppo larvale. La serotonina può agire direttamente, per serotonilazione su proteine, o indirettamente attraverso cascate di eventi originate dal suo accoppiamento a recettori serotoninergici (recettori 5-HT). I recettori serotoninergici noti sono numerosi e vengono raggruppati in sette famiglie (5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub>) ed in molti casi persino in sottofamiglie. Ad eccezione dei recettori 5-HT<sub>3</sub>, che sono recettori ionotropici (LGICs), tutte le altre famiglie rappresentano recettori accoppiati a proteine G (GPCRs). La maggior parte degli studi al riguardo sono rivolti a mammiferi e poco si sa sugli invertebrati; in particolare solo alcuni recettori serotoninergici sono stati identificati nei molluschi (Tierney, 2001). Di particolare interesse per questo studio è il recettore 5-HT<sub>1</sub> che, a seguito del legame con la serotonina, causa l'inibizione dell'attività dell'enzima adenilato ciclasi (AC) con conseguente inibizione della produzione di cAMP. Il cAMP esplica la funzione di trasduttore di segnale intracellulare, ovvero svolge il ruolo di tramite fra i recettori cellulari, quindi segnali extracellulari, e numerose funzioni cellulari. Il cAMP e gli enzimi chinasi ad esso associati regolano numerosi processi fra cui il metabolismo di lipidi e glicogeno. Negli eucarioti l'associazione di questo messaggero con l'oloenzima protein chinasi A (PKA) causa la dissociazione delle due subunità regolatorie (R) dalle subunità catalitiche, con conseguente attivazione dell'enzima. Vi è quindi una stretta correlazione fra attivazione del recettore serotoninergico 5-HT<sub>1</sub> e PKA: in particolare, l'accoppiamento ligando-recettore attiverà la proteina Gi, determinando l'inibizione dell'adenilato ciclasi e la riduzione della sintesi di cAMP, comportando un calo di attività della PKA poiché quest'ultima non verrà attivata.

## 1.6 PROTEINE STRUTTURALI



**Figura 3 - Immagine raffigurante due cellule visualizzate tramite microscopia a fluorescenza.** Sono messi in evidenza il nucleo (blu), i microtubuli (verde) ed i microfilamenti (rosso).

Le proteine strutturali svolgono un ruolo essenziale; il loro compito è quello di conferire rigidità alle componenti biologiche che altrimenti sarebbero fluide. Nelle cellule eucariotiche la funzione di queste proteine è evidente con la formazione del citoscheletro. Il citoscheletro è una struttura formata da una estesa rete tridimensionale di microtubuli, microfilamenti e filamenti intermedi che danno forma alla cellula e le permettono eventuali movimenti. I microtubuli sono tubi cavi le cui pareti sono formate da eterodimeri di tubulina

$\alpha$  e  $\beta$  polimerizzati in protofilamenti lineari. I microtubuli sono polari e si allungano ad una estremità, detta estremità positiva. La loro formazione è soggetta al fenomeno della instabilità dinamica, ovvero presenta cicli di allungamento e accorciamento. Queste strutture si organizzano a partire dai centri di organizzazione dei microtubuli (MTOCs), fra i quali il centrosoma è uno dei più importanti e contiene siti di nucleazione ricchi di tubulina  $\gamma$  essenziali per la crescita dei microtubuli. Oltre a dipendere dagli MTOCs, i microtubuli sono anche sotto controllo da parte delle proteine associate ai microtubuli (MAPs), che ne possono modulare la struttura, l'assemblaggio e la funzione. I microfilamenti sono invece polimeri a doppia catena di actina e sono richiesti in molti processi cellulari, tra cui la locomozione e il mantenimento della forma cellulare. Anche i microfilamenti sono strutture polari nelle quali i monomeri di actina sono aggiunti ad una estremità preferenziale, mentre all'altra estremità vengono rimossi. L'assemblamento dei monomeri avviene grazie a proteine G, conosciute come polifosfoinositidi o proteine cappuccio (Cdc42, Rho e Rac). Ulteriori proteine contribuiscono ad unire i filamenti, a tagliarli ed ancorarli, regolando di conseguenza la struttura dei microfilamenti internamente alle cellule. Il terzo tipo di filamenti è rappresentato dai filamenti intermedi, il cui ruolo sembra essere prettamente strutturale poiché agisce regolando la distribuzione della tensione cellulare. Microtubuli, microfilamenti e filamenti intermedi si interconnettono nella cellula per formare una struttura capace di tollerare la tensione e la compressione, fornendo resistenza meccanica e rigidità (Becker, Kleinsmith, Hardin, 2006).

L'Actina è fra le proteine più abbondanti e meglio conservate negli eucarioti. Essa partecipa più di ogni altra proteina alle interazioni proteina-proteina e le sue proprietà, assieme alla sua capacità di transizione fra stato monomero (actina G) e filamentoso (actina F), fanno di questa proteina un elemento critico per molte funzioni cellulari, dalla mobilità e del mantenimento della forma cellulare alla regolazione della trascrizione (Dominguez e Holmes, 2011). Nei vertebrati sono espresse numerose isoforme di actina, incluse tre isoforme  $\alpha$  dei muscoli scheletrico, liscio e cardiaco, e le isoforme  $\beta$  e  $\gamma$  espresse anche in cellule non muscolari. Le varie isoforme differiscono per pochi aminoacidi, principalmente in direzione N-terminale. L'actina va anche incontro a varie modificazioni post-traduzionali, ad esempio His73 della  $\alpha$ -actina scheletrica viene metilata, i residui N-terminali di Met e Cys acetilati e divisi, infine l'acido aspartico risultante, nuovamente acilato. La struttura dell'actina prevede una catena di 375 aminoacidi (aa) ripiegata in due grandi domini  $\alpha/\beta$ . A causa della loro localizzazione entro il filamento, questi domini sono anche conosciuti come dominio esterno ed interno o, a causa della apparente differenza di grandezza in microscopia elettronica, domini piccolo e grande. Tradizionalmente viene però considerata come proteina a quattro sottodomini, dove i domini 1 e 3 sono strutturalmente correlati e probabilmente derivano da duplicazione genica, mentre i sottodomini 2 e 4 sono considerabili come ampie inserzioni nei sottodomini 1 e 3 rispettivamente (Dominguez e Holmes, 2011). Come già accennato, uno dei compiti svolti da questa proteina è la formazione di microfilamenti necessari allo sviluppo della cellula ed al conseguimento della corretta forma/struttura adeguata alla funzione di questa. L'assemblaggio dei microfilamenti prevede una fase iniziale di nucleazione lenta ed una di rapido accrescimento. I filamenti di actina F che si formano sono dati da due catene parallele lineari di actina G polimerizzata, avvolte una all'altra ad elica. Nel microfilamento tutti i monomeri si orientano nella stessa direzione causando la polarità dell'intera struttura del microfilamento. Troveremo quindi una estremità che differisce sia chimicamente che strutturalmente dall'altra e ciò comporta un aumento nella cinetica di formazione e rimozione di actina al polo positivo. Ne consegue che, anche in condizioni favorevoli per l'accrescimento di entrambi i lati, il polo positivo si accresce più rapidamente. Mano a mano che l'actina G viene polimerizzata nei microfilamenti, l'ATP ad essa legato è idrolizzato ad ADP, dunque le estremità di ogni microfilamento presentano actina F-ATP mentre al suo interno è presente actina F-ADP. Tuttavia non è necessaria l'idrolisi di ATP per l'assemblaggio del microfilamento; è stato dimostrato infatti che questi si formano anche partendo da actina G-ADP o da analoghi non idrolizzabili dell'ATP (Becker, Kleinsmith, Hardin, 2006). All'interno della cellula l'actina G libera è scarsa e non disponibile alla polimerizzazione. Il principale stock di actina si trova legato alla proteina timosina  $\beta 4$ . Questa actina viene resa disponibile alla polimerizzazione grazie all'azione della profilina, proteina capace di trasferire i

monomeri di actina G dalla timosina  $\beta 4$  all'estremità dei filamenti in accrescimento. All'estremità negativa del filamento, una proteina chiamata ADF/cofilina, incrementa la velocità di turnover dell'actina-ADP facilitandone la rimozione e rendendo quindi disponibile actina G-ADP alla conversione in actina G-ATP la quale viene subito riutilizzata all'estremità positiva. Sembra essere presente quindi un efficiente meccanismo di riciclo di actina fra le due estremità. In linea teorica il processo di allungamento dei microfilamenti potrebbe essere continuo, ma non lo è. A regolare il blocco dell'allungamento è una proteina cappuccio (CapZ) che, legandosi all'estremità di un filamento, inibisce l'aggiunta e la rimozione di subunità, stabilizzando l'intera struttura. La proliferazione dei filamenti è anche sotto il controllo diretto o indiretto di altri fattori, fra questi i più noti sono il fosfatidil-inositolo-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), che lega e regola le proteine profilina e CapZ, il complesso Arp2/3, che contribuisce alla ramificazione mediante la nucleazione di nuovi rami laterali sui filamenti preesistenti, e le proteine G Rac, Rho e Cdc42, che sono modulatori fondamentali della polimerizzazione dell'actina all'interno delle cellule. Ciascuna di queste molecole ha effetti profondi e diversi sul citoscheletro di actina (Becker et al., 2006). Per ciò che concerne gli organismi marini, molti studi sono focalizzati sul riccio di mare *Strongylocentrotus purpuratus*, del quale è stata caratterizzata l'espressione genica di cinque geni relativi all'actina: quattro geni relativi al citoscheletro (CyI, CyIIa, CyIIb e CyIIIa) ed uno relativo al muscolo (gene actina M). Durante lo sviluppo embrionale e larvale di questa specie sono presenti differenti patterns di espressione per questi geni. I trascritti del gene actina M compaiono esclusivamente nel tardo sviluppo (Cox et al., 1986), in particolare dopo la gastrulazione, quando si formano le iniziali cellule progenitrici del muscolo (Lee et al., 1986). Nelle uova non fertilizzate il contenuto in mRNA di actina è basso, ma, in determinati periodi di sviluppo, i geni delle actine citoscheletriche sono individualmente espressi ed i trascritti accumulati rapidamente. Nel più tardo periodo di sviluppo, ognuno dei geni sembra essere espresso in modo più costante (Lee et al., 1986; Cox et al., 1986). Studi sui livelli di espressione di geni codificanti per actina durante lo sviluppo della specie *M. galloprovincialis* non sembrano ad oggi essere presenti, ma l'importanza di questa proteina in una specie dalla peculiare capacità adattativa come il mitilo mediterraneo, è già stata presa in considerazione. Variazioni di espressione della proteina actina possono comportare un calo di acclimatazione alle basse temperature (Fields et al., 2012). È stato inoltre notato che in *M. edulis* durante stress ossidativo l'actina viene carbonilata e glutationilata; questo meccanismo sembra essere un metodo attraverso il quale viene protetta la struttura del citoscheletro dallo stress ossidativo (McDonagh et al., 2005), inoltre, essendo l'actina, sia G che F, un inibitore del fattore di elungazione 2 (EF-2), questo meccanismo potrebbe agire come sistema di comunicazione fra sintesi proteica, citoscheletro e stato redox (Bektas et al., 2004).

## 1.7 MECCANISMI DI CITOPROTEZIONE

Le cellule presentano numerosi sistemi difensivi capaci di garantire protezione da una vasta gamma di agenti tossici. Questi sistemi difensivi operano aumentando l'escrezione di sostanze tossiche e potenzialmente dannose o intrappolando ed inattivando vari tipi di specie reattive (Jones et al, 1986). Non tutti i sistemi sono attivi all'unisono, poiché alcune vie protettive sono messe in atto solo in situazioni di alterazione rispetto allo stato fisiologico cellulare. Molte delle proteine coinvolte in questi meccanismi sono presenti a basse concentrazioni e spesso necessitano di essere attivate. In altri casi le stesse proteine che svolgono azione difensiva sono già attive e presenti in maggior numero anche in condizioni fisiologiche, poiché la loro azione è necessaria anche al normale metabolismo cellulare. In questo caso, se l'azione difensiva è necessaria, è spesso riscontrabile un incremento di attività, espressione genica e sintesi proteica per queste proteine. I sistemi difensivi e protettivi presenti nel mitocondrio sono numerosi e nelle pagine a seguire verranno descritti alcuni aspetti relativi ai soli meccanismi presi in considerazione in questo studio.

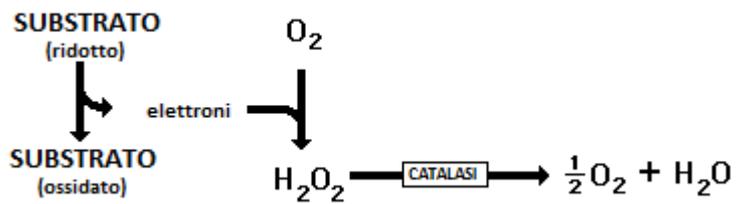
Al fine di comprendere appieno i sistemi difensivi cellulari, è necessario prendere in considerazione dapprima come una cellula possa far fronte a potenziali agenti dannosi esogeni ed endogeni attraverso un meccanismo che prende il nome di biotrasformazione. La scoperta di reazioni di coniugazione risolse il dubbio su come un composto non idrosolubile venga convertito in una sostanza che possa essere escreta nell'urina. Nel caso della coniugazione l'agente xenobiotico deve poter reagire con un gruppo funzionale. R.T. Williams (1947) propose che questi composti non reattivi possano essere biotrasformati. Nelle reazioni di biotrasformazione il metabolita risultante può essere inattivo o comunque meno attivo, fatta eccezione per casi di bioattivazione in cui il prodotto finale risulta più attivo e potenzialmente dannoso. Le reazioni di biotrasformazione seguono tre fasi, rispettivamente chiamate fase I, fase II e fase III. Le reazioni di fase I comprendono fondamentalmente reazioni di ossidazione, riduzione e idrolisi: i metaboliti risultanti sono leggermente più polari dei composti originari ma, essendo ora ionizzati a pH fisiologico, sono più facilmente escreti dall'organismo. Le reazioni di fase II sono reazioni di coniugazione, in cui, cioè, alcuni cofattori reagiscono con gli xenobiotici a livello di gruppi funzionali eventualmente resi disponibili dalle reazioni di fase I. Le reazioni di coniugazione originano metaboliti molto più polari (e quindi idrosolubili) dei composti originari e ciò li rende più facilmente espellibili dall'organismo. Le reazioni di fase III rappresentano la fase finale della risposta difensiva di una cellula, in questa fase avviene il trasporto del metabolita nell'ambiente extracellulare.

### 1.7.1 Stress ossidativo e catalasi

Lo stress ossidativo è una condizione patologica causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico fra produzione ed eliminazione di specie

chimiche ossidanti. Disturbi del normale stato redox della cellula possono causare effetti tossici tramite la produzione di perossidi e radicali

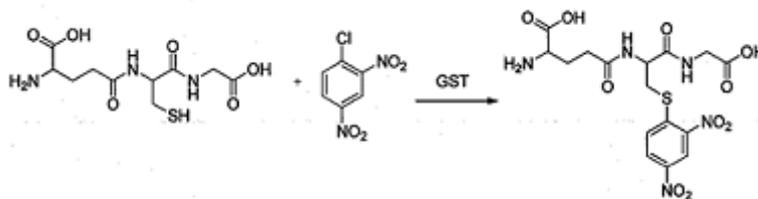
liberi che danneggiano i componenti della cellula, tra cui proteine, lipidi e DNA. Dal punto di vista prettamente chimico, lo stress ossidativo è associato ad un incremento nella produzione di specie ossidanti o ad un calo significativo dell'efficacia dei sistemi di difesa antiossidanti. L'effetto dello stress ossidativo cambia in base al grado di queste variazioni che normalmente la cellula è capace di riportare entro valori fisiologici, mentre a seguito di alte variazioni lo stress può portare anche a morte cellulare. Le principali specie chimiche capaci di causare variazioni dello stato redox comprendono anione superossido ( $O_2^-$ ), perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), radicale idrossilico ( $\bullet OH$ ), idroperossido organico (ROOH) e radicale perossido ( $ROO\bullet$ ). L'attività degli enzimi catalasi, glutatione s-transferasi e superossido dismutasi sono comunemente modificate in risposta allo stress ossidativo (Viarengo et al., 1990; Orbea et al., 2002b; Regoli et al., 2002; Geret et al., 2003; Orbea e Cajaraville, 2006). La risposta enzimatica mostra però un andamento a campana, con un iniziale aumento dovuto all'attività di sintesi degli enzimi, seguito da una diminuzione dell'attività enzimatica dovuta al maggior tasso catabolico e/o ad una diretta inibizione sulle molecole enzimatiche (Viarengo et al., 2007). L'enzima catalasi (CAT) appartiene al gruppo delle ossidoreduttasi e gioca un ruolo fondamentale nella difesa dalle specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS), ha infatti il compito di catalizzare la reazione di scissione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno, proteggendo le strutture cellulari dall'azione nociva dell'acqua ossigenata che continuamente si forma nei tessuti per numerosi processi fisiologici. Ogni molecola di catalasi ha quattro catene polipeptidiche, ciascuna composta da più di 500 amminoacidi, e annidati all'interno di questa tetrade vi sono quattro gruppi eme. Il pH ottimale per il funzionamento di questo enzima è 7, ma può variare fra specie diverse così come può variare anche la temperatura ottimale. L'attività di questo enzima è correlata a numerose variabili fra cui le condizioni dell'organismo, il sesso, l'età, lo stato nutrizionale, la stagione e molte altre ancora (Arnaud et al., 2000).



**Figura 4 - l'immagine raffigura la reazione catalizzata dall'enzima catalasi.** Questo enzima permette la detossificazione del perossido di idrogeno che si forma per dismutazione.

