

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Laboratorio di genetica del Dipartimento di Scienze della Vita

XXIII CICLO DEL  
DOTTORATO DI RICERCA IN

METODOLOGIE DI BIOMONITORAGGIO DELL'ALTERAZIONE AMBIENTALE

## **ALTERAZIONI DELL'ESPRESSIONE GENICA IN MITILI CONTAMINATI CON ACIDO OKADAICO E DINOFIGITOSSINE**

BIO/18

DOTTORANDA

**CHIARA MANFRIN**

RESPONSABILE DOTTORATO DI RICERCA (Coordinatore Corso/Direttore Scuola)

PROF. *PIERLUIGI NIMIS*

FIRMA: 

RELATORE

PROF. ALBERTO PALLAVICINI, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

**ANNO ACCADEMICO 2009/2010**

Non sono i frutti della ricerca scientifica che elevano un uomo  
ed arricchiscono la sua natura, ma la necessità di capire e il lavoro intellettuale

(Albert Einstein)

## RIASSUNTO

Gli aumenti stagionali delle temperature dei mari sono tra le condizioni ottimali di crescita per i Dinoflagellati, i quali possono raggiungere elevate concentrazioni nella colonna d'acqua e negli organismi filtratori come in *Mytilus galloprovincialis*. Alcuni dinoflagellati, comunemente *Dinophysis* e *Prorocentrum* spp., sono conosciuti produttori di tossine DSP in dettaglio, l'acido okadaico (OA) e i suoi analoghi, che sono responsabili della sindrome diarroica (Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)) nell'uomo. Quando i livelli delle tossine DSP nei mitili eccedono i 16 µg in 100 g di polpa, le mitilocolture vengono chiuse e le vendite dei molluschi sono bloccate. Risulta chiaro che nonostante non siano mai state registrate mortalità negli uomini o nei mitili, gli eventi DSP provocano importanti problemi sanitari ed economici in tutto il settore dell'acquacoltura.

In questo studio sono stati applicati metodi applicati in biologia molecolare e cellulare al fine di rilevare e analizzare pathway molecolari indotti dalla presenza di tossine DSP.

Questo lavoro, suddiviso in 3 parti, ha dapprima sondato l'applicabilità di metodiche molecolari, quali l'impiego di un microarray (MytArray 1.0) e le validazioni in PCR real time quantitativa (qRT PCR), per la rilevazione delle modifiche dei profili trascrizionali indotte dalla presenza delle biotossine DSP. Questa prima parte ha fornito una lista di geni attivati o silenziati nel corso di un esperimento di contaminazione con OA durato 35 giorni in mitili mantenuti a condizioni costanti. Sebbene le condizioni di mantenimento non rappresentino le situazioni alle quali i mitili sono sottoposti in natura, ciò ha permesso un'analisi preliminare dei putativi effetti indotti dall'acido okadaico (OA).

L'insieme dei trascritti differenzialmente espressi ha consentito di avere una panoramica di quelli che sono i pattern molecolari maggiormente influenzati dalla presenza della biotossina.

Al fine di validare i risultati ottenuti dalle ibridazioni sul MytArray 1.0 e per poter individuare putativi biomarker di OA si è proceduto a validare alcuni trascritti attraverso qRT PCR. Questa analisi ci ha consentito di osservare i livelli di espressione dei singoli trascritti selezionati e non ultimo di validare o meno i risultati ottenuti dal MytArray 1.0.

La disponibilità dei Dott. Zanolin e Franceschini ha reso possibile sondare i trascritti ritenuti putativi marker di OA in campioni naturalmente contaminati. 14 trascritti sono stati analizzati nei campioni provenienti da varie zone del Golfo di Trieste. Questa seconda parte del lavoro è stata indispensabile e scientificamente necessaria per poter discriminare i trascritti differenzialmente espressi a seguito della presenza di tossine DSP o a causa del mantenimento in condizioni controllate dei mitili, nell'esperimento iniziale. L'individuazione di pattern molecolari comuni ai campioni naturalmente contaminati e raccolti in anni diversi e ai profili di espressione ottenuti nello studio iniziale, è un punto di partenza interessante per la ricerca indirizzata all'individuazione di un set di trascritti attivati in modo specifico dalla presenza di tossine DSP e rafforza la validità dell'utilizzo di approcci molecolari negli studi di biomonitoraggio ambientale.

Non ultimo, l'analisi dei trascritti proteici, che costituisce un altro aspetto importante della ricerca volta all'individuazione di trascritti attivati e specificatamente correlati alla presenza di tossine DSP.

La sinergia dei metodi di rilevamento applicati di routine per l'accertamento della presenza di biotossine, supportato da metodiche di indagine genetica o estese al trascrittoma dell'organismo oggetto di studio, permetterebbero l'individuazione di contaminazioni a livelli sicuramente inferiori rispetto a quelli che sono i limiti di sensibilità dei test oggi applicati. L'applicazione di metodiche molecolari di questo tipo è d'uso crescente in analisi di biomonitoraggio ambientale supportando la validità e la robustezza dei risultati che questi approcci forniscono. In un lasso relativamente breve di 3 anni è stato possibile ottenere e validare un set di risultati correlati alla risposta genica del mitilo sottoposto a contaminazione con tossine DSP. Le problematiche connesse agli eventi di DSP nel nostro Golfo, legato alle pesanti perdite economiche che derivano dalle chiusure delle mitilocolture in alcuni periodi dell'anno e la mancanza di metodiche di rilevamento ad oggi completamente accettate dalla Comunità Scientifica, pongono le metodologie di analisi impiegate in questo studio, tra le più interessanti e sensibili nella rilevazione di situazioni di stress ambientale.