### 1.7.2 Detossificazione e Glutazione S-transferasi

Durante il corso della vita ogni organismo è esposto ad un grande numero di sostanze xenobiotiche, compresa una varietà di composti farmaceutici e alimentari. Il sistema di disintossicazione è in grado di gestire l'esposizione a queste



sostanze. Per eseguire questa funzione, ogni organismo ha evoluto complessi sistemi di enzimi che funzionano adeguatamente per ridurre al minimo il potenziale

**Figura 5 - In figura è mostrata una reazione rappresentativa dell'azione dell'enzima glutazione S-transferasi.** La prima molecola fra i reagenti è il glutatione ridotto (GSH), la seconda è 1-3 dinitrobenzene (CDNB). L'enzima GST catalizza la coniugazione del GSH con il CDNB. Allo stesso modo viene catalizzata la reazione con numerose altre sostanze xenobiotiche.

danno da xenobiotici. I sistemi di detossificazione sono molto complessi, mostrano una grande variabilità individuale e unicità genetica; sono anche estremamente sensibili alle caratteristiche ambientali ed allo stile di vita. Le glutazione S-transferasi (GSTs) sono una famiglia di isoenzimi citosolici, mitocondriali e microsomiali, della famiglia MAPEG, appartenenti alla fase II di detossificazione e comprendono numerosi esponenti divisi entro le classi alpha, beta, delta, epsilon, zeta, theta, mu, nu, pi, sigma, tau, phi, e omega. Questi enzimi catalizzano la reazione di coniugazione del glutatione ridotto, tramite gruppo sulfidrico, con centri elettrofili su di una vasta gamma di sostanze sia endogene che xenobiotiche. Nel mitilo è ormai noto il coinvolgimento degli enzimi GSTs nella difesa dell'organismo. Secondo Hoarau et al., 2001, Hoarau et al., 2002 e Hoarau et al., 2004, nel bivalve *Ruditapes decussatus*, l'espressione di differenti isoforme di GST sembra essere regolata in modo differente in base all'agente induttore; ad esempio composti organici sembrano indurre specifiche isoforme appartenenti alla classe pi. Nel mitilo mediterraneo sono stati individuati molteplici geni codificanti per GSTs, comunemente definiti *MgGST* (Wang et al., 2013). In generale le classi di GST codificate nel mitilo appaiono simili alle corrispettive rappresentate nei mammiferi. Mentre ciò è almeno in parte corretto, è stato riscontrato che la GST codificata dal gene *MgGST-p* (Hoarau et al., 2006), pur possedendo caratteristiche analoghe alla classe pi, sembrerebbe appartenere ad una classe autonoma di GST specifica dei molluschi, poiché studi approfonditi a riguardo hanno evidenziato una forte divergenza tra le sequenze geniche, le proprietà fisiche, immunologiche e biochimiche (Fitzpatrick et al., 1995; Hoarau et al., 2002). Nonostante tale questione sia tuttora oggetto di studio da parte della comunità scientifica, il ruolo chiave di GST nella detossificazione è ormai associato e questo enzima viene frequentemente utilizzato come biomarker in analisi ecotossicologiche atte alla valutazione dell'effetto di potenziali agenti inquinanti.

### 1.7.3 Trasporto di membrana

Una delle caratteristiche fondamentali di ogni cellula e compartimento cellulare è la capacità di accumulare o rimuovere molte sostanze fino a raggiungere concentrazioni che spesso sono sorprendentemente diverse da quelle ambientali. La maggior parte delle sostanze che attraversano le membrane è rappresentata da piccole molecole di natura sia organica che inorganica. Tali molecole non attraversano le membrane con ampi flussi ma singolarmente, una per volta. La maggior parte delle molecole organiche sono rappresentate da substrati, composti intermedi e prodotti delle varie vie metaboliche che si svolgono in ambito cellulare, in altre parole, i metaboliti. Il raggiungimento delle concentrazioni fisiologiche delle sostanze presenti all'interno della cellula è di importanza fondamentale in quanto pochissime reazioni potrebbero avvenire alle concentrazioni ambientali. La capacità di trasportare sostanze contro gradiente chimico, elettronico, o semplicemente il trasporto di molecole che non attraversano spontaneamente le membrane, assume un aspetto chiave anche in riferimento all'espulsione di sostanze pericolose, tossiche o di scarto che, se presenti a concentrazioni elevate, possono gravare sul funzionamento delle vie metaboliche finanche causare la morte cellulare e non di rado il decesso dell'organismo. Il trasporto attivo è un aspetto di particolare interesse nell'ambito del trasporto di membrana in quanto permette alla cellula di muovere soluti lontano dall'equilibrio termodinamico, ovvero contro un gradiente di concentrazione o elettrochimico. La capacità di compiere questa peculiare azione pesa però sul metabolismo energetico poiché a tale trasporto è associato il consumo di ATP (trasporto attivo diretto). Di conseguenza, le proteine di membrana coinvolte nel trasporto attivo devono provvedere non soltanto al trasferimento delle molecole del soluto desiderato attraverso la membrana, ma anche all'accoppiamento di tale trasferimento ad una reazione che cede energia. Esistono quattro tipi di trasportatori a trasporto attivo diretto: ATPasi di tipo P, ATPasi di tipo V, ATPasi di tipo F ed ATPasi di tipo ABC. Di particolare interesse ai fini di questo studio sono le ATPasi di quarto tipo o ATPasi di tipo ABC, dove ABC è acronimo di "ATP Binding Cassette" ed indica la presenza di domini catalitici della proteina che legano ATP come parte integrante del processo di trasporto. I trasportatori ABC sono una superfamiglia di proteine di trasporto fra loro correlate per sequenza e forse anche per meccanismo molecolare. Il trasportatore ABC tipico presenta quattro domini, due dei quali sono particolarmente idrofobi ed interamente racchiusi nella membrana; al contrario due sono localizzati perifericamente nel versante citoplasmatico della membrana. I due domini interni presentano sei segmenti ciascuno e si presume formino il canale attraverso il quale le molecole sono trasferite. I due domini periferici sono invece responsabili dell'accoppiamento del legame con ATP e relativa idrolisi con il processo di trasporto. Le ATPasi ABC sono presenti sia in eucarioti che in procarioti ed hanno la straordinaria capacità di trasportare una moltitudine di soluti; l'interesse per

queste proteine è incrementato dal ruolo chiave che alcune di queste svolgono durante trattamenti farmacologici con antitumorali.

La P-glicoproteina (P-gp) rientra nella superfamiglia di ATPasi di tipo ABC. Anche nota come “proteina di resistenza multifarmaco 1” (MDR1) e “ATP-binding cassette sotto-famiglia B membro 1” (ABCB1), P-gp è considerata il trasportatore di xenobiotici per eccellenza a causa dell’ampio spettro di substrati trasferibili ed è uno dei principali fattori che contribuiscono allo sviluppo della resistenza multifarmaco (MDR, “multi-drug resistance”). Cellule che presentano resistenza multifarmaco non permettono l’accumulo di farmaci, e più in generale di xenobiotici, al loro interno, diminuendone o persino eliminandone l’effetto. Tale problema è di particolare rilevanza nei trattamenti chemioterapeutici, quando le cellule tumorali, grazie a questo meccanismo di protezione, sviluppano resistenza ai farmaci utilizzati. Come è possibile immaginare, a seguito di questa scoperta innumerevoli studi focalizzati alla comprensione del funzionamento e della regolazione di questa glicoproteina si sono susseguiti nel tempo e, ad oggi, molti aspetti strutturali e funzionali sono noti. P-gp è una proteina di 170 kDa suddivisibile in due metà altamente omologhe ed una regione linker che le collega. La regione linker è soggetta a fosforilazione da parte di due proteine: protein-chinasi A (PKA) e protein-chinasi C (PKC). La fosforilazione avviene esclusivamente in siti Ser 661, 667, 671, 675 e 683 (Chambers et al., 1993; Orr et al., 1993). Queste modificazioni post-traduzionali non sembrano essere di particolare importanza, infatti è stato notato che la sostituzione di 5 residui Ser nella regione linker con 5 residui di alanina non ha alcun effetto sulla capacità di P-gp di essere incorporata nella superficie cellulare, di trasportare farmaci e, più in generale, di conferire resistenza multifarmaco (Parissenti et al., 1999). Di particolare interesse è il possibile controllo da parte della PKA direttamente sull’espressione genica di P-gp. È stata dimostrata una correlazione fra inibizione dell’attività catalitica della PKA e calo di espressione di *P-gp*, con conseguente calo di funzionalità del sistema di resistenza multifarmaco (Abraham et al., 1990; Chin et al., 1992). Riguardo al meccanismo di azione di questa pompa, sono stati elaborati diversi modelli basati sulle caratteristiche dei substrati di P-gp, ovvero la lipofilicità ed idrofobicità, e sulla presenza di siti di legame con il substrato nei domini transmembrana della proteina. Oltre ad essere lipofili, questi substrati sono spesso anfipatici e, per questa caratteristica, si posizionano a livello delle teste lipidiche e dei primi atomi di carbonio delle code (Siarheyeva et al., 2006). Il primo modello, detto “*vacuum cleaner*” (Higgins & Gottesman, 1992), prevede che, a seguito della traslocazione della molecola substrato dal foglietto esterno a quello interno della membrana plasmatica, la molecola, ora substrato disponibile per *P-gp*, venga trasferita attivamente nel mezzo extracellulare da quest’ultima. Nel secondo modello, “*flippase model*” (Higgins & Gottesman, 1992), la molecola viene ancora una volta traslocata spontaneamente dal foglietto esterno

all'interno; da qui grazie all'azione di P-gp viene nuovamente traslocata nel foglietto esterno, dove è naturalmente più concentrata. La molecola trasferita può ora spostarsi spontaneamente nel mezzo esterno o essere nuovamente soggetta ad una spontanea traslocazione verso il foglietto interno. Dato il raggiungimento dello stesso equilibrio in entrambi i modelli, risulta essere estremamente complesso valutare quale dei due sia corretto, ma considerazioni basate sul costo energetico e numerosi risultati sperimentali sembrano essere a favore del secondo modello. Molti studi sono svolti utilizzando cellule umane o di roditore e riguardano isoforme di P-gp e di PKA presenti in questi organismi. Benché queste proteine appaiano piuttosto conservate, non è attualmente associata una loro interazione nel mitilo *M. galloprovincialis*, nostro soggetto di studio. Studi riguardanti l'espressione di P-gp in *M. edulis* e *Crassostrea gigas* hanno dimostrato la presenza di uno o più regioni del DNA codificanti per P-gp ed altre proteine affini alle ATPasi ABC conferenti resistenza multifarmaco nei mammiferi. Oltremodo importante è l'identificazione di una correlazione fra espressione genica di P-gp e livello di inquinamento ambientale (Minier et al., 1993). A livello embrionale i trasportatori ABC sono utilizzati per diverse funzioni oltre all'efflusso di xenobiotici, ad esempio sono importanti per l'omeostasi lisosomiale e mitocondriale, per la regolazione dei canali  $K^+$ , per la pigmentazione e per la segnalazione cellulare. Durante lo sviluppo, *Strongylocentrotus purpuratus* esibisce differenze di espressione genica di ABCB1 sia dal punto di vista spaziale che temporale e differenti patterns di localizzazione delle proteine che suggeriscono ben definite funzioni, sia protettive che di sviluppo (Shipp e Hamdoun, 2012). Negli organismi marini il fenomeno equivalente alla resistenza multifarmaco è detto resistenza multixenobiotica ("multixenobiotic resistance", MXR) ed anche questa è strettamente correlata alla proteina P-gp. Molte specie acquatiche hanno la capacità di sopravvivere in ambienti che presentano alti livelli di molteplici agenti inquinanti antropici o biogenici. Questa straordinaria capacità di sopravvivenza sembra essere legata ai già ben noti sistemi di detossificazione (enzimi di fase I, II e III, heat shock proteins, etc.), ai quali si aggiunge l'attività MXR mediata dal trasportatore di membrana P-gp (Shannon, 2000). Oltre alla P-glicoproteina, a conferire attività MDR nell'uomo e in altri organismi, partecipano altri trasportatori chiamati MRPs (*multidrug resistance-related proteins*) codificati dai geni *ABCC*. Gli MRPs sono parte della superfamiglia dei trasportatori ABC e responsabili del trasporto di numerosi substrati attraverso le membrane cellulari. Fra le principali molecole trasportate si annoverano diversi anioni organici fra cui il glutatione ossidato, i cisteinil-leucotrieni e numerose tossine organiche. Nel mitilo è ormai nota la presenza di geni codificanti per proteine di tipo Mrp (*Mrp-like proteins*) anch'esse codificate da geni analoghi agli *ABCC*. Negli organismi acquatici, Mrp è uno dei principali partecipanti all'efflusso di sostanze dannose o potenzialmente dannose tramite il sistema MXR. Nel mitilo mediterraneo adulto *ABCC* è espresso dove l'azione di

questo meccanismo di difesa è maggiormente richiesta, ovvero branchie ed ematociti. Uno degli aspetti chiave è la stretta relazione fra il glutathione ed MRPs. È stato riscontrato che, in cellule del carcinoma polmonare umano che presentano MDR, in assenza di glutathione, il contributo al trasporto di Mrp viene enormemente ridotto (Zaman et al., 1995), inoltre, in presenza di trasportatori MRPs, il glutathione nel medium extracellulare è notevolmente più concentrato. A causa di quanto appena detto e della elevata affinità di Mrp per i metaboliti GS-X (molecole coniugate al glutathione) è stata avvalorata l'interpretazione di Mrp come trasportatore di metaboliti S-coniugati al GSH (Zaman et al., 1995).

## (2) SCOPO DELLA TESI

Questo elaborato intende riassumere il lavoro svolto presso il laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale del Dipartimento Bigea, UOS di Ravenna. Lo studio condotto è finalizzato all'ampliamento ed al perfezionamento delle conoscenze relative alla fisiologia della specie *Mytilus galloprovincialis*. Studi molecolari sono da tempo condotti su tale organismo ma, fino ad ora, poche sono state le applicazioni di tecniche molecolari rivolte al suo sviluppo larvale, ambito in cui si inserisce il lavoro qui presentato. La necessità di incrementare le nostre conoscenze sullo sviluppo larvale del mitilo mediterraneo è sempre più oggetto di attenzioni da parte della comunità scientifica ed in particolare di chi si occupa di studi ambientali, in quanto si tratta di fasi critiche durante le quali gli organismi risultano molto più sensibili ai potenziali agenti dannosi riscontrabili in mare rispetto agli organismi adulti della stessa specie. Un ulteriore aspetto del quale è necessario tenere conto riguarda la possibilità di utilizzare gli stadi larvali di *Mytilus galloprovincialis* in test ecotossicologici. Tale utilizzo richiede però un'approfondita conoscenza della loro biologia.

La presente ricerca si focalizza su tre aspetti chiave: la biomineralizzazione, in quanto elemento fondamentale nello sviluppo degli organismi dotati di conchiglia; lo sviluppo ed il mantenimento della struttura cellulare, in quanto l'evoluzione nei vari stadi comporta probabilmente innumerevoli e drastici cambiamenti a tutti i livelli; e la detossificazione, in quanto capace di fornire l'adeguata protezione in questi stadi estremamente suscettibili. Inoltre si è cercato di valutare il coinvolgimento di meccanismi cAMP dipendenti nella regolazione dell'espressione di geni coinvolti nei tre aspetti sopracitati. A tale scopo, abbiamo utilizzato i composti farmaceutici propranololo e carbamazepina, che, grazie a studi precedentemente condotti in questo laboratorio, sappiamo interferire nella regolazione della via del cAMP nei mitili. Queste sostanze sono anche presenti come contaminanti negli ambienti marini costieri, per cui da questi studi possiamo anche ottenere informazioni circa la pericolosità di queste sostanze per una fase molto delicata del ciclo vitale del mitilo.

La parte dello studio che riguarda la biomineralizzazione si concentra su due elementi chiave di questo processo: l'enzima anidraasi carbonica (CA, dall'inglese *Carbonic Anhydrase*), catalizzante l'idratazione reversibile di  $\text{CO}_2$  in  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$ , ed una proteina recentemente identificata denominata proteina extrapalliale (EP, dall'inglese *Extrapallial Protein*) che sembra svolgere un ruolo fondamentale nell'assemblaggio del carbonato di calcio nelle unità strutturali costituenti gli strati prismatico e nacreo della conchiglia del mitilo.

Il secondo ambito di studio esaminato riguarda l'espressione di un gene costitutivo (o *housekeeping*) codificante per la proteina actina. L'actina svolge ruoli fondamentali al differenziamento cellulare ed al mantenimento della forma e della tonicità delle cellule. Passando attraverso diversi stadi, lo sviluppo larvale del mitilo *M.galloprovincialis* presenta un costante riarrangiamento morfo-funzionale cito-istologico, partendo dalla singola cellula uovo fecondata fino ad arrivare allo stadio, ben più complesso, di veliger. Per questo motivo si è voluta valutare l'espressione di un gene codificante per l'actina, proteina chiave dello sviluppo citoscheletrico e non solo.

Il terzo ambito di studio di questo lavoro è rappresentato dal processo di detossificazione; in particolare viene preso in esame il sistema MXR (dall'inglese *multi-xenobiotic resistance*), generalmente considerato la prima linea di difesa e di resistenza a stress nell'organismo in esame. Questo processo fa capo a trasportatori transmembrana che permettono l'espulsione, tramite trasporto attivo con consumo di ATP, di farmaci, ioni in eccesso e contaminanti ambientali in generale. Inoltre è stato riscontrato un coinvolgimento nell'espulsione di metaboliti secondari durante lo sviluppo larvale; ne risulta perciò che questo sistema svolge anche un ruolo metabolico essenziale all'ottimale sviluppo ed alla sopravvivenza degli organismi già durante le prime fasi di vita che, come già accennato, sono particolarmente fragili. Sempre nell'ambito dei processi di detossificazione è stato preso in analisi l'enzima glutatione S-transferasi (GST), enzima di fase II, catalizzante la coniugazione di sostanze potenzialmente dannose con il glutatione ridotto (GSH) per facilitarne l'espulsione. Spesso all'interno delle cellule si riscontra un aumento di concentrazione di molecole capaci di causare stress ossidativo che, se non contrastato, può causare gravi danni a tutte le componenti cellulari, compreso il DNA. Tali sostanze possono essere esogene, ovvero non prodotte dalle cellule stesse (es. inquinanti quali metalli e farmaci), o endogene in quanto prodotti del metabolismo cellulare. Uno degli agenti che possono causare stress ossidativo è il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) che viene solitamente a formarsi all'interno dei perossisomi. A causa dell'azione di numerosi inquinanti (in particolar modo i metalli), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), fra cui il perossido di idrogeno, viene incrementata. Per far fronte a tale problema entrano in gioco vari meccanismi di difesa fra i quali rientra l'enzima catalasi (CAT) che catalizza la reazione detossificazione dal  $H_2O_2$ . In questo studio si è quindi voluta valutare l'espressione di geni codificanti per l'enzima catalasi al fine di valutare come anche questo meccanismo di difesa si evolva durante gli stadi larvali del mitilo mediterraneo.

### (3) MATERIALI E METODI

Per gli scopi di questo studio, il disegno sperimentale ha previsto le seguenti fasi:

- (1) Valutazione della stabilità di più trascritti genici al fine di ottenere i corretti geni di riferimento necessari.
- (2) Valutazione dei profili, sia basali che in presenza di propranololo o carbamazepina, dell'espressione di geni codificanti per: anidraasi carbonica, proteina extrapalliale, recettore 5-HT<sub>1</sub>, actina, P-gp, Mrp, catalasi e glutatione S-transferasi.
- (3) Caratterizzazione del sistema MXR tramite analisi dell'attività basale in presenza/assenza degli inibitori selettivi MK571 e Verapamil, e dell'attività dopo il trattamento con i farmaci propranololo e carbamazepina.
- (4) Analisi dell'attività dell'enzima protein-chinasi A.
- (5) Analisi statistica dei dati ottenuti dagli esperimenti sopra elencati.