## Sommario

1.0 INTRODUZIONE	
1.1 LA MITILICOLTURA.....	1
1.2 CARATTERISTICHE DEL MITILO.....	6
1.2.1 MORFOLOGIA STRUTTURALE.....	6
1.2.2. SISTEMA FILTRATORE E SUE PECULIARITA'.....	9
1.3 DINOFLAGELLATE E BLOOM ALGALI.....	12
1.3.1 LE BIOTOSSINE DSP.....	16
1.3.3. METODI DI RILEVAMENTO DELLE BIOTOSSINE DSP.....	18
1.4 MEDOTOLOGIE MOLECOLARI PER L'ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA.....	20
1.4.1 MICROARRAY DI cDNA.....	20
1.4.2 REAL TIME PCR QUANTITATIVA.....	26
2.0 SCOPO DEL LAVORO.....	32
3.0 MATERIALI E METODI.....	34
3.1 CAMPIONI SPERIMENTALMENTE CONTAMINATI.....	34
3.1.1 RACCOLTA, STABILIZZAZIONE E SOMMINISTRAZIONE DELL'ACIDO OKADAICO.....	34
3.1.2 ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE.....	34
3.1.3 IBRIDAZIONE SUL MICROARRAY.....	35
3.1.4 ANALISI DEI DATI DEL MICROARRAY.....	36
3.1.5 VALIDAZIONE MEDIANTE qRT PCR.....	36
3.2 CAMPIONI NATURALMENTE CONTAMINATI.....	39
3.2.1 qRT PCR.....	40
3.3 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE.....	42
3.3.1 PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE.....	42
3.3.2 SDS-PAGE MONODIMENSIONALE.....	42
4.0 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	44
4.1 RISULTATI E DISCUSSIONE DELLO STUDIO SPERIMENTALE.....	44
4.1.1 PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA.....	44
4.1.2 VALIDAZIONE MEDIANTE qRT PCR.....	49
4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE DELLO STUDIO SUI NATURALMENTE CONTAMINATI.....	53
4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE SULLA COMPONENTE PROTEICA.....	56
5.0 CONCLUSIONI.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	I
<i>Ringraziamenti</i>	
PRODUZIONE SCIENTIFICA DEL CANDIDATO.....	A
INFORMAZIONI DI SUPPORTO.....	a

## 1.1 LA MITILICOLTURA

La mitilicoltura è il termine generico che designa le attività di produzione e commercializzazione dei mitili. Essa fa parte di un più ampio campo, l'acquacoltura, che concerne la produzione di specie ittiche (si parla quindi di itticultura) topo, di ostriche (ostricoltura), di crostacei (granchi, gamberi detta crostaceicoltura) e in ultimo di alghe (algocoltura).

L'acquacoltura europea assume numerose forme diverse, che si possono classificare distinguendole in base a varie caratteristiche: acquacoltura estensiva o intensiva, in ambiente naturale o in vasca, in acqua dolce o in acqua di mare, in scorrimento continuo o in ricircolo, tradizionale o moderna, classica o biologica, riparata o esposta [1]. A partire da queste dicotomie, sono possibili tutte le sfumature e numerose combinazioni. Per presentarle, la cosa più semplice è seguire lo sviluppo storico dell'acquacoltura in Europa.

L'acquacoltura estensiva è stata la prima forma di allevamento ad essere praticata e consisteva nel catturare animali acquatici selvaggi nelle lagune, negli stagni o in piccoli laghi poco profondi in modo da renderli disponibili in qualsiasi momento. Questa forma di allevamento risale all'epoca neolitica, quando l'uomo ha iniziato ad agire sulle risorse naturali, ovvero, in Europa, 4000 anni prima della nostra era. Questa pratica minimalista non esiste più oggi in Europa, perché tutti gli allevamenti acquicoli implicano almeno un'interazione tecnica con l'ambiente o con l'animale.

La seconda tappa dell'evoluzione dell'acquacoltura consiste proprio nel non contare più unicamente sulla natura, ma nell'organizzare un ambiente acquatico che favorisca lo sviluppo delle popolazioni di pesci, di molluschi e/o di crostacei. La più antica testimonianza della pratica dell'acquacoltura è stata accertata fin dai tempi antichi nell'economia di diverse civiltà, ad esempio in un bassorilievo ritrovato nella tomba egizia di Aktihetep, risalente al 2500 a.C., dove è ritratto un uomo intento a raccogliere tilapie da uno stagno. Nel 500 a.C., in Cina, venne pubblicata l'opera "L'allevamento dei pesci di Tao Zhu Gong" [2]. In seguito Fenici, Etruschi e Romani si interessarono all'allevamento dei pesci; i Romani in particolare allevavano le murene [3] e le anguille e nel I secolo a.C. Sergius Orata avviò un allevamento di ostriche in Campania, nel Lago di Lucrino.

Queste forme di acquacoltura derivate da pratiche antiche persistono ai giorni nostri in tutta l'Europa. È il caso della *piscicoltura estensiva tradizionale*, praticata dalla Lapponia alla Sicilia e dal Kerry alla Tracia. Consiste nel gestire gli stagni (naturali o artificiali) e le lagune in modo da favorire lo sviluppo della fauna acquatica. Tutti gli inverni, i corsi d'acqua sono depurati e fertilizzati con concimi in modo da stimolare la vegetazione acquatica e, di conseguenza, da intensificare la presenza dei microorganismi, dei piccoli molluschi e crostacei, delle larve e dei vermi che costituiscono la base della piramide alimentare acquatica. Ciò ha l'effetto di favorire lo sviluppo degli animali commerciali con un rendimento superiore a quello ottenibile dall'ecosistema naturale. La molluschicoltura, ovvero l'allevamento dei molluschi, rimane un'attività di allevamento estensivo. Poggia principalmente su individui nati naturalmente e sui nutrienti offerti dall'ambiente, senza interventi di alcuni tipo. Una sofisticazione molto spinta del processo e delle tecniche permette di ricavare un rendimento ottimale da quello che fornisce la natura. In Europa, l'allevamento delle ostriche e quello delle cozze rappresentano il 90 % della produzione di molluschi [1]. Si tratta di allevamenti di antichissima tradizione, i cui esordi risalgono all'antichità. L'ostricoltura è oggi un'attività tradizionale in alcuni paesi dell'UE come la Francia (90 % della produzione UE) e i Paesi Bassi. La mitilicoltura è dedicata a due specie, in funzione della zona geografica di produzione: la cozza (*Mytilus edulis*), più piccola, nel nord, e il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*), di maggiori dimensioni, altresì detto cozza di Spagna o del Mediterraneo, nel sud, in **Figura 1** è riportata la distribuzione mondiale dei principali ecotipi di mitili. *Mytilus edulis* (Linneo, 1758) è presente a latitudini temperate e fredde, indicando una buona capacità di adattamento e una resistenza a condizioni climatiche