#### 3.1 FERTILIZZAZIONE IN VITRO

Lo sviluppo di un'appropriata metodologia di fecondazione è un passaggio cruciale che richiede particolare attenzione, in quanto sono molti i fattori che possono impedire il corretto sviluppo embrionale. Le stesse condizioni in cui la fecondazione avviene possono determinare malformazioni e ritardi di sviluppo. In base alla stagione ed alle caratteristiche dell'ambiente di provenienza dei mitili, questi possono presentarsi in diversi stadi di maturità sessuale. È necessaria la maturità delle uova e degli spermatozoi per il successo della fecondazione, ed è perciò indispensabile effettuare gli esperimenti nel periodo durante il quale i mitili sono in piena maturità gonadica. In questo studio è stato utilizzato il protocollo elaborato da Fabbri & Canesi (2014) per la fecondazione in vitro di ovociti mitili. Per poter ottenere sperma e uova separatamente, esemplari adulti di *M. galloprovincialis* sessualmente maturi, provenienti da allevamenti di Cesenatico, sono stati trasferiti in laboratorio e alloggiati in vasche contenenti acqua di mare artificiale (ASW, *artificial sea water*) e tenuti alla temperatura costante di 16°C, quindi monitorati. Durante il monitoraggio i mitili in emissione sono stati posti in becher individuali contenenti 200 ml di ASW 16°C e rimossi al termine dell'emissione. In seguito all'ottenimento dei gameti, maschili e femminili, il contenuto dei becher è stato filtrato. È stata effettuata la conta dei gameti al microscopio e i volumi sono stati aggiustati in modo da avere una densità di uova pari a 200 uova/ml e un rapporto uova:sperma 1:10 (Fabbri et al., 2014). Trenta minuti dopo la fertilizzazione delle uova, i campioni sono stati controllati al microscopio per valutare la percentuale di oociti

fecondati. Si considera riuscita con successo una fecondazione in cui il 90% delle uova sono fecondate, ossia presentano il globulo polare.

### **3.1.1 Caratterizzazione di profili trascrizionali, attività basale della PKA, attività basale dei trasportatori MXR.**

Le larve sono state mantenute alle condizioni ottimali per lo sviluppo e opportunamente trattate alle varie fasi a seconda degli *endpoints* analizzati.

### **3.1.2 Sviluppo larvale in presenza di modulatori del sistema di traduzione cAMP/PKA dipendente.**

Trenta minuti dopo la fertilizzazione e fino alla formazione delle larve veliger (48 post-fertilizzazione) gli embrioni sono stati esposti a concentrazioni note di due modulatori del sistema cAMP/PKA, propranololo (PROP, 0.01 µg/L e 1 µg/L) e carbamazepina (CBZ, 0.01 µg/L e 10 µg/L). Le sostanze sono state aggiunte nei pozzetti contenenti gli embrioni a partire da soluzioni stock preparate in acqua milliQ sterile (propranololo) o DMSO (carbamazepina), tenendo conto dei loro limiti di solubilità. Un gruppo di campioni di controllo sono stati mantenuti in parallelo agli embrioni trattati. I campioni sono stati quindi incubati per 48 ore a  $16 \pm 1$  °C.

In ogni esperimento, tutte le condizioni sono state saggiate in triplicato. Il campionamento degli stadi larvali è stato effettuato 30 minuti post-fertilizzazione (stadio di ovocita fecondato), 24 ore post-fertilizzazione (stadio di trocofora) e 48 ore post-fertilizzazione (stadio di veliger).

## **3.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA**

Per poter analizzare l'espressione di geni tramite qPCR (PCR quantitativa in tempo reale), è necessario dapprima ottenere l'RNA totale presente nei campioni, quindi concentrarlo e retrotrascriverlo. La retrotrascrizione è il processo grazie al quale è possibile ottenere DNA complementare partendo da molecole di RNA. Questa procedura è basata sulla peculiare capacità di un enzima, chiamato trascrittasi inversa, capace di compiere il passaggio inverso della trascrizione: sintetizzare DNA a partire da RNA. Il DNA complementare così ottenuto, grazie a strumenti specializzati, può essere utilizzato in reazione di PCR. La qPCR è una analisi particolare durante la quale lo strumento, oltre a far avvenire la reazione di polimerizzazione a catena, quantifica il numero di copie prodotte grazie alla presenza di molecole marcate, capaci di emettere un segnale proporzionale alla quantità di prodotto di amplificazione.

Primer	Abbreviazione	Taglia Amplificato (bp)	Efficienza di amplificazione (%)	Referenze bibliografiche
Actina	ACT	120	114	Banni et al., 2011
Tubulina	TUB	135	102	Cubero-Leon et al., 2012
RNA elicasi	HEL	129	132	Cubero-Leon et al., 2012
Fattore di elongazione $\alpha 1$	EF-1	135	99	Ciocan et al., 2011
18S rRNA	18S	90	95	Dondero et al., 2005
28S rRNA	28S	142	94	Ciocan et al., 2011
ABCB	ABCB	139	112	Franzellitti e Fabbri, 2013
ABCC	ABCC	194	87.7	Della Torre et al., 2014
Recettore 5-HT1	5-HT1	130	117	Cubero-Leon et al., 2010
Proteina extrapalliale	EP	100	100	non pubblicato - Acc numb: AY364453
Anidraasi carbonica	AC	102	95	non pubblicato - Acc numb: LK934681
Catalasi	CAT	132	96	Barmo et al., 2011
Glutazione S-transferasi	GST	172	100	Barmo et al., 2011

**Tabella 1 - Lista dei primers utilizzati per le analisi di real time PCR.**

### 3.2.1 Estrazione e purificazione dell'RNA totale

Per l'estrazione dell'RNA è stata effettuata la fertilizzazione di circa 6000 uova per campione. I campioni sono stati incubati in ghiaccio 20 minuti e centrifugati 10 minuti a 691 g a 4°C. Il sovranatante è stato filtrato sotto vuoto con filtro di nylon a bassa porosità (diametro maglia < 50  $\mu\text{m}$ ) e quest'ultimo dilavato con un opportuno volume di TRI-Reagent (Sigma Aldrich). Per la purificazione dell'RNA è stato utilizzato il kit Zymo Research Direct-zol™ RNA MiniPrep seguendo l'apposito protocollo. L'RNA concentrato è stato quindi sottoposto a una verifica qualitativa mediante lettura allo spettrofotometro ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ), e mediante elettroforesi orizzontale su gel denaturante.

L'RNA concentrato è stato conservato a -80°C in attesa di essere retrotrascritto.

### 3.2.2 Retrotrascrizione

L'RNA concentrato è stato utilizzato per la retrotrascrizione al fine di ottenere 500 ng di DNA complementare (cDNA) per ogni campione analizzato. La retrotrascrizione è stata effettuata tramite termociclatore ONE-Gradient (Euroclone) utilizzando il kit iScript™ Reverse Transcription Supermix (Biorad), seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

### 3.2.3 Real Time PCR

La quantificazione relativa è stata utilizzata per valutare i profili di espressione di trascritti target nelle larve a diverse fasi di sviluppo o sottoposte a diversi trattamenti. Questo approccio prevede l'utilizzo di campioni di riferimento (nel nostro caso ovociti fertilizzati non esposti ai diversi trattamenti), e l'analisi dell'espressione dei prodotti genici bersaglio simultaneamente all'analisi di controlli endogeni (geni *housekeeping*) utilizzati per la normalizzazione dei dati. I dati

normalizzati sono espressi come  $\log_2$  del rapporto d'induzione (o *fold change*) rispetto al campione di riferimento. Per l'amplificazione dei trascritti di nostro interesse, sono stati utilizzati specifiche coppie di primers per i geni target e per 6 controlli endogeni in parte già utilizzati in precedenti studi, in parte appositamente costruiti in questo lavoro di Tesi (anidrasi carbonica, CA, proteina extrapalliale; EP; Tabella 1). In accordo con le linee guida internazionali che definiscono i criteri di validità e qualità per i protocolli di qPCR (linee guida MIQE, “*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time Experiments*”; Bustin et al., 2009), l'efficienza della reazione è stata calcolata dalla pendenza (*slope*) di una retta di regressione ottenuta correlando i valori  $C_T$  e la quantità nominale di RNA ottenuta a partire da diluizioni scalari di un campione di cDNA (ciascuna diluizione è stata analizzata in triplicato). I valori ottenuti in questo lavoro di Tesi sono risultati conformi con quelli riportati nei precedenti lavori (Tabella 1).

Lo standard internazionale prevede i seguenti criteri di qualità per la determinazione dell'efficienza di reazione di qPCR:

- 1) Riproducibilità: la deviazione standard fra i  $C_T$  dei replicati per ciascun punto della retta deve essere sempre inferiore a 0.5
- 2) Linearità: il coefficiente di correlazione della retta deve essere maggiore o uguale a 0.99;
- 3) L'efficienza della reazione deve essere compresa tra il 90-120%.

Inoltre, sia nella fase di messa a punto che nella fase di analisi dei campioni sperimentali, dopo ogni reazione di amplificazione è stata effettuata una curva di dissociazione (curva di melting) per verificare l'assenza di prodotti di amplificazione aspecifici che potrebbero alterare la validità del risultato ottenuto.

Tutte le reazioni sono state condotte in un sistema per PCR real time del tipo StepOne (Life Technologies), impiegando un protocollo termico standard del tipo “fast mode”. Sia per l'amplificazione dei geni bersaglio che per i controlli endogeni, le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 10  $\mu$ L contenente: iTaq Universal Master mix (Biorad Laboratories) 2X contenente tutti i reagenti necessari per l'amplificazione (DNA polimerasi, dNTPs, ecc...) e il reporter Sybr Green I, i due primers forward e reverse, ciascuno alla concentrazione 0.2 o 0.5  $\mu$ M (dipendente dalla coppia di primers utilizzata) e una quantità di cDNA corrispondente a 15 ng di RNA totale di partenza.

Per la quantificazione relativa è stato inoltre necessario condurre uno studio preliminare per la selezione del migliore o dei migliori controlli endogeni per un'accurata normalizzazione dei dati. In

questo lavoro di Tesi abbiamo seguito le indicazioni delle linee guida MIQE adottando una strategia per la normalizzazione basata sulla valutazione preliminare della stabilità dei livelli di espressione di un set di controlli endogeni nei campioni sperimentali, descritta qui di seguito. Il calcolo dei fold change e l'analisi dei risultati è stato effettuato attraverso i software StepOne e Expression Suite (Life Technologies), che utilizzano il metodo di quantificazione relativa descritto da Livak e Schmittgen (2008). Questo si basa sul confronto dei valori di  $C_T$  rilevati per il gene bersaglio tra il campione in esame e un campione di riferimento (ovvero il controllo sperimentale). Dati sono stati, infine, riportati come medie  $\pm$  SEM.

### 3.3 SELEZIONE DEI GENI DI RIFERIMENTO

Per valutare la stabilità dei trascritti ed identificare quali possano essere i geni di riferimento idonei, ovvero stabilmente espressi durante le fasi dello sviluppo larvale, è stato utilizzato l'approccio seguito da Franzellitti et al. (2015), che prevede l'analisi della variazione dei valori di  $CT$  del set di potenziali controlli endogeni in esame nei campioni sperimentali utilizzando diversi algoritmi. Inizialmente si sono utilizzati gli algoritmi BestKeeper, geNorm e NormFinder, assieme alla comparazione dei  $\Delta C_T$ . A seguito di questa fase iniziale è stato utilizzato lo strumento RefFinder per la valutazione finale.

L'algoritmo BestKeeper elabora una media geometrica dei delta  $C_T$ , tramite la quale genera un ipotetico fattore di normalizzazione globale. Il presupposto di partenza di questo algoritmo è che all'aumentare dei trascritti misurati, le variazioni dovute a cambiamenti biologici di espressione dell'mRNA apportino un contributo progressivamente minore all'andamento generale rispetto a variazioni di concentrazione di cDNA casuali dovute alla preparazione dei campioni. Ne consegue che, effettuando confronti a coppie tra i valori di espressione ed il "bestkeeper", sia possibile identificare quali prodotti comportino meno variabilità, riflettendo quindi i livelli di cDNA in modo migliore. A questo punto è possibile ordinare i prodotti dei geni di riferimento seguendo un ordine di stabilità, dal più stabile al meno stabile.

L'algoritmo geNorm parte invece dal presupposto che patterns particolarmente simili di variazione osservati nei prodotti genici associati a processi cellulari non correlati riflettano maggiormente le variazioni nei livelli di cDNA piuttosto che nell'espressione dell'mRNA. Questa tecnica utilizza confronti a coppie per classificare i prodotti genici attraverso l'addizione della variazione individuale e scarta poi i trascritti più variabili prima di ripetere l'analisi, identificando quindi una coppia di geni a minima variazione, ed infine elabora classifica di trascritti a varianza crescente. La

stabilità dei questi è espressa attraverso una misura di stabilità (valore M) basata sulla media geometrica di tutti i prodotti genici studiati e sulla variazione fra coppie. Minore è questo valore, maggiore è la stabilità del gene.

NormFinder calcola le variazioni individuali di ogni prodotto relativamente alla media del dataset, prendendo in considerazione sia le variazioni tra gruppi (differenti stadi larvali) che entro i gruppi (differenti campioni di uguale stadio). Questo algoritmo addiziona le suddette fonti di variabilità fornendo un valore di stabilità specifico per ogni prodotto genico in una data condizione. Questa inclusione dell'analisi specifica dei gruppi identifica trascritti che mostrano la maggior stabilità generale per le condizioni presentate piuttosto che quelli le cui variazioni sono semplicemente variazioni ben abbinate. Minore è l'indice di stabilità ricavato da NormFinder, maggiore risulta essere la stabilità del gene.

RefFinder è uno strumento che permette di valutare la stabilità di geni di riferimento da un dataset particolarmente grande. Questo strumento integra tutti i metodi sopracitati al fine di comparare e classificare i geni di riferimento analizzati. Basandosi sulla classificazione pesata ottenuta da ogni programma, elabora una classifica generale finale.

### **3.4 ATTIVITÀ DEL SISTEMA MULTIXENOBIOTIC RESISTANCE**

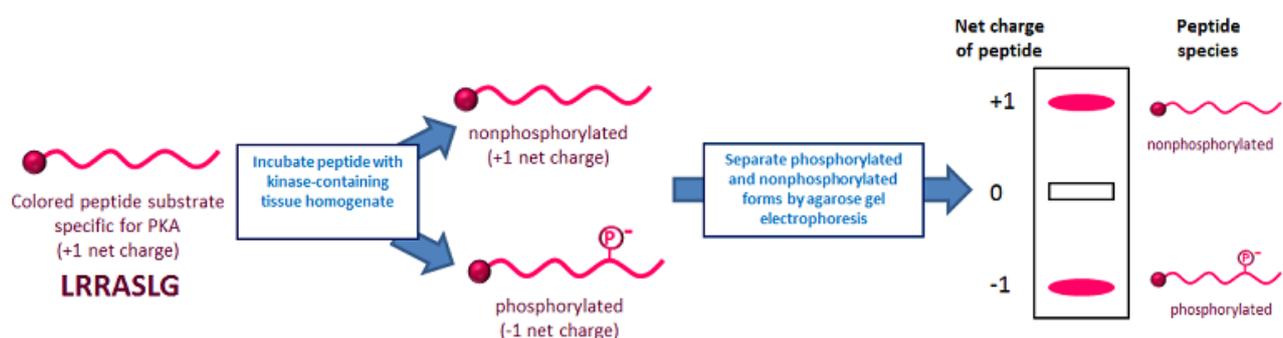
Il saggio di valutazione dell'attività di trasporto delle proteine MXR si basa sulla quantificazione dei livelli residui di un substrato fluorescente trattenuto all'interno delle cellule. Il substrato fluorescente utilizzato è la rodamina 123, impiegata in questo tipo di test perché substrato di entrambe le famiglie di trasportatori MXR analizzati (Smital & Kurelec, 1998).

Il saggio è stato effettuato sugli stadi di trocofora (24 ore p.f.) e veliger (48 p.f.). Campioni di uova fecondate (30 min p.f.) sono stati utilizzati come riferimento per la normalizzazione dei dati. Prima dell'incubazione con la rodamina, gli embrioni ai diversi stadi di sviluppo sono stati trattati per 5 min con verapamil, inibitore Pgp-selettivo, e MK571, un inibitore MRP-selettivo. Gli inibitori sono stati aggiunti agli opportuni campioni a partire da soluzioni stock (preparate in dimetilsolfossido, DMSO), ad una concentrazione finale di 20  $\mu$ M (verapamil) e 10  $\mu$ M (MK571). La concentrazione finale di DMSO è pari a 0.1% (v/v), concentrazione che esperimenti preliminari hanno mostrato non alterare i parametri testati (dati non mostrati).

Una seconda serie di esperimenti ha visto il trattamento degli embrioni con i modulatori neuroendocrini propranololo e carbamazepina. E' stessa utilizzata la stessa procedura di preparazione e trattamento degli embrioni impiegata per le analisi di espressione genica.

Per entrambe le serie di esperimenti, sia alle larve trattate che a quelle di controllo è stato aggiunto un opportuno volume di una soluzione stock di Rodamina 123 in DMSO (concentrazione finale di DMSO = 0.1% v/v) preparata in modo tale che la concentrazione finale di rodamina risulti 2.5  $\mu$ M. Le larve sono state incubate in queste condizioni per 90 min al buio. Terminato il periodo di trattamento, i campioni sono stati incubati per 20 min in ghiaccio e le larve sono state raccolte su filtri di nylon. Il filtro è stato quindi dilavato con un opportuno volume di una soluzione di lisi contenente 0.1% Triton X-100 in PBS 1X. I lisati sono stati opportunamente diluiti e la fluorescenza dei campioni è stata rilevata mediante l'utilizzo di un fluorimetro Jasco modello FP-6200 (lunghezza d'onda di eccitazione = 485 nm; lunghezza d'onda di emissione = 530 nm). Per evitare la perdita di intensità di fluorescenza della Rodamina 123, tutte le fasi di manipolazione dei campioni sono avvenute al buio. I valori di intensità di fluorescenza sono stati normalizzati sul contenuto di proteine dei lisati misurato mediante il saggio colorimetrico di Lowry (Lowry et al., 1951). I dati finali sono stati espressi come media  $\pm$  SEM della variazione percentuale rispetto ai campioni di controllo.

### 3.5 ATTIVITÀ DELL'ENZIMA PROTEIN-CHINASI A



**Figura 6 – L'immagine mostra il meccanismo alla base del saggio di attività dell'enzima PKA.** Il saggio sfrutta la fosforilazione di un peptide segnale da parte dell'enzima PKA. Tramite elettroforesi, il peptide segnale, se fosforilato migra verso il polo positivo, se non fosforilato migra verso il polo negativo.

Per valutare l'attività della protein-chinasi A (PKA) si è effettuata la fertilizzazione di circa 6000 uova per campione. Gli embrioni all'opportuno stadio di sviluppo sono stati raccolti su filtro in nylon a maglia stretta (<50  $\mu$ m) ed il filtro dilavato in 500  $\mu$ l di soluzione di estrazione della PKA contenente Tris-HCl 25 mM pH 7.4, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanolo 10 mM,

cocktail di inibitori delle proteasi 1% e PMSF 0.5%. I campioni sono stati incubati 30 minuti in ghiaccio e quindi centrifugati a 7760 g per 5 minuti a 4°C. Il sovranatante è stato prelevato e conservato a -80°C. L'attività della PKA è stata quantificata utilizzando il kit PepTag PKA assay kit (Promega). Questo metodo utilizza un peptide fluorescente (KemptidePepTAG A1 Peptide) specifico per la chinasi in questione. Quando la PKA fosforila il substrato fornito dal kit, la carica netta del peptide è alterata da +1 a -1. In questo modo, sottoponendo i campioni a un'elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio, la frazione di peptide fosforilato migrerà al polo opposto rispetto a quella non fosforilata (fig. 6). La reazione prevede una fase di attivazione dell'enzima (1 minuto a 30°C), una fase di reazione (30 minuti a 25°C) ed una di inattivazione (10 min a 95°C). L'elettroforesi dei prodotti di reazione è stata effettuata su gel di agarosio 0.8% in tampone Tris-HCl 50 mM.

### **3.6 QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE**

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato seguendo il protocollo di Lowry (Lowry et al., 1951) per lettore di micropiastre. Questo saggio presenta due fasi distinte. Nella prima fase gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$  presenti nel reattivo reagiscono in ambiente basico con i legami peptidici  $\text{CO-NH}_2$ , poiché la reazione necessita di almeno due gruppi  $\text{CO-NH}_2$  questa non può avvenire con singoli amminoacidi, ma è specifica per polipeptidi e proteine. Durante la seconda fase il complesso formato dallo ione rame legato alla proteina riduce gli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico presenti nel reattivo di Folin a blu di tungsteno e blu di molibdeno. Questa metodologia necessita della preparazione di un bianco, cinque standard, ed infine dei campioni in soluzione con NaOH 1N. La preparazione degli standard è fatta seguendo una diluizione in serie fino ad ottenere standard con appropriate concentrazioni di albumina serica bovina (BSA, Sigma). Per l'esperimento è stata utilizzata una soluzione madre di albumina a concentrazione 0.5 mg/ml. Le concentrazioni finali degli standard in ordine crescente di concentrazione (std5>std4>std3>std2>std1) erano rispettivamente: 10 µg, 7.5 µg, 5 µg, 2.5 µg, 1 µg. Alla micropiastre sono stati aggiunti ddH<sub>2</sub>O, quindi NaOH, gli standard ed infine i campioni, mantenendo le proporzioni come da protocollo. È stata aggiunta la soluzione A+B (soluzione di fase I) e si è fatta partire la lettura. Al tempo segnalato dal lettore (10 minuti) è aggiunta la soluzione C (reattivo di Folin, Sigma) e si è attesa la fine della lettura (30 minuti).

### 3.7 ANALISI STATISTICA

Per valutare la variabilità dei  $C_T$  dei prodotti genici candidati a controlli endogeni e per l'analisi dell'attività di trasporto MXR, i dati sono stati analizzati mediante test ANOVA a 1-via non parametrico (test di Kruskal-Wallis) seguito dal Mann-Whitney U-test. Queste analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SigmaPlot v.12 (Systat Software). Le differenze sono considerate statisticamente significative per  $p < 0.05$ .

L'espressione relativa dei prodotti genici da noi esaminati durante lo sviluppo larvale è stata calcolata tramite  $\Delta\Delta C_T$  utilizzando il software StepOne (Life Technologies). I dati sono riportati come espressioni relative (*fold change*) rispetto allo stadio di oocita fertilizzato (30 minuti post-fertilizzazione) per la valutazione dell'espressione basale in condizioni fisiologiche. In seguito al trattamento con propranololo e carbamazepina, i dati sono riportati, invece, come espressioni relative rispetto al controllo di ciascuno stadio larvale. I dati di RT-PCR sono stati infine esaminati statisticamente utilizzando il software REST. Questo strumento è creato appositamente per eseguire confronti a coppie nei dati di RT-PCR attraverso tecniche di randomizzazione.

L'analisi di ordinamento (effettuata tramite PCO, *Principal Coordinates*) e clustering delle espressioni basali dei trascritti negli stadi larvali è stata eseguita utilizzando il software PRIMER v6 (PRIMER-E Ltd, UK; Anderson et al. 2008). Questo software impiega variazioni dei trascritti target, espresse come fold change con trasformazione logaritmica, per calcolare matrici di similarità basate sulla distanza euclidea (999 permutazioni). Utilizzando il software Gene Cluser v2.0 (Elisen et al., 1998) è stata creata una mappa di calore (*heatmap*) che descrive il profilo trascrizionale generale. Per la visualizzazione cluster è stato utilizzato il software TreeView. La similarità è stata misurata tramite distanza euclidea.

## (4) RISULTATI

### 4.1 GENI DI RIFERIMENTO

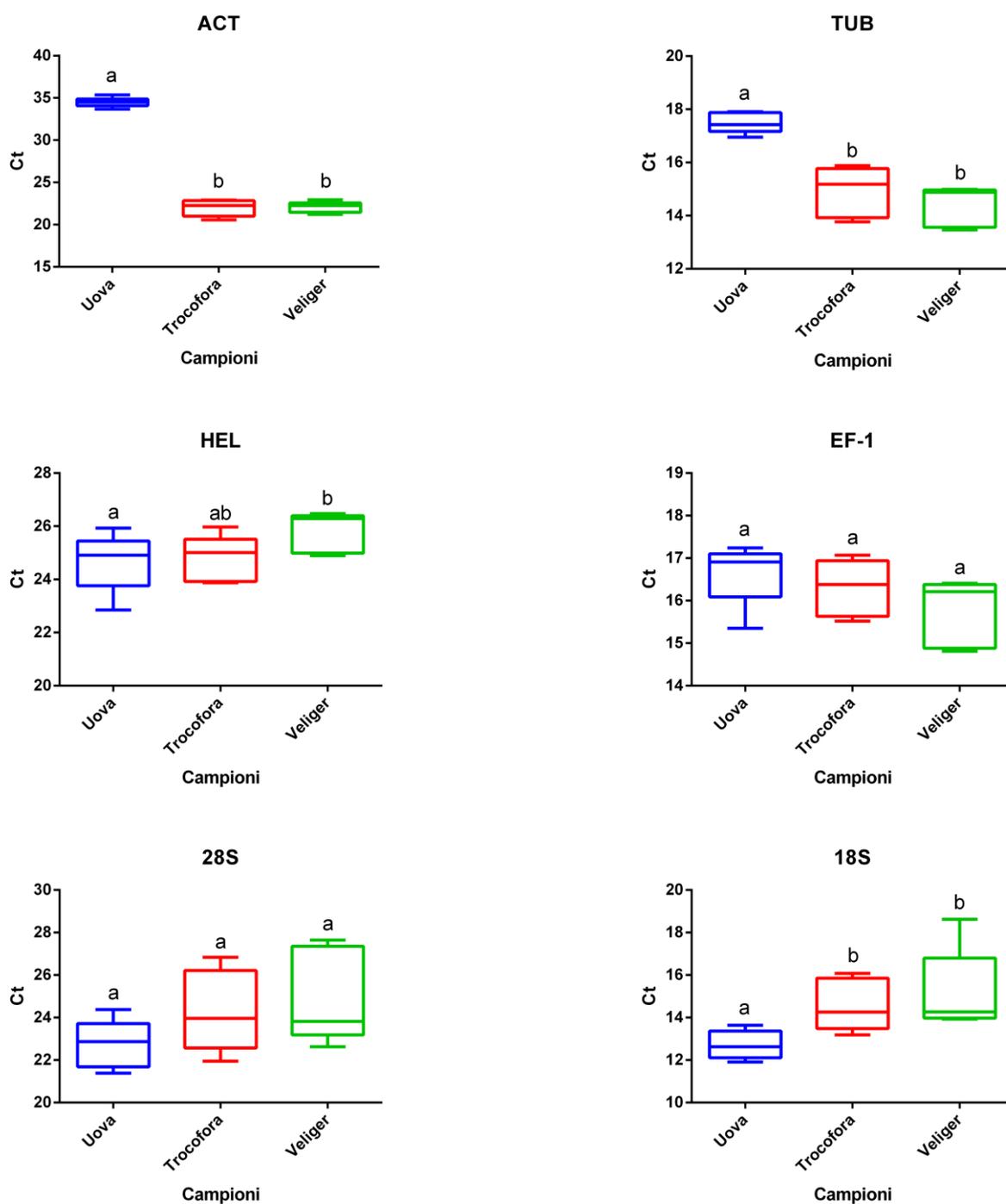
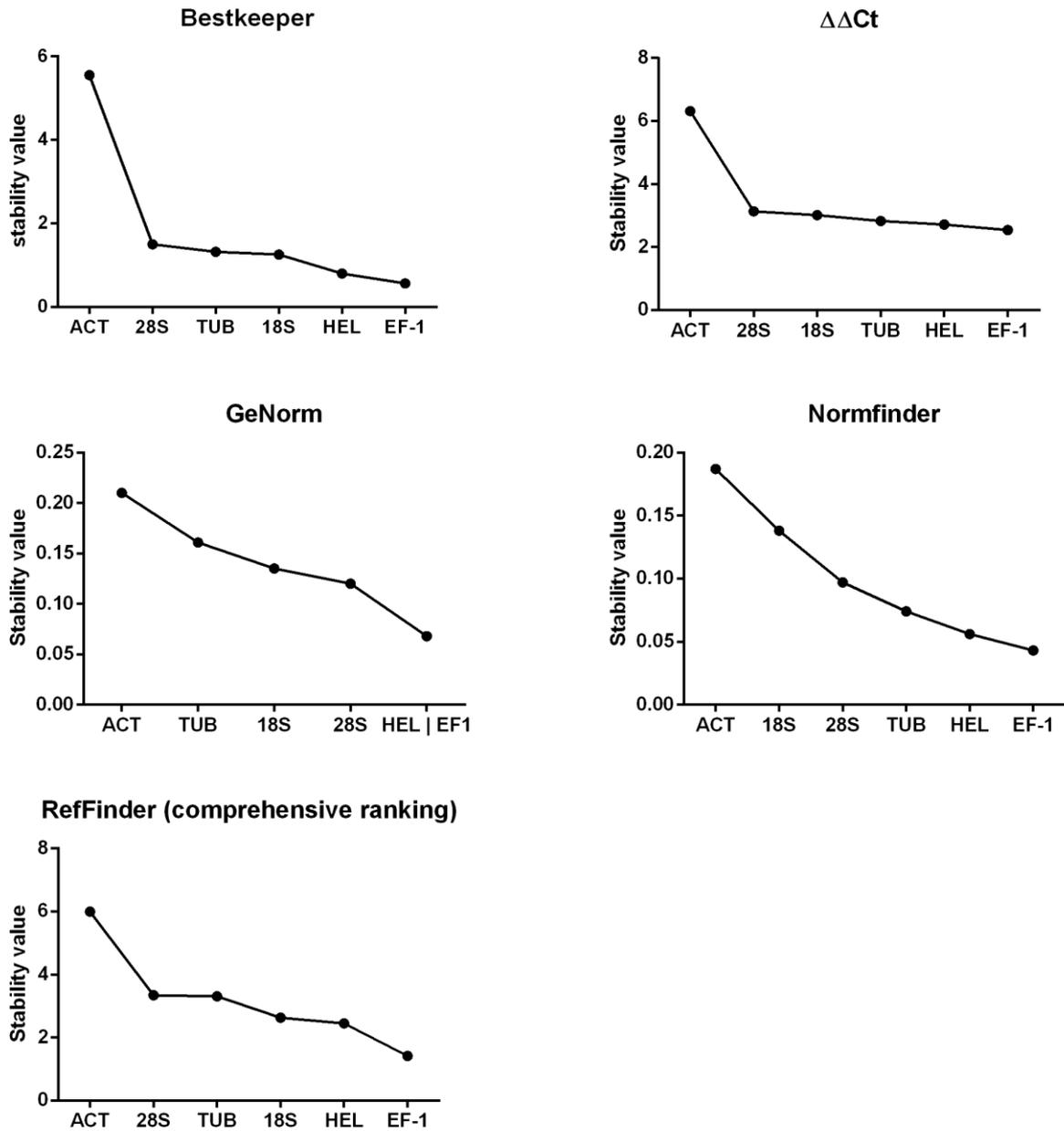


Figura 7 - I sei grafici box and whiskers sopra raffigurati mostrano, per ogni prodotto genico di riferimento candidato, i valori medi di CT nei tre stadi larvali. I dati sono basati sui valori dei cicli soglia ( $C_T$ ) dei possibili trascritti di riferimento isolati negli organismi ai tre differenti stadi di sviluppo. A lettere diverse corrispondono medie statisticamente differenti ( $p < 0.05$ ).

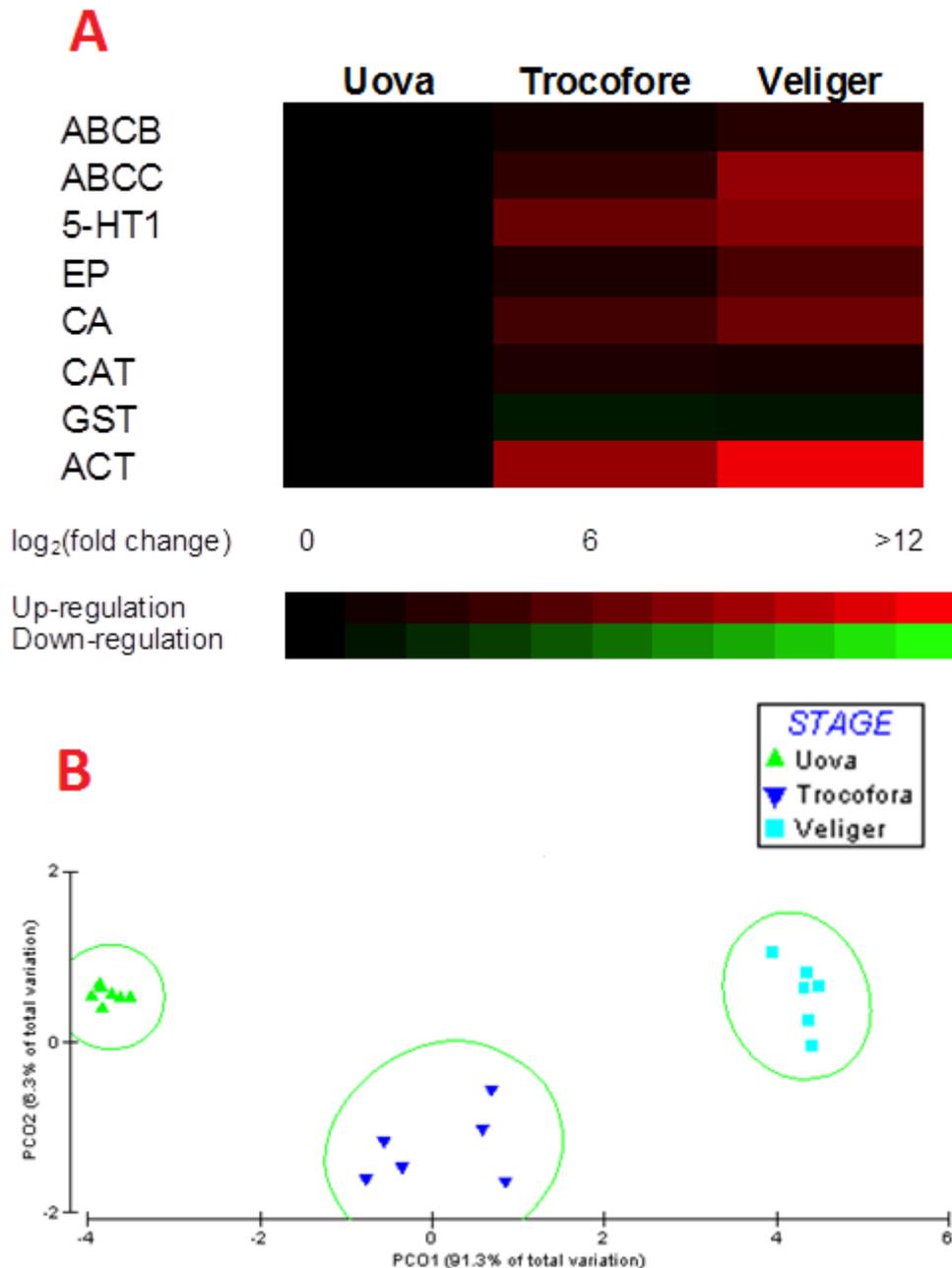


**Figura 8 - I grafici sopra raffigurati mostrano, per ogni algoritmo utilizzato, i valori di stabilità (*stability value*) dei prodotti genici di riferimento candidati.** Ogni grafico è ordinato in senso decrescente di *stability value*, quindi in senso crescente di stabilità, da sinistra verso destra.

I dati sono basati sui valori di stabilità restituiti dagli algoritmi come *stability value*. A *stability value* maggiori corrisponde minor stabilità dei geni di riferimento nei tre stadi di sviluppo del mitilo, mentre, a *stability value* minori, corrisponde maggior stabilità dei trascritti. Dallo studio effettuato è risultato che *HEL / EF-1* è la coppia più stabile durante gli stadi di sviluppo considerati. Si è quindi deciso di utilizzare questi due geni come riferimento per la normalizzazione in tutte le analisi di espressione genica in seguito effettuate.