difficili, se non estreme (coste dell'Islanda, Mar Baltico). *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) è presente a medie latitudini, spingendosi entro acque più calde, tipicamente lungo le coste del Mediterraneo. *M. trossulus* (Gould, 1850) e *M. californianus* (Conrad, 1837) hanno una distribuzione più ridotta ma continua per un intervallo latitudinale di trenta gradi [4]. I metodi di allevamento variano a seconda delle specie e delle regioni. In Europa vengono allevate anche altre specie di molluschi, come le vongole, i cardidi (*Acanthocardia tuberculata*), i pettinidi (*Chlamys opercularis*, *Pecten jacobaeus*) e gli abaloni (*Haliotis tuberculata lamellosa*). L'allevamento della vongola verace (*Tapes decussatus*) è più recente delle precedenti. Risale agli anni '80, quando la pesca a piedi o con draga non è più stata favorita, al fine di proteggere la risorsa. La riproduzione si effettua in modo naturale sui siti di produzione o in modo controllato nelle avannotterie. Il seme è messo a maturare in contenitori in fondo a vasche riempite con acqua di mare o direttamente in recinti d'allevamento. Dopo 3 mesi, le giovani vongole sono inseminate nella zona intertidale (Normandia, Bretagna, Cantabria, Galizia) o nelle lagune (Poitou-Charentes, Emilia Romagna, Veneto), e raccolte due anni dopo. Il grosso della produzione europea è realizzato in Italia.

La policoltura tradizionale negli stagni e nelle lagune si evolve sempre più verso modi di produzione più inquadrati che si definiscono *acquacoltura semi-estensiva*. I produttori non si accontentano più di amplificare lo sviluppo naturale



Figura 1 Distribuzione mondiale dei principali ecotipi di mitilo.

dello stagno o della laguna, ma aiutano la natura introducendovi avannotti nati in avannotteria e apportando un'aggiunta di cibo. L'esempio più eloquente è l'allevamento di carpe negli stagni, molto diffuso nei paesi dell'Europa centrale. Anche l'acquacoltura nell'acqua salmastra dell'Europa meridionale ricorre sempre più alle avannotterie e agli alimenti industriali, il che permette di compensare la riduzione del reclutamento naturale. La vallicoltura italiana, nei delta del Po e dell'Adige, riempie le sue lagune con avannotti di spigola e di orata per supplire alla rarefazione di queste specie allo stato naturale e per compensare la scomparsa dell'anguilla. Negli esteros spagnoli e in Portogallo, questa pratica ha permesso lo studio di nuove specie, come il rombo (*Bothus podas*), la sogliola (*Solea solea*) e la sogliola del Senegal (*Solea senegalensis*).

A fini di completezza, occorre anche nominare la conservazione in vivai, galleggianti in mare o posati a terra. Questa pratica è legata alla pesca. Permette di conservare e di ingrassare animali catturati in vista di una successiva commercializzazione. Questa pratica riguarda soprattutto gli animali che non mantengono la loro qualità gustativa

quando subiscono processi di conservazione classici, come l'appertizzazione, la sterilizzazione o il congelamento. L'esempio più corrente è quello dei grandi crostacei, come l'astice (*Homarus gammarus*), l'aragosta (*Palinurus elephas*) e il granchio di mare (*Cancer pagurus*), la cui stagione di pesca è la primavera, ma che sono tradizionalmente consumati durante le feste di fine anno, in inverno. Un altro esempio, all'origine di non poche polemiche, è l'ingrasso del tonno rosso (*Thunnus thynnus*) in gabbie galleggianti, apparso negli anni '90 nel Mediterraneo. Si tratta in questo caso di esportare, in inverno e a un prezzo migliore, gli individui catturati durante la stagione primaverile della pesca.

In natura, i pesci producono una grandissima quantità di uova e solo alcuni individui diventano adulti dopo essere sfuggiti ai predatori, alle malattie, alla mancanza di nutrimento, all'inquinamento, agli shock termici, eccetera. Il ruolo di un'avannotteria consiste non solo nell'ottenere uova fecondate, ma anche nel controllare tutti i parametri che permetteranno al numero massimo di individui di accedere allo stadio di novellame, al fine di essere rilasciati nell'ambiente naturale con buone possibilità di sopravvivenza. Nel 1741 Stephan Ludwig Jacobi, uno scienziato tedesco multidisciplinare, crea la prima avannotteria di trote in Vestfalia [5]. Ma bisogna ancora attendere un secolo perché la sua scoperta si moltiplichi su larga scala, per ripopolare i corsi d'acqua depauperati dai primi attacchi della Rivoluzione industriale, in Europa, negli Stati Uniti e in Giappone. Gli studi scientifici si estendono allora al salmerino (*Salvelinus fontinalis*), al coregone (*Coregonus lavaretus*), al salmone atlantico (*Salmo salar*), così come alla trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) negli Stati Uniti, introdotta in Europa dal 1874 grazie al suo buon rendimento. Ma questi progressi restano limitati ai salmonidi, che si rivelano relativamente facili da riprodurre in cattività. Occorre attendere il 1934 perché l'induzione ormonale sia scoperta in Brasile e sperimentata su pesci locali [1]. Questa tecnica consiste nell'iniettare determinati ormoni nel corpo del pesce per ottenere a comando una produzione di gameti, sia dalle femmine che dai maschi. Questa scoperta apre nuove prospettive in materia di avannotteria e consente di rivolgersi verso nuove specie fino ad allora rese sterili dallo stress della cattività. Dal 1935 nell'ex URSS, i ricercatori sovietici ottengono avannotti da diverse specie di storioni e creano perfino ceppi ibridi.