## 4.2 ESPRESSIONE GENI TARGET

Valutazione dell'espressione basale dei geni target durante lo sviluppo larvale del mitilo:

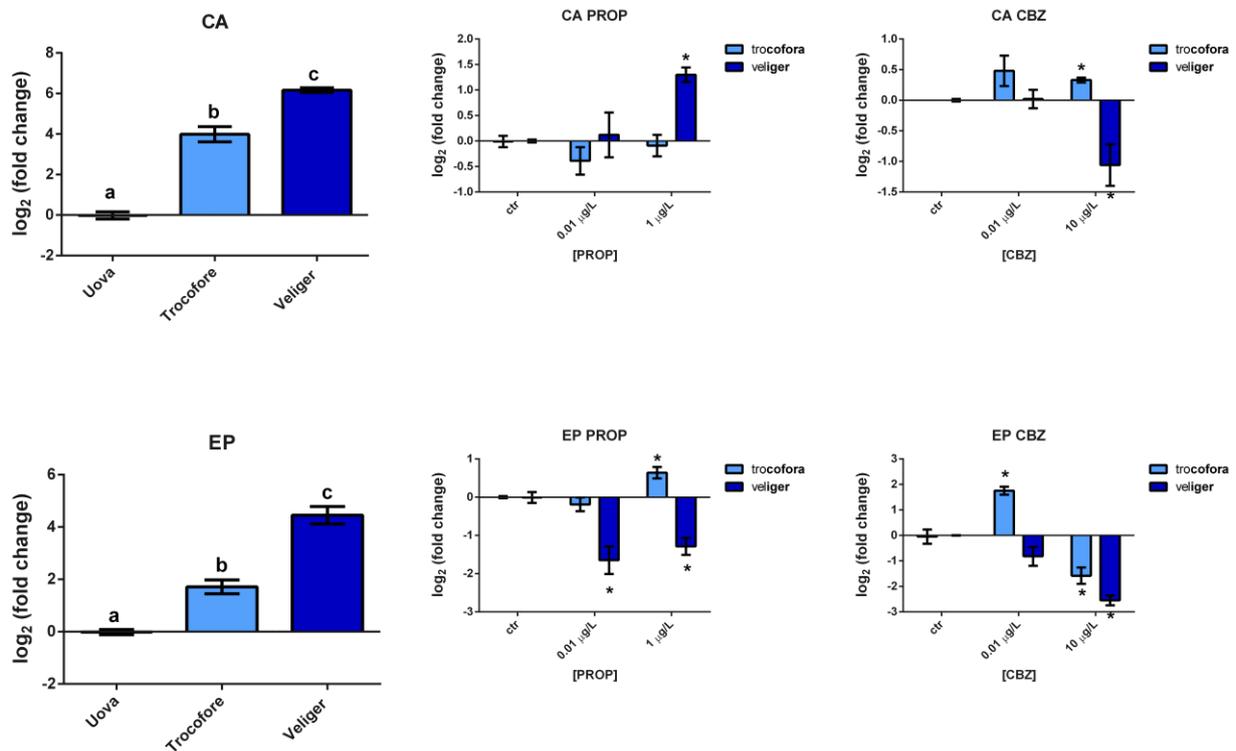


**Figura 9** – In figura sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione basale dei geni target durante lo sviluppo larvale. (A) *Heatmap* raffigurante sovraregolazione (*up-regulation*) e sottoregolazione (*down-regulation*) di ciascun trascritto genico rispetto al controllo (uova fertilizzate) nelle tre fasi di sviluppo analizzate. (B) Visualizzazione cluster dei risultati ottenuti tramite PCO. Sono presenti due coordinate principali che, assieme, spiegano il 97.6% della variazione.

Per meglio confrontare le generali risposte trascrizionali fra i datasets, le variazioni dei trascritti (esprese come fold change con trasformazione log<sub>2</sub>) fra uova fertilizzate vs trocofore o veliger (figure 10-14) sono state sottoposte a *cluster analysis* e *ordination analysis* utilizzando una

procedura di estrazione PCO (fig. 9). L'espressione basale dei trascritti ha mostrato evidenti variazioni nel tempo durante gli stadi di sviluppo larvale, con un trend generale di sovraregolazione (fig. 9A), ad eccezione di *GST*, il quale è risultato sottoregolato, sia allo stadio di trocofora che allo stadio di veliger, rispettivamente alle uova (fig. 14). L'analisi PCO (fig. 9B) ha mostrato due coordinate principali (PCO1 e PCO2) le quali spiegano circa il 97% della varia variabilità (rispettivamente 89.8% e 5.8%). I campioni relativi alle uova fertilizzate si presentano come un unico gruppo evidentemente separato da quelli appartenenti a trocofore e veliger che, a loro volta, formano cluster ben distinti.

### Biominerizzazione:

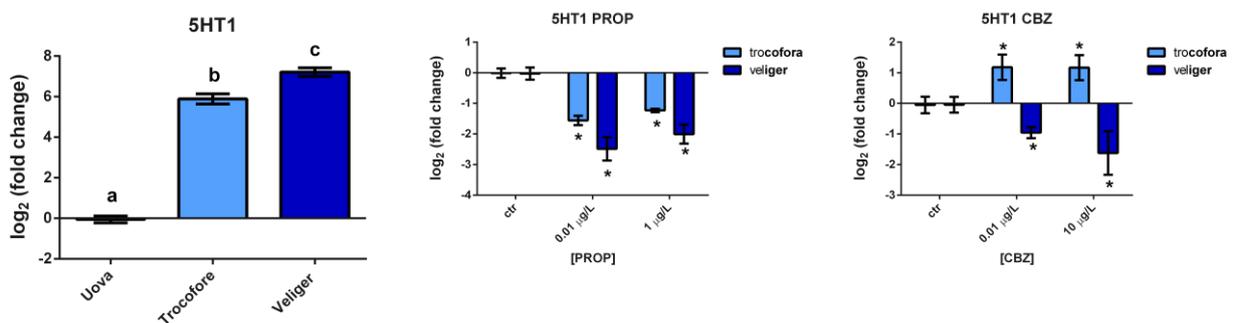


**Figura 10 – Nei grafici riportati sopra è mostrato il livello di espressione, basale e con i farmaci propranololo e carbamazepina, dei geni codificanti per *CA* (in alto) ed *EP* (in basso).** Per una più facile comprensione dei grafici è stata effettuata la trasformazione logaritmica dei dati, espressi come *fold change* (misura della differenza di espressione di un trascritto tra due condizioni sperimentali) ± SEM. A lettere differenti ed agli asterischi corrispondono medie statisticamente significative (p<0.05).

L'espressione basale del gene codificante per l'enzima anidraasi carbonica (*CA*, fig. 10) aumenta in modo significativo ad ogni stadio. Allo stadio di trocofora, l'espressione ha mostrato un incremento significativo a seguito del trattamento con carbamazepina (CBZ) 10 µg/L, mentre nessuna variazione è risultata statisticamente rilevante a seguito del trattamento con propranololo (PROP).

Nel veliger, la modulazione dell'espressione genica di *CA* con ha portato ad un aumento di espressione alla concentrazione 1  $\mu\text{g/L}$ , mentre, a seguito della somministrazione di CBZ 10 $\mu\text{g/L}$ , si è manifestata una sottoespressione rispetto al controllo. Come nel caso di *CA*, anche l'espressione basale del gene codificante per la proteina extrapalliale (*EP*, fig. 10) aumenta con il progredire dello sviluppo. Nella trocofora, la modulazione da parte del PROP comporta una sovraespressione alla concentrazione più alta (1 $\mu\text{g/L}$ ), mentre la presenza di CBZ ha portato alla sovraespressione nel trattamento a concentrazione 0.01  $\mu\text{g/L}$  ed alla sottoespressione nel trattamento a concentrazione 10 $\mu\text{g/L}$ . Allo stadio di veliger, la modulazione da parte di entrambi i farmaci, comporta la sottoespressione del trascritto *EP* ad entrambe le concentrazioni testate di PROP ed alla concentrazione maggiore di CBZ.

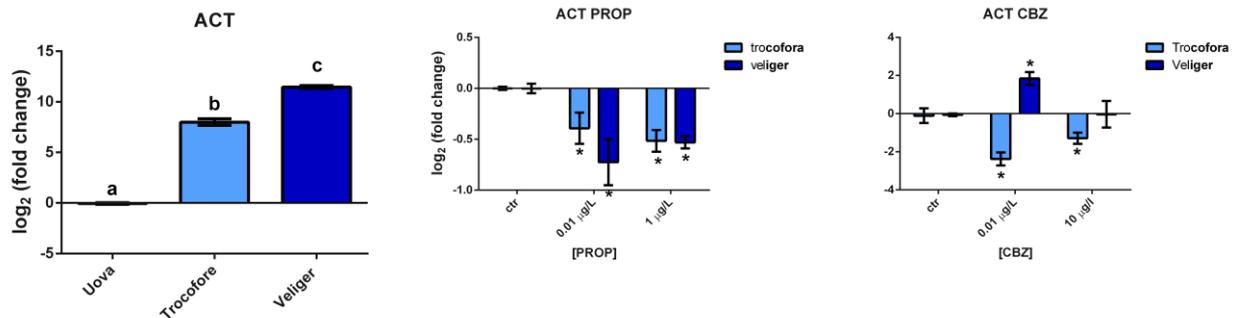
### Recettore della serotonina 5-HT<sub>1</sub>:



**Figura 11 -** Nei grafici riportati sopra è mostrato il livello di espressione, basale e in presenza dei farmaci propranololo e carbamazepina, del gene codificante il trascritto 5-HT<sub>1</sub>. Per una più facile comprensione dei grafici è stata effettuata la trasformazione logaritmica dei dati, espressi come *fold change* (misura della differenza di espressione di un trascritto tra due condizioni sperimentali)  $\pm$  SEM. A lettere differenti ed agli asterischi corrispondono medie statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

L'espressione del gene codificante per il recettore della serotonina 5-HT<sub>1</sub> (fig.11) mostra evidenti e significative differenze nel progredire dello sviluppo; in particolare, il passaggio allo stadio di trocofora comporta un aumento di circa 60 volte l'espressione nell'ovocita fecondato. La modulazione dell'espressione da parte del PROP è evidente ad entrambe le concentrazioni testate (0.01  $\mu\text{g/L}$  e 1 $\mu\text{g/L}$ ) poiché causa infatti una notevole sottoespressione sia allo stadio di trocofora che di veliger. La somministrazione di CBZ causa invece differenti variazioni di espressione nei due stadi: nella trocofora l'espressione aumenta significativamente ad entrambe le concentrazioni; nel veliger invece, alle stesse concentrazioni, il trascritto relativo al recettore 5-HT<sub>1</sub> risulta sottoespresso.

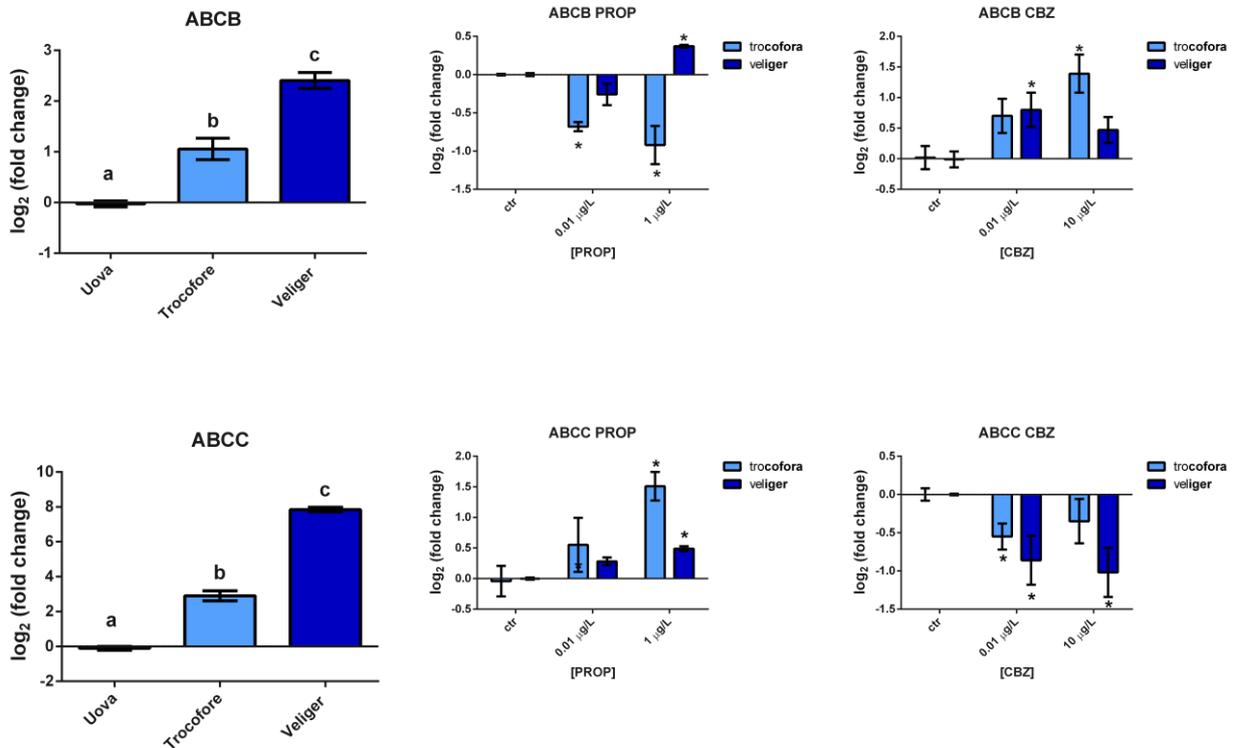
## Actina:



**Figura 12 -** Nei grafici riportati sopra è mostrato il livello di espressione, basale e in presenza dei farmaci propranololo e carbamazepina, del gene codificante il trascritto *ACT*. Per una più facile comprensione dei grafici è stata effettuata la trasformazione logaritmica dei dati, espressi come *fold change* (misura della differenza di espressione di un trascritto tra due condizioni sperimentali)  $\pm$  SEM. A lettere differenti ed agli asterischi corrispondono medie statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

L'espressione basale del gene codificante la proteina strutturale actina (fig.12) mostra visibili variazioni durante lo sviluppo, con medie significativamente differenti nei tre stadi. Il trend generale vede crescere l'espressione nel progredire delle fasi che, già al passaggio allo stadio di trocofora, mostra un'espressione 250 volte maggiore rispetto a quella delle uova, ed aumenta ulteriormente nel passaggio allo stadio di veliger. Dopo l'esposizione al PROP, è evidente la sottoespressione, in entrambi gli stadi, sia alla concentrazione 0.01 µg/L che alla concentrazione 1 µg/L. In seguito alla somministrazione di CBZ, il gene codificante la proteina strutturale ACT viene sottoespresso ad entrambe le concentrazioni allo stadio di trocofora; allo stadio di veliger, vi è sovraespressione alla concentrazione 0.01 µg/L.

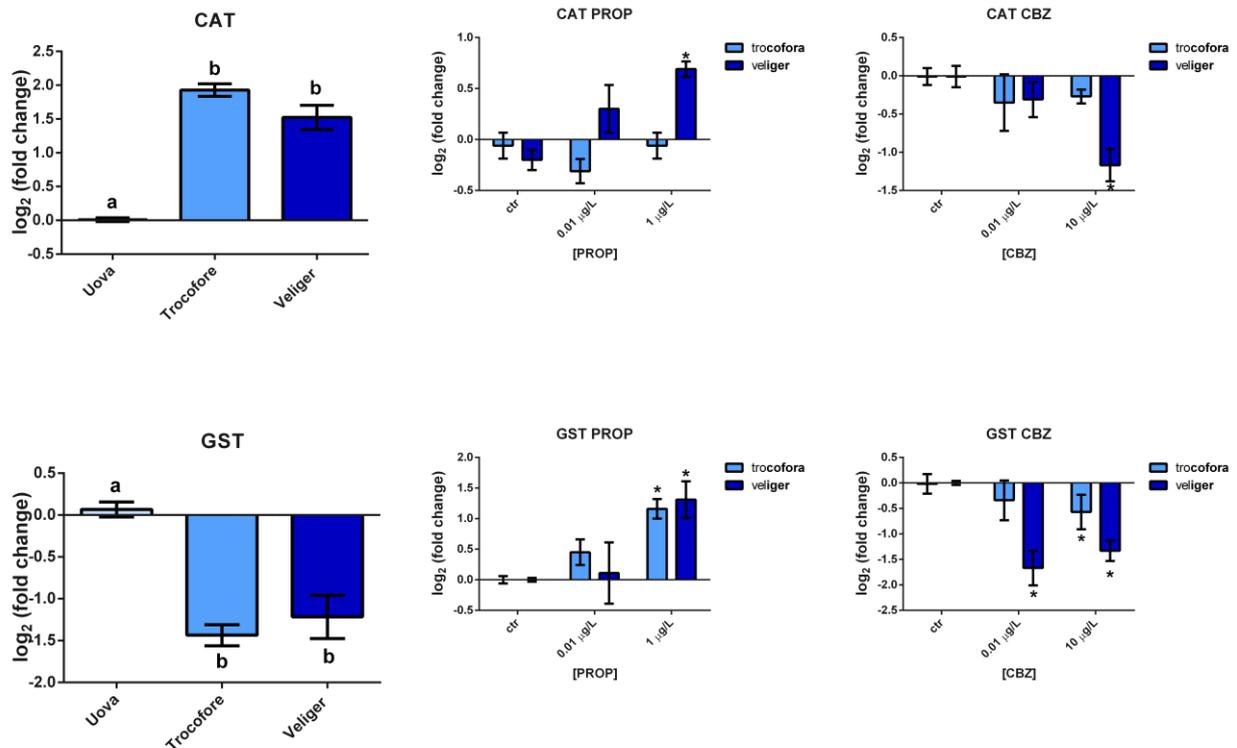
## Trasportatori di membrana:



**Figura 13** - Nei grafici riportati sopra è mostrato il livello di espressione, basale e in presenza dei farmaci propranololo e carbamazepina, dei geni codificanti per *ABCB* (in alto) ed *ABCC* (in basso). Per una più facile comprensione dei grafici è stata effettuata la trasformazione logaritmica dei dati, espressi come *fold change* (misura della differenza di espressione di un trascritto tra due condizioni sperimentali)  $\pm$  SEM. A lettere differenti ed agli asterischi corrispondono medie statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

L'espressione del gene codificante per la proteina P-gp (*ABCB*, fig. 13), cresce con il progredire dello sviluppo, mostrando medie significativamente differenti ad ogni stadio. Dopo la somministrazione di PROP, lo stadio di trocofora mostra sottoespressione di *ABCB* ad entrambe le concentrazioni esaminate; nel veliger invece, l'espressione aumenta alla concentrazione di 1  $\mu\text{g/L}$ . Dopo il trattamento con CBZ, alla concentrazione di 0.01  $\mu\text{g/L}$  si ha sovraespressione allo stadio di veliger, mentre, allo stadio di trocofora il gene codificante il trasportatore P-gp viene sovraespresso alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/L}$ . Come *ABCB*, anche *ABCC* (fig. 13), codificante la proteina Mrp, mostra medie statisticamente differenti ai diversi stadi di sviluppo, seguendo un andamento crescente. Il modulatore PROP causa un evidente incremento del livello di espressione, alla concentrazione più alta, sia sulla trocofora che sul veliger. La CBZ, al contrario, alla concentrazione di 0.01  $\mu\text{g/L}$  causa la sottoespressione in entrambi gli stadi, mentre, alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/L}$ , la sottoespressione è significativa esclusivamente nel veliger.

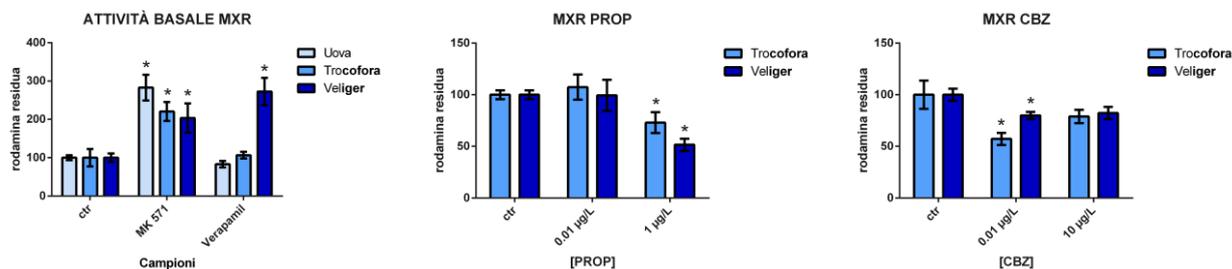
## Detossificazione:



**Figura 14 -** Nei grafici riportati sopra è mostrato il livello di espressione, basale e in presenza dei farmaci propranololo e carbamazepina, dei geni codificanti per i trascritti *CAT* (in alto) e *GST* (in basso). Per una più facile comprensione dei grafici è stata effettuata la trasformazione logaritmica dei dati, espressi come *fold change* (misura della differenza di espressione di un trascritto tra due condizioni sperimentali) ± SEM. A lettere differenti ed agli asterischi corrispondono medie statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

L'espressione basale del gene codificante l'enzima catalasi (*CAT*, fig.14) aumenta significativamente allo stadio di trocofora, per poi rimanere pressoché costante nel veliger. Nel veliger, l'espressione aumenta significativamente dopo l'esposizione al PROP a concentrazione 1 μg/L. Allo stesso stadio, dopo la somministrazione di CBZ a concentrazione di 10 μg/L, *CAT* appare sottoespresso. L'espressione del gene codificante l'enzima glutazione S-transferasi (*GST*, fig.14) mostra un evidente calo in seguito al raggiungimento dello stadio di trocofora. La somministrazione di PROP, alla concentrazione più alta testata, causa un incremento di espressione sia nella trocofora che nel veliger. È significativa anche la modulazione causata dal farmaco CBZ, la quale comporta, alla concentrazione 0.01 μg/L, la sottoespressione di *GST* nel veliger, ed alla concentrazione 10 μg/L, la sottoespressione in entrambi gli stadi.

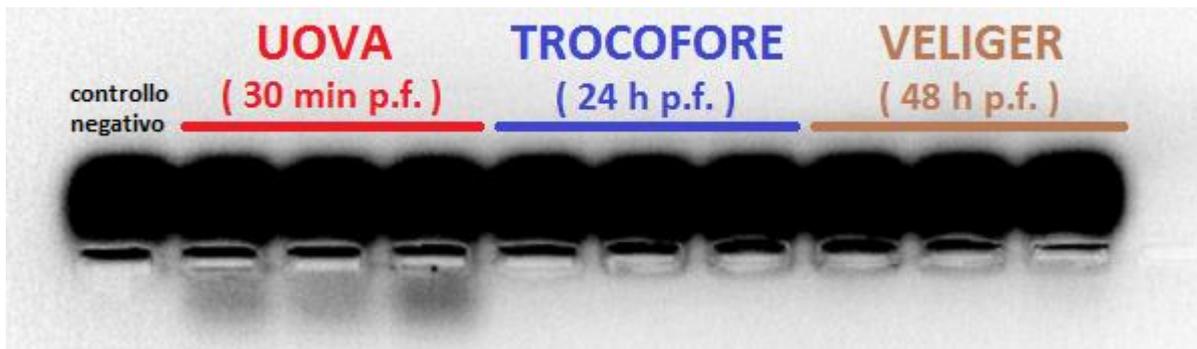
### 4.3 ATTIVITÀ DI RESISTENZA MULTIXENOBIOTICA



**Figura 15 - Nei grafici qui riportati viene mostrato l'accumulo di rodamina 123 (inversamente proporzionale all'attività del sistema MXR) in seguito all'esposizione dei campioni a differenti modulatori.** I valori sono espressi come percentuale rispetto al controllo per ogni stadio ( $\pm$  SEM). Nel primo grafico (sinistra) è messo in evidenza il contributo al sistema MXR del trasportatore Mrp, inibito tramite MK 571, e P-gp, inibito tramite verapamil. Nel secondo grafico (centro), è mostrato l'effetto del propranololo, alle concentrazioni 0.01 µg/L e 1 µg/L, negli stadi di trocofora e veliger. Nel terzo grafico (destra), viene mostrato l'effetto della carbamazepina, alle concentrazioni 0.01 µg/L e 10 µg/L, negli stadi di trocofora e veliger. Ai trattati contrassegnati con asterisco corrispondono differenze significative ( $p < 0.05$ ).

In figura 15 vengono mostrati i risultati ottenuti a seguito dello studio relativo all'attività del sistema MXR. Dal primo grafico (fig.15, sinistra) si evince il contributo del trasportatore Mrp, inibito dal modulatore MK 571, e del trasportatore P-gp, inibito dal modulatore verapamil. L'inibizione di Mrp causa un notevole incremento di rodamina residua in tutti gli stadi (ovocita fecondato, trocofora, veliger). L'inibizione di P-gp ha invece effetto esclusivamente sullo stadio di veliger. La sottoposizione degli embrioni a PROP mostra un effetto di stimolazione dell'attività MXR (minore rodamina residua intracellulare) su trocofora e veliger alla concentrazione di 1 µg/L. Come per il PROP, anche la CBZ alla concentrazione 0.01 µg/L comporta una maggior attività MXR allo stadio di trocofora e veliger.

#### 4.4 ATTIVITÀ DELLA PROTEIN-CHINASI A



**Figura 16 – Immagine raffigurante il risultato di una elettroforesi effettuata al fine di valutare l'attività dell'enzima protein-chinasi A.** Il peptide fosforilato, durante l'elettroforesi migra verso il polo positivo (verso il basso), mentre il substrato non fosforilato, come è mostrato dal controllo negativo, migra verso il polo negativo (verso l'alto). La presenza del peptide fosforilato dalla PKA è evidente esclusivamente nelle uova fertilizzate.

L'analisi dell'enzima protein-chinasi A (PKA, fig.16) ha mostrato la presenza di attività nelle uova. Non è stata evidenziata attività negli stadi di trocofora e di veliger. L'apparente assenza di attività può essere causata dalla bassa attività dell'enzima in trocofora e veliger, tale da non poter essere rilevabile attraverso la tecnica da noi utilizzata. In ogni caso è evidente la maggior attività allo stadio di ovocita fecondato.

## (5) DISCUSSIONE

Lo studio condotto è finalizzato all'ampliamento ed al perfezionamento delle conoscenze relative alla fisiologia della specie *Mytilus galloprovincialis*; in particolare è stato preso in esame l'aspetto più sensibile di questo organismo: lo sviluppo larvale. Il mitilo mediterraneo, come già detto precedentemente in questo elaborato, si riproduce tramite fecondazione esterna, a seguito della quale l'ovocita fecondato (~30 minuti post-fertilizzazione) passa attraverso più stadi prima di metamorfosare in un organismo giovanile. Lo sviluppo larvale è un processo continuo nel quale l'organismo è soggetto a drastici cambiamenti morfo-funzionali. Nel mitilo sia ha dapprima il passaggio dell'ovocita fecondato allo stadio di trocofora, che richiede circa 24 ore, quindi il passaggio da trocofora a veliger, che solitamente avviene nelle 24 ore successive. Lo studio svolto ha preso in esame i profili di espressione di importanti geni che sono coinvolti, direttamente o indirettamente, nel corretto sviluppo larvale, giocando ruoli chiave in una o più fasi di quest'ultimo. Nel mitilo la formazione della conchiglia, fondamentale struttura protettiva, ha inizio durante lo stadio di trocofora (Kniprath, 1981) e prosegue, accrescendosi, durante tutta la vita dell'organismo. Nell'ambito della biomineralizzazione, in questo studio si sono voluti analizzare i profili di espressione di geni codificanti per l'enzima anidrasi carbonica (CA) e per la proteina extrapalliale (EP), entrambi strettamente correlati alla formazione della conchiglia (Medakovic, 2000; Hattan et al., 2001). L'enzima CA catalizza una reazione che porta alla formazione di  $\text{HCO}_3^-$ ; quest'ultimo associandosi a ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , genera carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) che, nelle sue forme cristalline (calcite e principalmente aragonite), rappresenta la componente inorganica della conchiglia. La proteina EP, che è stata recentemente identificata, è molto concentrata nel fluido extrapalliale, dove, grazie alla presenza di particolari sequenze peptidiche leganti calcio, si auto-assembla in una serie di polimeri complessi capaci di modulare la deposizione del carbonato di calcio nella formazione della conchiglia. Le proteine EP si trovano allo stato naturale sotto forma di dimeri, ma, se in presenza di calcio, questi si assemblano per mezzo di drastici cambiamenti della struttura secondaria e di legami proteina-proteina formando una struttura complessa (Hattan et al., 2001). Dalle analisi molecolari effettuate tramite Real-Time PCR è risultato che, per entrambi i trascritti CA ed EP, l'espressione basale relativa aumenta durante il progredire dello sviluppo larvale (fig. 9A, fig. 10). Il trascritto CA è risultato essere 16 volte più espresso allo stadio di trocofora rispetto allo stadio di oocita, e questa differenza si evidenzia ancor più allo stadio di veliger, dove l'enzima è circa 64 volte più espresso rispetto all'ovocita fecondato. Secondo Medakovic (2000), l'attività di CA durante queste fasi è particolarmente elevata poco prima di ben determinati eventi: allo stadio di gastrula, poco prima della formazione del campo della conchiglia; allo stadio di trocofora, poco prima della formazione della ghiandola della conchiglia e del periostraco; ed infine prima della deposizione minerale per la

formazione delle conchiglie prodissoconca I e prodissoconca II. Generalmente, quando si entra in ambito di sviluppo e biomineralizzazione, lo stadio sul quale si focalizza maggiormente l'attenzione è quello di veliger, in quanto caratterizzato dalla presenza di una conchiglia precoce. Va notato però, che lo sviluppo larvale non è caratterizzato da passaggi discreti di fase in fase, bensì da un continuo progredire e specializzarsi di tessuti e cellule; di conseguenza, la caratteristica conchiglia presente allo stadio di veliger è il risultato di processi che trovano la loro origine già allo stadio di trocofora, o persino allo stadio di ovocita fecondato. Benché la formazione della conchiglia inizi già nelle primissime fasi di sviluppo, è immaginabile che l'azione dell'enzima CA venga sempre più richiesta nel suo progredire. Considerata la funzione di tale enzima e considerata la crescente richiesta di  $\text{CaCO}_3$  (quindi anche di  $\text{HCO}_3^-$ ) cui va incontro l'organismo mano a mano che la conchiglia va formandosi, il risultato da noi ottenuto concorda pienamente con l'idea che questo enzima svolga un ruolo sempre più marcato, con il progredire dello sviluppo, nella formazione e nella crescita della conchiglia. Concorde alla espressione di CA, è l'espressione basale relativa di EP (fig. 9A, fig. 10). Anche in questo caso è evidente la correlazione fra progresso larvale ed espressione del trascritto. Allo stadio di trocofora corrisponde una espressione 4 volte maggiore rispetto a quella dell'ovocita fecondato, mentre allo stadio di veliger, questa differenza supera le 16 volte. Come già detto, EP è strettamente correlato alla formazione della conchiglia e le sue funzioni, tuttora non pienamente note, comprendono il trasporto di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e la regolazione della deposizione dei cristalli (Yin et al., 2005). Stando a Kniprath (1977, 1980), il primo substrato organico target della deposizione di  $\text{CaCO}_3$  è formato allo stadio di trocofora, e porterà alla formazione di una iniziale conchiglia prodissoconca I, dall'aspetto granulare, la quale, allo stadio di veliger diverrà prodissoconca II. Dai risultati ottenuti, si evince che EP viene particolarmente espresso allo stadio di veliger, al quale corrisponde la fase di accrescimento della conchiglia, ma la sua espressione incrementa, anche se meno marcatamente, già allo stadio di trocofora. La sovraespressione allo stadio di trocofora del trascritto di una proteina che lega calcio, quale è EP, concorda con quanto osservato in bibliografia per cui è proprio in questo stadio che viene generato il primo tessuto utilizzabile come substrato per la biomineralizzazione. Oltre alle espressioni basali, per ogni gene è stata valutata la possibile regolazione dell'espressione da parte dell'AMP ciclico (cAMP). Per fare ciò i campioni sono stati trattati con due farmaci: propranololo (0.01  $\mu\text{g/L}$  e 1  $\mu\text{g/L}$ ) e carbamazepina (0.01  $\mu\text{g/L}$  e 10  $\mu\text{g/L}$ ), il cui *Mode of Action* (MoA) è noto nella specie non target *M. galloprovincialis* (Martin-Diaz et al., 2009; Franzellitti et al., 2013). Il propranololo (PROP) è un antagonista dei recettori  $\beta$ -adrenergici utilizzato come terapia per patologie cardiovascolari nell'uomo (Weir, 2009), ma agisce anche come antagonista dei recettori serotoninergici 5-HT<sub>1</sub> (Tierney, 2001). Il PROP, agendo come antagonista dei recettori  $\beta$ -

adrenergici, può occupare il loro sito di legame impedendone il legarsi con agonisti, che altrimenti causerebbero la stimolazione dell'adenilato ciclasi, bloccando quindi l'aumento di cAMP intracellulare. Qualora esplicasse la sua azione antagonista su recettori 5-HT<sub>1</sub>, che di norma causerebbero l'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi, l'assenza di inibizione comporterebbe livelli di cAMP intracellulari più elevati. Il farmaco antiepilettico carbamazepina (CBZ) causa, invece, la diretta inibizione dell'enzima adenilato ciclasi con conseguente blocco della sintesi di cAMP. È possibile quindi utilizzare questi due farmaci per valutare la modulazione dell'espressione a seguito del calo o dell'aumento di cAMP intracellulare. Dalle analisi da noi effettuate è messa in luce la possibile regolazione della trascrizione di *CA* ed *EP* tramite cAMP. La regolazione, da parte del cAMP, dell'espressione di trascritti codificanti per *CA* è stata già dimostrata in alcune delle numerose isoforme di questo enzima. Talune isoforme, sintetizzate in specifici tessuti, appaiono regolate positivamente dal cAMP (Dragon & Baumann, 2001), mentre altre sono regolate negativamente (Mardones et al., 2014) o non regolate in alcun modo attraverso questa via (Marino, 1993). Dai risultati, mostrati in figura 10, si può ipotizzare che nel mitilo mediterraneo la trascrizione di *CA* sia sotto controllo del cAMP. In particolare la presenza di PROP 1 µg/L causa la sovraespressione del trascritto, mentre la presenza di CBZ a 10 µg/L, causa la sua sottoespressione. Come già accennato, il PROP può agire sui livelli di cAMP in modo differente in base al recettore con cui interagisce, perciò la sua azione dipende essenzialmente dal controllo, adrenergico o serotoninergico, predominante nella cellula (Franzellitti et al., 2011). È possibile che il PROP, legandosi a recettori 5-HT<sub>1</sub> e bloccando l'inibizione dell'adenilato ciclasi, causi l'accumulo di cAMP e questo porti ad una maggior espressione di *CA*. In linea con questa ipotesi, a seguito della somministrazione di CBZ, che causa inibizione dell'adenilato ciclasi ed il calo di cAMP intracellulare, l'enzima risulta sottoespresso. Ne consegue che è plausibile la regolazione positiva di *CA* da parte del cAMP anche in questo organismo. Similmente, anche l'espressione di *EP* sembra essere regolata tramite cAMP ma, essendo *EP* una proteina di recente identificazione, non sono disponibili in letteratura dati circa la sua regolazione a supporto di questa ipotesi; inoltre i dati da noi ottenuti non danno una chiara idea di come questo controllo sia esercitato. Più in generale, i risultati ottenuti ci indirizzano verso l'ipotesi che la biomineralizzazione sia sotto controllo neuroendocrino.

I recettori 5-HT di mammifero sono suddivisi in classi distinte (5-HT<sub>1,2,..7</sub>). Alcuni di questi recettori sono associati alla attivazione di proteine G<sub>i</sub> e alla conseguente inibizione dell'enzima adenilato ciclasi, mentre altri esplicano il loro effetto stimolando l'afflusso di Ca<sup>2+</sup>. Studi filogenetici hanno mostrato una precoce divergenza evolutiva delle famiglie di recettori 5-HT in tre distinte sottoclassi: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>6</sub> (Peroutka & Howell, 1994). Questa divergenza è avvenuta prima

della separazione fra vertebrati ed invertebrati; è quindi possibile che in questi ultimi siano presenti uno o più membri di queste sottoclassi (Peroutka, 1994). È stato dimostrato, tramite studi sia funzionali che molecolari sui recettori 5-HT di mollusco, che i sottotipi 5-HT<sub>1</sub> nei molluschi come nei vertebrati, sono negativamente accoppiati alla via cAMP-dipendente (Angers et al., 1998; Sugamori et al., 1993). Dalle analisi molecolari effettuate è risultato che l'espressione basale del gene codificante il recettore 5-HT<sub>1</sub> aumenta drasticamente durante il progredire dello sviluppo larvale (fig. 9A, fig.11). Il recettore è risultato essere ~64 volte più espresso allo stadio di trocofora rispetto allo stadio di oocita, e la differenza è ancor più marcata raggiunto lo stadio di veliger, dove il trascritto è risultato essere ~130 volte più espresso rispetto a quello di ovocita fecondato. La trasduzione del segnale affidata ai recettori 5-HT<sub>1</sub> appare quindi di notevole importanza durante lo sviluppo di questo organismo. L'aumento di recettori della serotonina a raggiungimento dei primi stadi larvali concorda con ciò che già è noto sul fondamentale ruolo chiave che questa molecola gioca negli invertebrati, agendo sull'assorbimento di sostanze nutritive e sul metabolismo (Tierney, 2001; Fabbri & Capuzzo, 2010). È stato dimostrato che nei mitili, lo stadio di trocofora è caratterizzato dal controllo serotoninergico, mentre il controllo adrenergico compare solo allo stadio di veliger (Voronezhskaya et al., 2008). È stato riscontrato, nei mammiferi, un possibile adattamento alla somministrazione di farmaci agonisti ed antagonisti della serotonina tramite regolazione dell'espressione di recettori 5-HT (Teufel-Mayer & Gleitz, 1997; Reuter et al., 2004; Subhash et al., 2000). Considerando che, in questo studio, i modulatori PROP e CBZ sono stati somministrati subito dopo la fecondazione dell'ovocita, è plausibile che la loro presenza comporti *upregulation* o *downregulation* precoce di 5-HT<sub>1</sub>. I dati mostrati in figura 11 a seguito dei trattamenti con i modulatori farmaceutici PROP e CBZ sembrano indirizzare verso una possibile sottoregolazione di 5-HT<sub>1</sub> in presenza di PROP anche a basse concentrazioni. È probabile che il PROP, esplicando la sua azione sui recettori serotoninergici, comporti alterazioni nelle vie di segnalazione intracellulare tali da far sottoesprimere il gene che codifica per il recettore 5-HT<sub>1</sub> stesso negli organismi trattati. Data la attuale assenza di studi sulla caratterizzazione e funzionalità di recettori adrenergici nei molluschi, non è possibile valutare con chiarezza in che modo questa sottoespressione si realizzi. Il trattamento con CBZ ha invece mostrato un interessante cambio di regolazione fra lo stadio di trocofora, dove 5-HT<sub>1</sub> viene sovraespresso, e veliger, dove risulta sottoespresso. È plausibile che questo trattamento abbia provocato l'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi, ed essendo l'adenilato ciclasi anche target dell'azione inibitoria del recettore, ne comporti la sottoespressione, in quanto la richiesta della sua azione è probabilmente minore. Se ciò fosse vero dovremmo però osservare lo stesso comportamento allo stadio di trocofora, ma ciò non

accade. È quindi possibile che vi siano anche altri meccanismi la cui azione cumulativa porti ad una differente regolazione nei due stadi.