Il ripopolamento dell'ecosistema è ancora largamente praticato ai giorni nostri, sia in acqua dolce che in ambiente marino. Le avannotterie che lavorano in questo quadro sono finanziate generalmente da programmi pubblici di ricerca scientifica e lavorano essenzialmente su specie indigene. Così, a seguito del miglioramento della qualità delle acque e dei lavori di infrastruttura tesi a ripristinare una libertà di movimento per le specie migratrici, diverse avannotterie europee si occupano del ripopolamento dei fiumi con salmoni e storioni. Accade anche che queste avannotterie di interesse pubblico si inseriscano in progetto di *pascolo marino*. Questa pratica risale al XIX secolo e consiste nel rafforzare uno stock naturale con novellame di avannotteria per mantenere l'attività economica della pesca che ne dipende, come per il salmone nel Mar Baltico o la sogliola nel Mare del Nord. Va osservato che le scoperte di queste avannotterie scientifiche sono spesso all'origine di uno sfruttamento in acquacoltura commerciale.

All'inizio del XXI secolo si presenta una nuova sfida importante per l'acquacoltura. La zona costiera europea è eccessivamente occupata e non offre più terreno d'espansione per l'acquacoltura stessa. La maricoltura deve quindi allontanarsi dalla costa o nell'entroterra, grazie al ricircolo, con l'inconveniente del costo che rappresenta la ricostituzione artificiale dell'acqua di mare. O verso il largo, lontano dalle zone riparate della costa. La maricoltura al largo è il nuovo terreno di studio dell'acquacoltura europea. Ma le sfide tecnologiche sono enormi.

Il Mediterraneo è uno dei mari più profondi del mondo e l'Atlantico nord-orientale è una delle zone più ventose e agitate del globo. Per trattenere i pesci devono quindi essere sviluppati nuovi sistemi, come le gabbie immerse, così come per il nutrimento e la sorveglianza a distanza [1].

L'Italia, penisola mediterranea, bagnata da 8.000 km di costa, presenta realtà locali differenziate a seconda dell'ubicazione delle marinerie, in virtù delle strutture e conseguentemente dei natanti in esse esistenti.

Nell'Adriatico è concentrata la maggior parte della produzione ittica nazionale pur rappresentando il 20% circa della costa italiana. Tale fenomeno è riconducibile a due aspetti fondamentali quali l'elevata produttività del bacino (per altro duramente contrastata da fenomeni di inquinamento, in questi ultimi anni) e della maggiore presenza di strutture portuali, mercantili e della pesca (natanti ed impianti di acquacoltura).

L'allevamento e la coltura dei mitili è un'attività di consolidata tradizione in diverse regioni d'Italia dove tutt'ora è la principale attività di allevamento di specie acquatiche marine per i quantitativi prodotti, la distribuzione sul territorio nazionale e il numero di insediamenti produttivi.

I dati del fatturato più aggiornati risalgono al 2005 e riportano una produzione di mitili di 37.338 tonnellate/anno con una produzione così ripartita tra le Regioni italiane dell'Alto Adriatico: per l'Emilia-Romagna 20.028 tonnellate, per il Friuli Venezia Giulia 3.624 e per il Veneto 13.686 tonnellate con un fatturato complessivo di circa 42 milioni di euro [6].

La mitilicoltura è esercitata, nel nostro Paese, attraverso tre sistemi: sul fondale, tipico delle aree lagunari del delta padano, a pali fissi, diffuso in zone lagunari e costiere riparate (esso costituisce il metodo più antico di coltivazione dei mitili) e, il più diffuso, a filari galleggianti o *long line* adatto ad aree più esposte, **Figura 2**.



**Figura 2** Principali metodi di allevamento dei mitili: A raccolta della vongola verace dal fondale mediante rastrello, B allevamento di mitili su sistemi a pali fissi e C sistema a filari galleggianti.

Il sistema a pali fissi consiste nella disposizione schematica di pali (in legno, cemento o metallo) collegati tra loro da cavi a cui vengono appese le reste: reti tubolari in materiale plastico contenenti i mitili. Il sistema a filari galleggianti invece è composto da due corpi morti di ancoraggio, posti ad una distanza variabile da 100 a 200 metri, collegati tra loro da uno o più cavi mantenuti in sospensione da una successione di galleggianti. A tali cavi vengono appese le reste di mitili. Ad eccezione del sistema a fondale, di tipo estensivo, gli altri sistemi comportano alcune operazioni di lavorazione come il reperimento dei giovanili e la loro immissione nelle reti a formare le reste. I molluschi bivalvi si nutrono di fitoplancton e particolato organico filtrando elevate quantità d'acqua ed è per questo che gli impianti di molluscoltura vengono in genere realizzati in zone lagunari, riparate, spesso in corrispondenza della foci di fiumi, dove l'apporto e la presenza di sostanza organica è notevole. D'altra parte la strategia alimentare dei molluschi bivalvi, attraverso la filtrazione di grandi volumi di acqua, comporta il rischio di accumulo di sostanze inquinanti presenti in essa; è dunque molto importante effettuare costanti controlli nelle aree impiegate per la molluscoltura. Nel corso degli ultimi decenni del secolo scorso si è assistito al passaggio da una coltivazione nell'ambito delle lagune e degli stagni costieri a quello in mare aperto. Il fenomeno è stato determinato principalmente dal peggioramento delle