Molte funzioni cellulari si generano grazie alle peculiari capacità delle proteine strutturali di elaborare complesse strutture quali citoscheletro e cilia. In questo studio si è voluto valutare il profilo di espressione del gene codificante la proteina actina (*ACT*), responsabile di molteplici funzioni, dalla contrazione muscolare al direzionamento del trasporto interno alla cellula, finanche a donare alla cellula la capacità di cambiare forma. Diversi studi hanno mostrato che nel mitilo, le prime strutture muscolari si formano allo stadio di trocofora e vengono completate più tardi nello stesso stadio o in quello di veliger, nel quale compare anche la muscolatura striata (Odintsova et al., 2007; Dyachuk & Odintsova, 2009). Dai risultati delle analisi molecolari (fig. 9A, fig. 12) si osserva che l'espressione basale del trascritto *ACT* cresce enormemente con il passaggio allo stadio di trocofora (più di 130 volte). Quando lo sviluppo raggiunge lo stadio di veliger, l'espressione sale ulteriormente (più di 2000 volte rispetto alle uova). È evidente che lo sviluppo dell'organismo necessita di maggiori concentrazioni di questa proteina per far fronte alla comparsa di strutture e tessuti specifici (es. tessuto muscolare), fino al raggiungimento dello stadio adulto, dove la sua espressione rimane pressoché costante nel tempo (Cubero-Leon et al., 2012). In figura 12 sono anche mostrati i risultati relativi alla modulazione dell'espressione di *ACT* da parte di PROP e CBZ. Il letteratura è riportato che la presenza di antagonisti della serotonina causa ritardi nello sviluppo, mentre la somministrazione di serotonina comporta la specializzazione cellulare (Renaud et al., 1983; Couper & Leise, 1996; Pennati et al., 2001). Dai nostri risultati si evince che la presenza di PROP comporta minor espressione di *ACT*. Questo potrebbe essere causa diretta della sua capacità di agire come antagonista dei recettori 5-HT, capace quindi di ritardare lo sviluppo ed il differenziamento delle cellule. Un eventuale ritardo nello sviluppo degli organismi trattati con PROP, rispetto a quelli non trattati, può quindi essere correlato ai livelli minori di espressione. Il trattamento con CBZ mostra una generale sottoregolazione dell'espressione di *ACT* allo stadio di trocofora, mentre, allo stadio di veliger, sembra essere presente sovraregolazione, ma alla sola concentrazione di 0.01 µg/L. È possibile che gli effetti riscontrati nei trattamenti con questo farmaco siano dovuti alla sua azione sulla via cAMP/PKA mostrati in precedenza. L'inibizione dell'enzima adenilato ciclastasi causa un calo di concentrazione di cAMP, senza il quale l'enzima PKA non viene attivato. È noto che questo enzima svolge molteplici funzioni, anche in ambito citoscheletrico, interagendo con la proliferazione dell'actina e perfino con la sua capacità di trasporto intracellulare (Howe, 2004). Non possiamo escludere, tuttavia, che la CBZ induca altri effetti, non correlati a quanto noto circa il suo meccanismo d'azione.

Come accennato precedentemente in questo scritto, i mitili sono organismi caratterizzati da una sorprendente resistenza ad agenti inquinanti e tossici. Numerose sostanze dannose si possono accumulare all'interno dell'organismo come conseguenza della filtrazione, necessaria sia per fini alimentari che respiratori. Per far fronte a tali sostanze, il mitilo presenta diversi meccanismi di difesa. In questo studio si è voluto valutare e caratterizzare lo sviluppo del sistema MXR (*multixenobiotic resistance*) che, analogamente al sistema MDR (*multi-drug response*) dei vertebrati, estrinseca la propria azione citoprotettiva tramite trasportatori di membrana ABC. Nel mitilo è stata confermata la presenza di geni codificanti per P-gp ed Mrp (Cornwall et al., 1995). Questi trasportatori permettono l'efflusso di numerose sostanze xenobiotiche e dei metaboliti che si formano nel processo di sviluppo. Per caratterizzare il sistema MXR si è dapprima valutato il contributo dei due trasportatori in ogni stadio larvale. A tale scopo è stata analizzata l'attività del sistema negli organismi trattando ogni stadio di sviluppo con gli inibitori selettivi MK 571 (inibitore di Mrp) e Verapamil (inibitore di P-gp). I risultati, mostrati in figura 15, mettono in luce che lo stadio di ovocita fecondato è notevolmente inibito da MK 571, mentre il Verapamil non blocca l'attività del sistema MXR. Tutto ciò si traduce in un contributo da parte dei trasportatori Mrp al sistema MXR rappresentando plausibilmente circa il 100% della sua attività. Come nel caso delle uova, anche durante il secondo stadio di sviluppo (trocofora) non sembra essere presente alcun contributo significativo di P-gp, mentre Mrp rappresenta ancora una volta il principale trasportatore del sistema. Raggiunto lo stadio di veliger si può notare come i contributi relativi di Mrp e P-gp si equivalgano, indicandoci che all'azione del sistema MXR prendono parte entrambi i trasportatori ed in modo pressoché eguale. Concorde a quanto appena detto è il risultato (fig. 9A, fig. 13) dell'analisi molecolare relativa all'espressione basale dei trascritti *ABCB*, codificante per P-gp, e *ABCC*, codificante per Mrp. È stato osservato che, mentre il trascritto *ABCC* risulta espresso ad ogni stadio (dati quantitativi non riportati), *ABCB* risulta essere espresso a partire dallo stadio di trocofora, dove però la proteina codificata non è attiva o sintetizzata. Allo stadio di veliger il livello di espressione di *ABCB* è notevolmente incrementato ed il contributo della proteina all'attività MXR è evidente. Entrambi i trasportatori presentano un crescente livello di espressione con il progredire dello sviluppo, sintomo di perfezionamento e rafforzamento delle difese dell'organismo. A seguito del trattamento con PROP e CBZ sono state riscontrate variazioni sia sull'attività del sistema MXR in generale, che sui livelli di espressione dei trascritti. Il trattamento con PROP, sia nella trocofora che nel veliger, comporta un incremento di attività del sistema, mostrato in figura 15 come calo di accumulo di rodamina 123 intracellulare. Anche nel caso del trattamento con CBZ l'attività sembra aumentare, ma, sorprendentemente, alla concentrazione più bassa testata (0.01 µg/L). Nell'organismo adulto vi è una chiara modulazione dell'espressione di *ABCB* sia in seguito

alla somministrazione del  $\beta$ -bloccante PROP che dell'antiepilettico CBZ (fig.13). Questa modulazione è diretta causa dell'azione di questi farmaci sull'enzima adenilato ciclasi. L'adenilato ciclasi, se attivo, produce cAMP, il quale attiva l'enzima PKA che, oltre a catalizzare la fosforilazione di P-gp, ne promuove la sintesi attraverso l'attivazione di proteine correlate al cAMP (es. CREB, *cAMP response element-binding protein*) che a loro volta interagiscono con la regione promotore di del gene codificante *ABCB* (Franzellitti & Fabbri, 2013). Questa stretta correlazione non sembra però presente durante lo sviluppo larvale, infatti, il PROP, il cui effetto dipende dal recettore al quale si lega, non dovrebbe comportare un'inibizione dell'adenilato ciclasi e quindi regolare negativamente l'espressione di *ABCB* allo stadio di trocofora, nel quale, il controllo serotoninergico, appare predominante (Voronezhskaya et al., 2008). È necessario però puntualizzare che gli studi condotti sulla modulazione neuroendocrina sono basati su tecniche di immunistochimica con l'identificazione di fibre serotoninergiche e adrenergiche, e che la presenza delle sole fibre serotoninergiche non esclude necessariamente la presenza di recettori adrenergici. È importante considerare che la somministrazione di tali farmaci ad organismi in fase precoce di sviluppo può comportare, anche a concentrazioni relativamente basse, un'azione aspecifica su molteplici vie, soprattutto relative alla citoprotezione, e quindi portare a risultati ben differenti rispetto allo stesso organismo in fase adulta. La sottoespressione di *ABCC* modulata dalla CBZ è invece concorde con l'effetto di questo farmaco sull'organismo adulto. Nel mitilo adulto, l'espressione e la modulazione di *ABCC* varia in base al tessuto esaminato ma in generale appare correlata alla via di segnalazione a cascata cAMP/PKA; il blocco di questa via attraverso la somministrazione di CBZ, infatti, comporta sottoespressione di *ABCC* (Martin-Diaz et al., 2009). Dai nostri risultati si evince anche una chiara sovraespressione causata dal PROP, particolarmente evidente allo stadio di trocofora. Risultati simili sono stati riscontrati in precedenza negli emociti di *M.galloprovincialis*. Pur essendo stata ipotizzata la regolazione dell'espressione di *ABCC* mediante la via cAMP/PKA, l'intero meccanismo alla base della sua espressione non è noto nel mitilo mediterraneo, ed ancor meno nel corso del suo sviluppo; tale ambito è ancora oggetto di studi.

Il sistema MXR non è l'unica risorsa difensiva a disposizione del mitilo. Numerose altre vie collaborano ed interagiscono per rimuovere sostanze dannose o potenzialmente pericolose. Oltre al sistema MXR, in questo studio è stata valutata l'espressione di due enzimi chiave della protezione e detossificazione dell'organismo, catalasi (CAT) e glutatione S-transferasi (GST). La CAT contribuisce al riequilibrio dello stato ossidoriduttivo (redox) della cellula, catalizzando la reazione di scomposizione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) in acqua e ossigeno. Il perossido di idrogeno si forma in condizioni fisiologiche, ma la sua concentrazione aumenta in caso di alterazioni, e la sua presenza può comportare stress ossidativo e gravi danni su tutti i fronti cellulari (DNA, proteine,

membrane, ecc.), finanche la morte cellulare. L'analisi molecolare (fig. 9A, fig. 14) ha mostrato un aumento nei livelli di espressione del trascritto *CAT* al raggiungimento dello stadio di trocofora, dopo il quale i livelli di espressione rimangono costanti. La somministrazione del farmaco PROP, alla concentrazione di 1 µg/L, causa la sovraespressione di *CAT*. Tale sovraespressione può essere motivata dall'alterazione dello stato redox esercitata da questo farmaco, dimostrata dal calo della stabilità delle membrane lisosomiali (LMS) in altri studi (Franzellitti et al., 2011). L'attività della catalasi è particolarmente dipendente dalla concentrazione dell'agente stressante (Viarengo et al., 2007); ne consegue che l'azione di più vie protettive (es. *multixenobiotic resistance*), potrebbe non permettere un accumulo intracellulare di PROP sufficientemente alto da comportare una risposta trascrizionale, alle concentrazioni più basse. Come il PROP, anche la CBZ esplica un effetto sull'espressione di *CAT* alla sola concentrazione più alta testata. L'attività dell'enzima è nota seguire un andamento a campana, con una fase di crescita e quindi di decrescita all'aumento delle concentrazioni degli agenti inquinanti. È noto che la CBZ causa forte stress ossidativo nel mitilo adulto (Martin-Diaz et al., 2009). Nonostante vi siano studi che dimostrano possibili correlazioni fra sottoregolazione dell'espressione di trascritti codificanti per l'enzima *CAT* nell'uomo da parte di specie reattive dell'ossigeno (Venkatesan et al., 2007), non vi sono prove di un tale effetto nei mitili. La sottoespressione di *CAT* che è stata riscontrata nei veliger a 10 µg/L di CBZ potrebbe essere spiegata dalla sua inefficacia come antiossidante ad elevate concentrazioni intracellulari del suddetto farmaco, per cui vengono favorite altre vie citoprotettive più efficaci. Sarebbero necessari studi comprendenti un ampio set di biomarker per valutare se, e come, determinate vie siano preferenzialmente attivate. È inoltre da valutare la possibilità che l'enzima catalasi sia dipendente dalla segnalazione cAMP/PKA. Esistono infatti prove che la catalasi necessita di essere fosforilata dall'enzima PKA prima di poter estrinsecare la sua azione detossificante (Yano & Yano, 2002); non è quindi da escludere una possibile via di regolazione dell'espressione basata sulla disponibilità di PKA attivata. Come *CAT*, anche *GST* collabora alla detossificazione cellulare; in particolare quest'ultimo enzima è parte integrante della fase II di detossificazione, nella quale le molecole tossiche vengono biotrasformate, in questo caso tramite coniugazione al GSH, in composti più facilmente eliminabili dall'organismo. Come detto, *GST* catalizza la reazione di coniugazione di xenobiotici con il glutatione ridotto generando GS-X (molecole s-coniugate al glutatione). Curiosamente, i risultati delle analisi molecolari (fig. 9A, fig. 14) hanno mostrato un calo dell'espressione di *GST* al raggiungimento dello stadio di trocofora. Allo stadio di veliger la presenza di trascritti *GST* non varia rispetto a quello di trocofora. Nonostante ciò, trascritti dell'enzima *GST* sono comunque presenti e vengono notevolmente modulati dalla presenza dei farmaci PROP e CBZ (fig.14). La somministrazione di *PROP*, alla concentrazione più alta testata (1

$\mu\text{g/L}$ ) causa una notevole sovraespressione del trascritto *GST*. Questo risultato non sorprende; sappiamo infatti che la presenza di PROP può comportare un notevole incremento di attività dell'enzima GST (Franzellitti et al., 2011) e, probabilmente a causa della maggior sensibilità degli stadi larvali, anche della sua regolazione a livello trascrizionale. È interessante notare inoltre, che alla stessa concentrazione di PROP aumenta anche l'espressione del gene codificante per il trasportatore Mrp. È da tempo ipotizzato che Mrp lavori in sinergia con GST, in quanto si occupa prevalentemente di trasporto di molecole GSH-coniugate (Zaman et al., 1995). La stessa simmetria fra i livelli di espressione di *GST* e di *ABCC* si ritrova con il trattamento a base di CBZ. Qui, *GST* è risultato essere sottoespresso sia nel veliger che nella trocofora. È plausibile che vi sia una qualche sorta di controllo trascrizionale comune nei due geni. È altresì vero che numerose vie difensive concorrono alla difesa dell'organismo dagli xenobiotici, e che la sottoespressione di *GST* potrebbe essere complementare alla sovraregolazione di proteine relative a qualche altra via concorrente.

In questo studio si è cercato infine di analizzare l'attività dell'enzima PKA, la cui azione è di fosforilare proteine substrato, attivandole. La PKA è attivata dal cAMP ed è fondamentale alla segnalazione tramite il *pathway* cAMP/PKA. Tale via controlla innumerevoli funzioni cellulari e, come abbiamo già detto, anche la trascrizione di molteplici geni. Essa è strettamente correlata all'attività dell'enzima adenilato ciclasi ed è sotto il controllo del sistema neuroendocrino tramite i recettori adrenergici e serotoninergici. I saggi di attività da noi effettuati hanno portato a quanto mostrato in figura 16, che evidenzia una notevole attività della PKA nelle uova 30 min post fertilizzazione, mentre negli stadi seguenti essa non raggiunge livelli rilevabili tramite la metodologia da noi utilizzata. Ulteriori studi sono necessari per migliorare la sensibilità del metodo. Il risultato mostrato in figura potrebbe anche essere dovuto ad un altro fattore: la presenza di più subunità regolatrici. Nel mitilo sono state caratterizzate due subunità regolatrici della PKA, espresse in modo differente nei vari apparati, tessuti e cellule dell'organismo. È possibile che vi sia una variazione nella sintesi delle subunità regolatrici, nel passaggio dalle uova alle trocofore, ed è altrettanto possibile che il peptide da noi utilizzato non sia substrato di fosforilazione per la PKA dopo tale passaggio.

**In conclusione**, da un punto di vista generale possiamo dedurre che lo sviluppo larvale è un processo continuo in cui vi sono costanti cambiamenti fisiologici, infatti ogni stadio da noi analizzato è risultato essere estremamente differente dagli altri. Tale differenza è ancor più evidente se si osserva il risultato della cluster analysis riportato in figura 9. Tale grafico evidenzia con chiarezza che gli stadi sono estremamente differenti e caratterizzati da distinti livelli di espressione che, globalmente, aumentano con il procedere dello sviluppo. Grazie all'utilizzo dei farmaci PROP

e CBZ, qui utilizzati come modulatori, è stato possibile constatare che durante il suo sviluppo, il mitilo mediterraneo non presenta lo stesso tipo di regolazione della trascrizione riscontrabile nell'esemplare adulto; in particolare hanno necessità evidente di essere approfonditi e chiariti il contributo adrenergico e serotoninergico, ed anche la segnalazione intracellulare secondo la via cAMP/PKA. La maggior parte dei geni esaminati ha mostrato livelli di espressione crescenti nel tempo, ad eccezione del gene codificante l'enzima glutatione S-transferasi, la cui espressione sorprendentemente cala al raggiungimento dello stadio di trocofora. Ulteriori studi sono necessari e maggior interesse va rivolto allo sviluppo larvale del mitilo mediterraneo, ambito al momento ben poco esplorato.

## (6) BIBLIOGRAFIA

Abraham, I., Chin, K. V., Gottesman, M. M., Mayo, J. K., & Sampson, K. E. (1990). Transfection of a mutant regulatory subunit gene of cAMP-dependent protein kinase causes increased drug sensitivity and decreased expression of P-glycoprotein. *Experimental cell research*, 189(1), 133-141.

Anderson M, Gorley R, Clarke K (2008) PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods.

Angers, A., Storozhuk, M. V., Duchaine, T., Castellucci, V. F., & DesGroseillers, L. (1998). Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *The Journal of neuroscience*, 18(15), 5586-5593.

Arnaud, C., Saint-Denis, M., Narbonne, J. F., Soler, P., & Ribera, D. (2000). Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(1), 67-73.

Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., & Dondero, F. (2011). Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One*, 6(5), e18904.

Barcia, R., Ramos-Martí, J. I., & Villamarín, J. A. (1998). Purification of a Novel Isoform of the Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase from the Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 359(1), 57-62.

Bardales, J. R., Díaz-Enrich, M. J., Ibarra, I., & Villamarín, J. A. (2004). Isoforms of cAMP-dependent protein kinase in the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*: activation by cyclic nucleotides and effect of temperature. *Archives of biochemistry and biophysics*, 432(1), 71-78.

Barmo, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Olivieri, S., Bianchi, N., Gallo, G., & Canesi, L. (2011). Pleiotropic effects of hexavalent chromium (CrVI) in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Chemosphere*, 83(8), 1087-1095.

Bayne B. L., 1976, *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*, Cambridge University Press

Becker, Klensmith, Hardin, *Il mondo della cellula*, ed. EdiSES, 2006

- Bektas, M., Günçer, B., Güven, C., Nurten, R., & Bermek, E. (2004). Actin—an inhibitor of eukaryotic elongation factor activities. *Biochemical and biophysical research communications*, 317(4), 1061-1066.
- Cao, J., Fernández, M., Ramos-Martínez, J. I., & Antonio Villamarín, J. (1996). Identification of RII-binding proteins in the mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *FEBS letters*, 382(1-2), 93-96.
- Cao, J., Ramos-Martinez, J. I., & Villamarín, J. A. (1995). Characterization of a cAMP-Binding Protein from the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry*, 232(2), 664-670.
- Chambers, T. C., Pohl, J., Raynor, R. L., & Kuo, J. F. (1993). Identification of specific sites in human P-glycoprotein phosphorylated by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 268(7), 4592-4595.
- Che L.M., Golubic S., Le Campion-Alsumard T., Payri C., Developmental aspects of biomineralisation in the Polynesian pearl oyster *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*, *OCEANOL ACT*, 24, 2001, pp. S37-S49
- Chin, K. V., Chauhan, S. S., Abraham, I., Sampson, K. E., Krolczyk, A. J., Wong, M., ... & Gottesman, M. M. (1992). Reduced mRNA levels for the multidrug-resistance genes in cAMP-dependent protein kinase mutant cell lines. *Journal of cellular physiology*, 152(1), 87-94.
- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2011). Identification of reproduction-specific genes associated with maturation and estrogen exposure in a marine bivalve *Mytilus edulis*. *PloS one*, 6(7), e22326.
- Classics Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193, 265-275.
- Cornwall, R., Toomey, B. H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W. M., & Epel, D. (1995). Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxicology*, 31(4), 277-296.
- Couper, J. M., & Leise, E. M. (1996). Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *The Biological Bulletin*, 191(2), 178-186.
- Cox K. H., Angerer L. M., Lee J. J., Davidson E. H., Angerer R. C., Cell lineage-specific programs of expression of multiple actin genes during sea urchin embryogenesis, *J. Mol. Biol.* (1986) 188. 159-172

- Cubero-Leon E, Ciocan CM, Hill EM, Osada M, Kishida M, et al. (2010) Estrogens disrupt serotonin receptor and cyclooxygenase mRNA expression in the gonads of mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat Toxicol* 98: 178–187.
- Cubero-Leon, E., Ciocan, C. M., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2012). Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2728-2733.
- Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S. E., & Corsi, I. (2014). Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine environmental research*, 93, 56-63.
- Diaz-Enrich, M. J., Ibarguren, I., Hellman, U., & Villamari'n, J. A. (2003). Characterization of a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 416(1), 119-127.
- Dominguez R., Holmes K.C., Actin structure and function, *Annu Rev Biophys.* 2011 June 9; 40: 169–186
- 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(2), 259-270.
- Dragon, S., & Baumann, R. (2001). Erythroid carbonic anhydrase and hsp70 expression in chick embryonic development: role of cAMP and hypoxia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(3), R870-R878.
- Dyachuk, V., & Odintsova, N. (2009). Development of the larval muscle system in the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia). *Development, growth & differentiation*, 51(2), 69-79.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14863–14868. doi: 10.1073/pnas.95.25.14863
- Erlichman JS, Coates EL, Leiter JC (1994) Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> chemoreception in the pulmonate snail *Helix aspersa*. *Respir Physiol* 98:27–41
- F. Marin, G. Luquet, Molluscan shell proteins, *C. R. Palevol* 3 (2004), 6-7, 469-492.

- Fabbri, E., & Capuzzo, A. (2010). Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 313(4), 179-200.
- Fabbri, R., Montagna, M., Balbi, T., Raffo, E., Palumbo, F., & Canesi, L. (2014). Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine environmental research*, 99, 1-8.
- Fields P. A., Zuuow M. J., Tommanek L., Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. *Journal of Experimental Biology* (2012) 215: 1106-1116
- Fitzpatrick, P. J., Sheehan, D., & Livingstone, D. R. (1995). Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. *Marine Environmental Research*, 39(1), 241-244.
- Franzellitti, S., & Fabbri, E. (2013). Cyclic-AMP mediated regulation of ABCB mRNA expression in mussel haemocytes. *PloS one*, 8(4), e61634.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2013). The mode of action (MOA) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology*, 140, 249-256.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., & Fabbri, E. (2011). The  $\beta$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 101(2), 299-308.
- Franzellitti, S., Kiwan, A., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2015). Selection of best-performing reference gene products for investigating transcriptional regulation across silvering in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Scientific reports*, 5.
- Freeman JA (1960) Influence of carbonic anhydrase inhibitors on shell growth of freshwater snail *Physa heterostropha*. *Biol Bull* 118:412–418
- Geret, F., Serafim, A., & Bebianno, M. J. (2003). Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*?. *Ecotoxicology*, 12(5), 417-426.
- Hattan, S. J., Laue, T. M., & Chasteen, N. D. (2001). Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4461-4468.

- Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? Trends Biochem Sci (1992) 17:18–21.
- Hoarau, P., Damiens, G., Roméo, 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. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 143(2), 196-203.
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., & Girard, J. P. (2002). Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussatus*. European Journal of Biochemistry, 269(17), 4359-4366.
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., & Girard, J. P. (2004). Effect of three xenobiotic compounds on glutathione S-transferase in the clam *Ruditapes decussatus*. Aquatic toxicology, 68(1), 87-94.
- Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., & Girard, J. P. (2001). Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussatus* exposed to organic compounds. Environmental toxicology and chemistry, 20(3), 523-529.
- Howe, A. K. (2004). Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1692(2), 159-174.
- Jones, T. W., Thor, H., & Orrenius, S. (1986). Cellular defense mechanisms against toxic substances. In Toxic Interfaces of Neurones, Smoke and Genes (pp. 259-271). Springer Berlin Heidelberg.
- Kawai DK (1955) Carbonic anhydrase in pearl oyster. II. Changes of the enzyme activity in relation to growth and seasons. Publ Seto Mar Lab (Kyoto Univ) 5:89–94
- Kniprath, E. (1981), Ontogeny of the Molluscan Shell Field: a Review. Zoologica Scripta, 10: 61–79. doi: 10.1111/j.1463-6409.1981.tb00485.x
- Kniprath, E..(1977). Zur Ontogenese des Schalenfeldes von *Lymnaea stagnalis*. Raux. Arch. Dev. Biol. 181: 11-30.
- Kniprath, E..(1980). Larval development of the shell and the shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). Roux's Arch. Dev. Biol. 188, 201-204

- L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman and S. Weiner, Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes, *Chemistry* 12 (2006), pp. 980–987.
- Lazo C. S., Pita I. M., Effect of temperature on survival, growth and development of *Mytilus galloprovincialis* larvae. *Aquaculture Research* (2012), 43: 1127–1133. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02916.x
- Lee J. J., Calzone F. J., Britten R. J., Angerer R. C., Davidson E. H., Activation of sea Urchin actin genes during embryogenesis, *J. Mol. Biol.* (1986) 188, 173.183
- Levi-Kalisman et al., 2001 Y. Levi-Kalisman, G. Falini, L. Addadi and S. Weiner, Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using Cryo-TEM, *J. Struct. Biol.* 135 (2001), pp. 8–17
- Ludueña R. F., Banerjee A., Khan I. A, Tubulin structure and biochemistry, *Current opinion in cell biology* (1992), 4:53-57
- Mardones, P., Chang, J. C., & Elferink, R. P. O. (2014). Cyclic AMP and alkaline pH downregulate carbonic anhydrase 2 in mouse fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(6), 1765-1770.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., Medakovic, D. (2008) Molluscan shell proteins: Primary structure, origin, and evolution. *Current Topics in Developmental Biology* 80, 209-276.
- Marino, L. R. (1993). Characterization of the mouse carbonic anhydrase II gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7081-7089.
- Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., & Fabbri, E. (2009). Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 94(3), 177-185.
- McDonagh B., Tyther R., Sheehan D., Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat Toxicol.* 2005 Jul 1;73(3):315-26
- Medakovic D (1995) The calcification processes of larval, juvenile and adult shells of oysters (*Ostrea edulis*, Linnaeus) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck). PhD thesis, University of Zagreb and Rud-er Boškovic Institute, Zagreb, Croatia

- Medakovic D, Lucu C (1994) Distribution of carbonic anhydrase in larval and adult mussels *Mytilus edulis* Linnaeus. *Period Biol* 96:452–454
- Medakovic, D., Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels *Mytilus edulis* L., *Helgoland Marine Research* (2000) 54, 1, pp 1-6
- Minier, C., Akcha, F., & Galgani, F. (1993). P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 106(4), 1029-1036.
- Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, Nakano S, Morita T, Matsushiro A (1996) A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9657–9660
- Nielsen SA, Frieden E (1972) Carbonic anhydrase and growth in the oyster and busyscon. *Biol Bull (Woods Hole)* 98:19–24
- Odintsova, N. A., Dyachuk, V. A., & Karpenko, A. A. (2007). Development of the muscle system and contractile activity in the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia). *Russian Journal of Developmental Biology*, 38(3), 190-196.
- Orbea, A., & Cajaraville, M. P. (2006). Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four Basque estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Environmental toxicology and chemistry*, 25(6), 1616-1626.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., & Cajaraville, M. P. (2002). Interactive effects of benzo (a) pyrene and cadmium and effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Biomarkers*, 7(1), 33-48.
- Orr, G. A., Han, E. K., Browne, P. C., Nieves, E., O'Connor, B. M., Yang, C. P., & Horwitz, S. B. (1993). Identification of the major phosphorylation domain of murine mdr1b P-glycoprotein. Analysis of the protein kinase A and protein kinase C phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 268(33), 25054-25062.
- Parissenti, A. M., Gannon, B. R., Villeneuve, D. J., Kirwan-rhude, A. F., Chadderton, A., & Glück, S. (1999). Lack of modulation of MDR1 gene expression by dominant inhibition of cAMP-dependent protein kinase in doxorubicin-resistant mcf-7 breast cancer cells. *International journal of cancer*, 82(6), 893-900.

- Pennati, R., Groppelli, S., Sotgia, C., Candiani, S., Pestarino, M., & De Bernardi, F. (2001). Serotonin localization in *Phallusia mammillata* larvae and effects of 5-HT antagonists during larval development. *Development, growth & differentiation*, 43(6), 647-656.
- Peroutka, S. J. (1994). 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many?. *Neurochemistry international*, 25(6), 533-536.
- Peroutka, S. J., & Howell, T. A. (1994). The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology*, 33(3), 319-324.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G. W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., & Bompadre, S. (2002). Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 912-922.
- Renaud, F., Parisi, E., Capasso, A., & De Prisco, P. (1983). On the role of serotonin and 5-methoxytryptamine in the regulation of cell division in sea urchin eggs. *Developmental biology*, 98(1), 37-46.
- Reuter, U., Salomone, S., Ickenstein, G. W., & Waeber, C. (2004). Effects of chronic sumatriptan and zolmitriptan treatment on 5-HT<sub>1</sub> receptor expression and function in rats. *Cephalalgia*, 24(5), 398-407.
- Richard Tecwyn Williams, *Detoxication Mechanisms*, John Wiley and Sons Inc, New York 1947
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Seed, R. (1980) Shell growth and form in the Bivalvia. In: *Skeletal Growth of Aquatic Organisms* (eds D.C. Rhoads & R.A. Lutz). pp 23-67. Plenum Press, New York.
- Shannon M.B., Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48 (2000) 357–389.
- Shipp, L. E., & Hamdoun, A. (2012). ATP-binding cassette (ABC) transporter expression and localization in sea urchin development. *Developmental Dynamics*, 241(6), 1111-1124.
- Siarheyeva A, Lopez JJ, Glaubitz C. Localization of multidrug transporter substrates within model membranes. *Biochemistry* (2006) 45:6203–11.

- Smital, T., & Kurelec, B. (1998). The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure. *Marine environmental research*, 46(1), 443-447.
- Striano, T. (2014). Regolazione dell'attività dei trasportatori MXR nel mitilo (*Mytilus galloprovincialis*). Tesi di laurea magistrale, Università di Bologna.
- Subhash, M. N., Srinivas, B. N., Vinod, K. Y., & Jagadeesh, S. (2000). Modulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mediated response by fluoxetine in rat brain. *Journal of neural transmission*, 107(3), 377-387.
- Sugamori, K. S., Sunahara, R. K., Guan, H. C., Bulloch, A. G., Tensen, C. P., Seeman, P., ... & Van Tol, H. H. (1993). Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(1), 11-15.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A., & Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual review of biochemistry*, 59(1), 971-1005.
- Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., Radzio-Andzelm, E., & Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1697(1), 259-269.
- Teufel-Mayer, R., & Gleitz, J. (1997). Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Pharmacopsychiatry*, 30, 113-116.
- Tierney, A. J. (2001). Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 128(4), 791-804.
- Tierney, A. J. (2001). Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 128(4), 791-804.
- Venkatesan, B., Mahimainathan, L., Das, F., Ghosh-Choudhury, N., & Ghosh Choudhury, G. (2007). Downregulation of catalase by reactive oxygen species via PI 3 kinase/Akt signaling in mesangial cells. *Journal of cellular physiology*, 211(2), 457-467.

- Verdonk, N.H. and Cather, J.N. (1983) Morphogenetic determination and differentiation. In Verdonk, N.H., Van den Biggelaar, J.A.M. and Tompa, A.S. (eds.), *The Mollusca, Development*, Vol. 3, Academic Press, New York, pp. 215–251.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M. N., & Orunesu, M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(1), 37-42.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.
- Voronezhskaya, E. E., Nezlin, L. P., Odintsova, N. A., Plummer, J. T., & Croll, R. P. (2008). Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). *Zoomorphology*, 127(2), 97-110.
- Wang, C., Zhao, J., Mu, C., Wang, Q., Wu, H., & Wang, C. (2013). cDNA cloning and mRNA expression of four glutathione S-transferase (GST) genes from *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & shellfish immunology*, 34(2), 697-703.
- Weir, M. R. (2009).  $\beta$ -Blockers in the Treatment of Hypertension: Are There Clinically Relevant Differences?. *Postgraduate medicine*, 121(3), 90-98.
- Wilbur KM, Anderson NG (1950) Carbonic anhydrase and growth in the oyster and busycon. *Biol Bull (Woods Hole)* 98:19–24
- Wilbur KM, Jodrey L (1955) Studies of shell formation. V. The inhibition of shell formation by carbonic anhydrase inhibitors. *Biol Bull (Woods Hole)* 108:82–112
- Wilbur KM, Saleuddin ASM (1983) Shell formation. In: Saleuddin ASM, Wilbur KM (eds) *The Mollusca. Physiology*. Academic Press, New York, pp 235–287
- Yano, S., & Yano, N. (2002). Regulation of catalase enzyme activity by cell signaling molecules. *Molecular and cellular biochemistry*, 240(1-2), 119-130.
- Yin, Y., Huang, J., Paine, M. L., Reinhold, V. N., & Chasteen, N. D. (2005). Structural characterization of the major extrapallial fluid protein of the mollusc *Mytilus edulis*: implications for function. *Biochemistry*, 44(31), 10720-10731.

Zaman, G. J., Lankelma, J., vAN Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., ... & Borst, P. (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7690-7694.

## RINGRAZIAMENTI

È arrivato il momento di ringraziare tutti coloro che hanno reso possibile questo lavoro. Vorrei ringraziare tutti di persona ma siete troppi e mi ci vorrebbe una vita! Il ringraziamento più grande va alla persona che ha fatto di me ciò che sono oggi, mia mamma. Mia mamma è sempre stata un punto di riferimento per me, in qualsiasi momento, per qualsiasi cosa, lei è sempre stata pronta a consigliarmi e sostenermi. Fin dal primo giorno di università mi hai sempre spronato a realizzare i miei obiettivi ed i miei sogni. Non trovo le parole giuste per dirti quanto te ne sono grato e quanto ti voglio bene. Nonostante ti abbia perso proprio mentre portavo avanti questo lavoro, tutto l'amore che mi hai regalato fin da piccolo, e tutta la grinta che mi hai insegnato ad avere, mi hanno permesso di finire ciò che avevo cominciato e di chiudere anche questo capitolo della mia vita. Grazie, ti voglio bene. Altrettanto di cuore ringrazio mio babbo, perché ha sempre avuto il desiderio che io riuscissi a realizzare i miei sogni, sostenendomi, spronandomi ed aiutandomi in qualsiasi momento, dal più gioioso al più terribile, senza pensarci due volte. Sei la mia roccia! Allo stesso modo ringrazio la mia sorellona Giada e Marco, che si sono sempre fatti in quattro per me, e senza i quali non avrei quell'angioletto che è la mia nipotina Gemma. Grazie di cuore a tutti e tre! Un enorme ringraziamento va ai miei zii Silva e Paolo, per essermi stati sempre vicini e per essere sempre pronti ad aiutare. Ringrazio quindi la Prof.ssa Elena Fabbri, per avermi contagiato con la sua passione per la fisiologia ed avermi aperto un mondo che, fino a pochi anni fa, mi era del tutto sconosciuto ed ora è la mia passione. La ringrazio inoltre per aver reso possibile questo lavoro e spero, un giorno, di poter lavorare nuovamente al suo fianco. Un particolare ringraziamento va a Silvia, per avermi accompagnato in quest'anno di studi ed avermi insegnato, con santa pazienza, tutto ciò che ha permesso la scrittura di questa tesi. Ringrazio anche l'instancabile Teresa, Marco, Alisar, Paola, Anna e tutti coloro con i quali ho condiviso innumerevoli ore in laboratorio. Per ultimo, ma non meno importante, ringrazio tutti i miei amici per avermi garantito lo svago necessario a far sì che il mio cervello non andasse in tilt durante la scrittura della tesi. Purtroppo per ringraziare tutti mi ci vorrebbero altre 60 pagine, perciò mi limito a dirvi grazie, grazie a tutti!