caratteristiche igienico-sanitarie delle acque dei bacini che hanno scambi limitati con il mare. La disponibilità di tecnologie appropriate ha favorito questo passaggio che coniuga la duplice esigenza di ottenere un prodotto igienicamente conforme con performance produttive economicamente rilevanti. La coltura dei molluschi, nel Golfo di Trieste, risale alla metà dell'800 e dopo un periodo di abbandono di tale attività, essa riacquistò importanza dopo la Prima Guerra Mondiale. La complessa normativa che regola e vigila le varie fasi di produzione deriva dagli episodi di colera verificatisi in Italia negli anni 70, episodi che per molti anni penalizzarono drasticamente i consumi e le produzioni. I mitili allevati oggi in Italia provengono soprattutto da allevamenti a mare (long-line), e solo in minima parte da acque lagunari; le modalità operative utilizzate per la pesca dei molluschi sono simili in ambedue le tipologie. Le zone adibite a molluscoltura sono classificate dalla normativa in base ai requisiti microbiologici previsti per i molluschi in acque A (mare) oppure acque B (laguna); nelle prime il prodotto può essere avviato direttamente al consumo umano, mentre nelle seconde deve essere obbligatoriamente depurato in appositi impianti per un periodo sufficiente. Il prodotto di mare, provenendo da acque di categoria A è portato direttamente ai Centri di Spedizione Molluschi (CSM) autorizzati dove viene confezionato e commercializzato. Solo questi Centri di Spedizione Molluschi, come definiti dal D.L.gs 530/1992, possono avviare il prodotto confezionato direttamente al consumo alimentare.

## 1.2 CARATTERISTICHE DEL MITILO

Nel bacino del Mediterraneo viene allevato il *Mytilus galloprovincialis*, lungo le coste atlantiche dei Paesi europei viene allevato il *Mytilus edulis* (**Figura 1**). Queste due specie sono interfeconde e danno luogo a ibridi. Il *Mytilus galloprovincialis*, mitilo o cozza, è un mollusco lamelibranco racchiuso tra due valve simmetriche, di cui il mollusco controlla l'apertura per mezzo di un muscolo adduttore. Questo muscolo permette di serrare le valve per difendersi dai predatori o dalla disidratazione nel caso di emersione da bassa marea. Può raggiungere e superare la lunghezza di 10 cm misurati lungo l'asse maggiore.

## 1.2.1 MORFOLOGIA STRUTTURALE

Per comprendere le modalità di allevamento e il perché i mitili sono considerati organismi modello è necessario conoscere la loro anatomia. Non è mia intenzione fornire una dettagliata descrizione della biologia dei mitili, ma solo darne un breve riassunto. Per ottenere informazioni più dettagliate rimando il lettore alle seguenti pubblicazioni: [7-12]. I Bivalvi appartengono al phylum Mollusca, un gruppo che include diversi animali come i gasteropodi, i cefalopodi e anche le vongole, le ostriche e i mitili. Il phylum comprende sei classi e una di queste è quella dei Lamelibranchi o Bivalvi. Questi animali sono compressi lateralmente e il corpo molle è parzialmente o completamente racchiuso in una conchiglia [13]. La conchiglia dei bivalvi, come indica il loro stesso nome, è composta da due valve generalmente simmetriche, una destra e una sinistra, separate dai relativi lobi del mantello e destinate a proteggere i visceri [12]. Esse sono unite da un legamento e una cerniera, e sono costituite da una matrice organica formata da proteine, mucopolisaccaridi e cristalli di carbonato di calcio, generalmente sotto forma di calcite (cristalli esagonali) o aragonite (cristalli rombici).

Il legamento, a forma di fuso o di sezione di cilindro, è fissato ai bordi dorsali delle valve e grazie alla sua elasticità e alla sua posizione intercalare determina l'apertura delle valve. È costituito soprattutto da conchiolina [14], sostanza analoga alla chitina e presenta uno strato esterno e uno interno, che per la loro elasticità tendono a provocare l'apertura della conchiglia. Il legamento è separato, tramite l'istmo palleale, dal mantello a livello della zona dorsale posta fra i suoi due lobi e può essere esterno alle valve e quindi prendere il nome di *tensilium*, oppure interno a esse ed essere detto *resilium*. La cerniera, o articolazione delle valve, è un dispositivo a ingranaggio più o meno complicato nel quale i denti di una delle valve penetrano in un incavo dell'altra. La cerniera dei mitili è molto ridotta e le valve sono unite quasi esclusivamente dal legamento, che ha l'aspetto di una banda brunastra che corre lungo la cerniera.

I muscoli adduttori, inseriti perpendicolarmente rispetto alle valve, si oppongono all'azione meccanica del legamento e chiudono la conchiglia. Nel loro punto d'inserzione sulla faccia interna delle valve essi determinano le cosiddette *inserzioni*; è altresì possibile distinguere, più o meno accentuate, le impronte dei muscoli retrattili del piede e del bordo del mantello. In **Figura 3**, tratta da [12], è riportato lo schema dell'organizzazione interna di un mollusco bivalente.

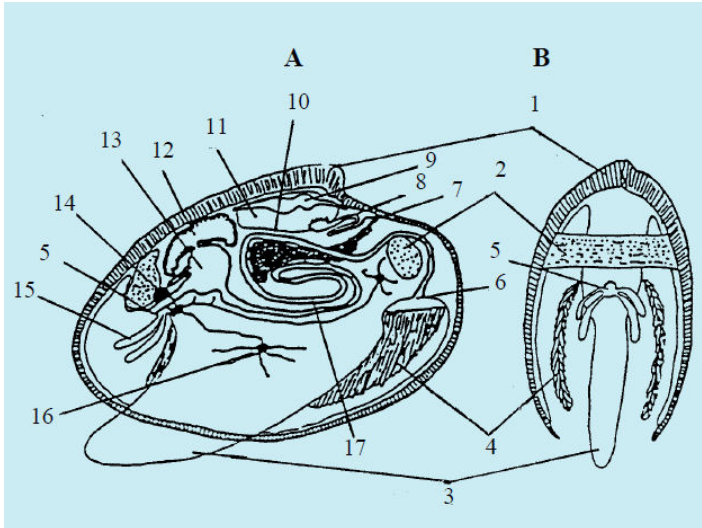


Figura 3 A) sezione longitudinale; B) sezione trasversale. 1) scheletro; 2) muscolatura; 3) muscolatura; 4) branchie; 5) bocca; 6) ano; 7) orifizio genitale; 8) rene; 9) cuore; 10) organi riproduttori; 11) cavità corporea; 12) fegato; 13) stomaco; 14) cervello; 15) palpi labiali; 16) innervazione; 17) intestino.

Questi muscoli adduttori sono composti, nella maggior parte dei bivalvi, da una combinazione di fibre muscolari lisce di aspetto madreperlaceo e striate d'aspetto vitreo. Il muscolo liscio madreperlaceo, essendo formato da fibre lisce, fornisce contrazioni lente e a basso consumo energetico, mentre invece i muscoli striati vitrei formati da fibre striate danno luogo a contrazioni rapide ad alto consumo energetico. Sono queste ultime che presiedono alla chiusura rapida delle valve mentre le prime provvedono alla chiusura protratta per lunghi periodi di tempo.

I muscoli adduttori presentano un'attività ritmica costituita da un periodo di rilassamento, che si effettua con lentezza e lascia una fessura tra le due valve, seguito da una contrazione rapida che provoca la chiusura delle valve stesse. Entrambi i

tipi di muscoli partecipano al realizzarsi di questo ritmo. Questi muscoli rivestono un ruolo importante nella sopravvivenza dei molluschi, infatti dalla chiusura delle loro valve dipende la possibilità di potersi difendere dai predatori durante la permanenza in mare, dipende anche la loro sopravvivenza dopo la depurazione, grazie alla possibilità di captare l'ossigeno atmosferico a condizione che le loro branchie restino umide. Da ciò deriva l'importanza di poter mantenere le valve più o meno chiuse per trattenere il liquido intervalvare mantenendo così da mantenere umide le branchie il più a lungo possibile.

Il mantello è formato da un tessuto a struttura molle che avvolge i visceri del mollusco, ed è fissato alla regione dorsale configurandosi in due lobi a formare una sorta di cappuccio. Presenta un'ampia apertura inalante nella regione ventrale, attraverso cui entra l'acqua, e un orifizio esalante, vicino al muscolo adduttore posteriore, da cui la espelle dopo aver captato l'ossigeno disciolto in essa e le particelle alimentari. In molti casi i bordi del mantello si prolungano formando dei sifoni: uno di entrata dell'acqua (inalante) e l'altro di uscita (esalante). Il bordo presenta dei prolungamenti che, all'atto di apertura delle valve, s'intrecciano costituendo una sorta di filtro per evitare che penetrino al suo interno delle particelle di grandi dimensioni. Il mantello è generalmente attraversato da due sottili muscoli adduttori anteriori e da uno grosso posteriore, inseriti nella parte interna delle valve.

La bocca, subterminale, è una fenditura trasversale le cui labbra si prolungano su entrambi i lati dell'orifizio in due paia di tentacoli labiali a forma di lamine appiattite.

Sulla linea medioventrale, la massa viscerale forma una sacca più o meno resistente, dietro la quale sporge il  *piede* , di varia forma a seconda delle specie di molluschi considerate.

Il piede raggiunge il suo massimo sviluppo nei bivalvi escavatori, ai quali serve appunto da apparato scavatore e locomotore grazie alle sue spasmodiche contrazioni. Nelle specie che vivono fisse, il piede si riduce o addirittura scompare. In svariati generi (ad esempio il  *Mytilus* ), sulla linea medioventrale del piede si apre la ghiandola bissogena, la quale produce dei filamenti o bisso che, partendo in fascio divergente dal suo orifizio, si fissano a un supporto mediante la propria estremità allargata a forma di lente. Questi filamenti sono costituiti da un'unica struttura elicoidale

principalmente composta da aminoacidi [15, 16] e la loro abbondanza e resistenza dipende dallo stato fisiologico del mollusco. Nei Mitilidi la capacità di secernere bisso si conserva per l'intera durata di vita del mollusco, il che indica una preferenza per habitat con forti correnti che, a loro volta, lo rendono idoneo a una elevata capacità di filtrazione e consumo di ossigeno. L'ano si apre al di sotto del muscolo adduttore posteriore sul piano mediano.

La concentrazione ionica del sangue dei bivalvi si adatta a quella dell'esterno e quindi alla salinità dell'acqua di mare [17], per cui le variazioni della salinità esterna fanno variare il volume del corpo del bivalve; tale interscambio osmotico si realizza attraverso le branchie.

I bivalvi presentano due reni (nefridi) a entrambi i lati del cuore, nei quali avviene una filtrazione del sangue il cui filtrato finisce nella cavità del mantello e da lì all'esterno. Espellono principalmente ammoniaca, e anche ossido di trimetilamina e urea [10, 18]. Quando si rompe l'equilibrio osmotico in seguito a brusche e consistenti variazioni della salinità, si altera gravemente l'interscambio osmotico dei bivalvi e di conseguenza la loro fisiologia: ciò può addirittura provocare la morte in un breve lasso di tempo.

L'apparato digerente dei molluschi bivalvi consta di un esofago, breve tubo che sbocca in un ampio stomaco, a pareti pieghettate, crivellato di fori che sono gli orifizi dei diverticoli digerenti. Questi si presentano notevolmente ramificati e terminano in sacche cieche formate da acini ghiandolari [12]. L'insieme costituisce la ghiandola digerente. I tubuli digerenti sono composti da cellule cigliate, come sono presenti anche nello stomaco e nell'esofago e da cellule vacuolari ricche di pigmenti quali carotenoidi, glucoproteidi e lipidi. A proposito delle loro funzioni, esistono pareri discordi riguardanti la capacità dei tubi digerenti sulla possibilità che essi compiano una digestione intracellulare o extracellulare con produzione di enzimi digestivi; probabilmente i tubuli assommano entrambe queste funzioni. Lo stomaco si presenta come un lungo diverticolo cieco (il cieco dello stilo) che contiene lo stilo del cristallino, sottile fusto trasparente che va a poggiarsi su uno scudo gastrico. Tutti i bivalvi, a eccezione di pochi casi, possiedono questo stilo del cristallino, contenuto come detto in una sacca cieca che si apre nello stomaco o in un canale profondo della parte iniziale dell'intestino. Lo stilo è traslucido o giallognolo e ha una dimensione notevole rispetto a quella del mollusco. È costituito da strati concentrici di mucoproteine secreti continuamente dalle pareti ghiandolari del fondo della sacca (tiflosolio). La sua estremità anteriore sporge nello stomaco e urta contro uno strato cuticolare dentellato della parete dello stomaco, lo stilo, mosso da ciglia vibratili, gira su se stesso ad una velocità da 10 a 80 volte al minuto, liberando enzimi.

L'intestino è relativamente lungo, più o meno ripiegato su se stesso, si apre al di sotto del muscolo adduttore posteriore ed è anch'esso cigliato. Nel suo percorso attraversa il ventricolo cardiaco prolungandosi fino al retto per sboccare nell'ano.

Le feci, che contengono sia i residui della digestione intracellulare, sia le particelle parzialmente digerite e poi respinte nello stomaco, sono relativamente compatte e dense, per cui si sedimentano rapidamente in acqua.

Il ruolo svolto dalla digestione nell'eliminazione di batteri non è ben quantificato. Si sa che, in condizioni di laboratorio, molti molluschi sopravvivono e addirittura ingrassano con una dieta formata esclusivamente da batteri [19]. Inoltre, in molte zone di produzione, durante l'inverno, quando le popolazioni di fitoplancton sono assai scarse, i molluschi sono costretti ad alimentarsi di piccoli cigliati, resti organici e batteri. È dunque probabile che i batteri svolgano un ruolo relativamente importante nella nutrizione dei bivalvi, per cui è verosimile che questi nel loro processo digestivo ne eliminino cospicue quantità in acqua, attraverso le feci. Perciò, l'eliminazione dei batteri si realizza essenzialmente attraverso le feci (con concentrazioni 27-37 volte più abbondanti in esse, che nelle pseudofeci).

I mitili sono animali a sessi separati, la fecondazione si realizza a caso, e avviene in mare. Le femmine producono nelle ovaie una sostanza che, diffondendosi nell'acqua di mare, provoca l'eiaculazione nei maschi vicini e, a sua volta, lo sperma eiaculato nell'acqua scatena nelle femmine la deposizione delle uova. Non vi è quindi copulazione e la fecondazione è esterna, oppure avviene nella cavità del mantello della femmina. Ciò spiega il fatto che, se in un vivaio o vasca di depurazione inizia la fregola, essa interessa indistintamente maschi e femmine, ossia la totalità dei soggetti sessualmente maturi e influirà in modo determinante sulla loro vitalità e depurazione.

L'apparato circolatorio è costituito da un cuore dorsale racchiuso in un pericardio che comprende un ventricolo e due atri laterali. La circolazione dei bivalvi è aperta, ossia il sangue inonda i tessuti formando un sistema lagunare in parte del suo percorso. I molluschi sono animali a sangue freddo e quindi la loro temperatura corporea si adatta a quella dell'ambiente. Pertanto, se la temperatura ambientale aumenta rapidamente, possono essere colpiti da embolia gassosa, poiché l'aumento di temperatura fa diminuire la solubilità dei gas nel sangue e di conseguenza si creano delle bolle d'aria nel corso sanguigno. Il loro sangue è altresì incoagulabile.

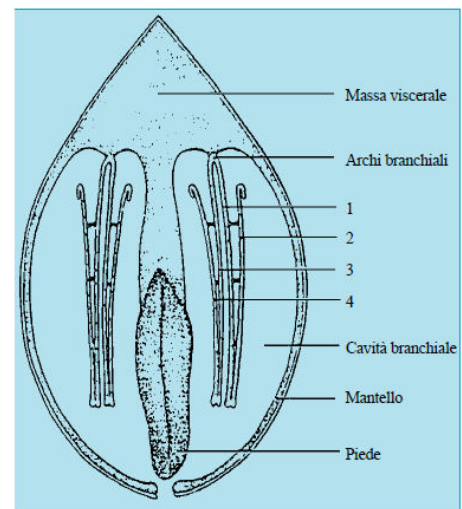
Alcuni bivalvi sono privi dei pigmenti respiratori per cui l'ossigeno si dissolve direttamente nel plasma. In altri, il pigmento respiratorio contenuto nel plasma sanguigno è l'emocianina, nella quale il rame svolge lo stesso ruolo del ferro per l'emoglobina.

Per quanto riguarda gli organi sensoriali tutti i bivalvi possiedono terminazioni tattili ai bordi del mantello e sono quindi molto sensibili a qualsiasi stimolo.

### 1.2.2. SISTEMA FILTRATORE E SUE PECULIARITÀ

Il sistema filtrante dei mitili svolge la duplice funzione respiratoria e di captazione dell'alimento.

La respirazione viene effettuata attraverso le branchie, che sono responsabili dell'interscambio gassoso, oltre ovviamente a essere il luogo in cui si realizza la captazione delle particelle alimentari che penetrano nella cavità palleale. Esse sono situate a sinistra e a destra del corpo e tra la massa viscerale e il mantello. Normalmente ve ne sono due su ciascun lato. Si distinguono diversi gradi di complessità delle strutture branchiali nei molluschi, quelle dei mitili sono le più semplici e sono dette filibranchie. Esse sono infatti formate da filamenti più o meno lunghi che si diramano da un asse longitudinale. L'insieme di filamenti di una medesima linea forma una lamina branchiale. I filamenti si ripiegano su se stessi, tutti al medesimo livello, a una certa distanza dal loro punto di inserzione, formando una lamina diretta e una lamina riflessa. La lamina branchiale esterna si riflette verso l'esterno, la lamina branchiale interna, verso l'interno conferendo un aspetto a W della sezione trasversale di una branchia, come mostrato in **Figura 4**, tratta da [12]. I filamenti di una stessa lamina sono tenuti uniti da ciuffi di ciglia vibratili, che s'inseriscono le une nelle altre come le setole sovrapposte di due spazzole, oppure da suture localizzate. I filamenti branchiali sono rivestiti da un epitelio abbondantemente cigliato sulla faccia esterna. Ciò è necessario per mantenere la corretta circolazione dell'acqua attraverso la branchia, nonché della corrente



**Figura 4** Sezione trasversale schematica di un mitilo. Si nota per ogni branchia: la branchia diretta (1) e la branchia riflessa (2) del filamento esterno; la branchia diretta (3) e la branchia riflessa (4) del filamento interno.

esalante che elimina le tossine metaboliche e le particelle di scarto della cavità palleale. Attraverso le branchie i molluschi bivalvi sono in grado di captare, oltre all'ossigeno disciolto dell'acqua, anche altre sostanze disciolte quali macromolecole e ioni, in quanto essi agiscono come un filtro nel quale vengono trattenute le particelle alimentari attaccate al muco che la superficie delle branchie possiede. Per questa ragione, la superficie branchiale supera di molto le necessità respiratorie: a esempio, un mitilo di 6-7 centimetri di lunghezza possiede una superficie branchiale di 100-110 centimetri quadrati sebbene per la respirazione gli basterebbe il 5-10% di tale superficie. Da ciò deriva che le malattie gravi che colpiscono i bivalvi alle branchie e provocano in esse gravi alterazioni (infezioni quali la *Bonamia*, parassitosi, contaminazioni, ecc.), causano loro la morte per inanizione e non per asfissia.

L'alimentazione dei molluschi bivalvi è microfaga, ossia a base di fitoplancton nonché di particelle organiche in sospensione.

In condizioni normali, un mitilo di media dimensione, filtra all'incirca da 4 a 5 litri d'acqua all'ora, ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, sempre che rientrino nella gamma delle dimensioni filtrabili. Recenti studi hanno dimostrato come *Dreissena polymorpha* sia in grado di operare una scelta delle particelle da ingerire, basata non solo sulle dimensioni delle particelle stesse, ma sulla loro "qualità" [20]. Sono le ciglia laterali delle branchie che con il loro battito creano la corrente alimentare inalante. Il ritmo del battito di un mitilo è di 2-5 pulsazioni al secondo, che possono arrivare fino a 20 pulsazioni in acque calde e povere di ossigeno. Questa corrente formata dalle ciglia laterali è più che sufficiente ad assicurare la respirazione dell'organismo. Con le valve leggermente socchiuse, si produce una lieve corrente inalante che fornisce nuova acqua alla zona ventrale della cavità palleale. Questa corrente penetra nell'emibranchia passando tra i filamenti adiacenti; le ciglia latero-frontali, le cui estremità vanno praticamente a toccare le corrispondenti estremità del filamento adiacente, fanno da setaccio trattenendo le particelle trasportate dalla corrente stessa. La dimensione delle particelle trattenute dalle ciglia latero-frontali varia in funzione delle abitudini alimentari di ciascuna specie; in generale, le dimensioni estreme sono comprese tra un massimo di circa 400-500 micron, e un diametro minimo di 1-5 micron.

Al di sopra della dimensione massima, la penetrazione delle particelle nella cavità palleale è impedita dai bordi del mantello. Al di sotto di pochi micron, vengono trattenute soltanto le particelle adsorbite sulle particelle di maggiori dimensioni.

È noto che il mitilo è in grado di captare in modo efficiente le particelle con diametro compreso tra i 2 e i 5 micron. Questo range di misure comprende un gran numero di batteri liberi (le cui dimensioni medie sono comprese 1-5 micron), particelle di argilla, organismi planctonici, larve e uova di un gran numero di specie, resti di organismi vegetali e animali.

Le particelle trattenute dalle ciglia latero-frontali vengono convogliate alle ciglia frontali del filamento branchiale che provvedono a mescolarle nel muco secreto dalle cellule glandolari e a trasportarle verso i solchi alimentari. Questi solchi sono depressioni cigliate che corrono su tutta la lunghezza delle lamine branchiali e sono situati sul bordo ventrale e dorsale delle medesime.

Il grado di complessità branchiale varia tra i diversi lamellibranchi. Quanto più è complessa la struttura delle branchie, tanto maggiori sono le possibilità di trasporto e preselezione delle particelle trattenute nelle branchie stesse. Nei casi più semplici, come i mitili, le ciglia frontali spostano le particelle verso i solchi alimentari ventrali o dorsali delle lamine branchiali, dove vengono trasportate in direzione anteriore fino ai palpi buccali che realizzano la selezione delle particelle.

La raccolta delle particelle in sospensione nell'acqua avviene quindi tramite i filamenti branchiali: una volta captate le particelle vengono dirette verso i solchi marginali (congiunzione delle branchie dirette e riflesse dei filamenti branchiali) o dorsali (ripiegamento all'estremità delle branchie riflesse) e convogliate verso i palpi labiali e la bocca.

Sono questi gli organi incaricati di selezionare le particelle che penetrano nella bocca, in funzione della loro dimensione, rugosità ed eventualmente del loro gusto o composizione chimica (chemiotattismo).

Le particelle accettate vengono trasportate trasversalmente rispetto alle creste, sempre in direzione della bocca, mentre invece quelle respinte vengono portate al bordo ventrale dei tentacoli e di lì al mantello per la loro espulsione, o mediante il piede oppure trasportate lungo le vie ciliari ventrali del mantello fino alla base della zona o sifone esalante, dove sono espulse come pseudofeci mediante contrazioni delle valve. Le particelle alimentari agglutinate all'interno di un cordone mucoso, penetrano nella bocca e vengono convogliate attraverso un breve esofago cigliato che sbocca nello stomaco. Uno schema dell'apparato digerente è riportato in **Figura 5**, tratto da [12]. Questo organo è circondato da una grande massa ghiandolare a funzioni primordialmente digerenti: la ghiandola digerente o epatopàncreas.

Lo stomaco ha due regioni chiaramente differenziate: quella dorsale nella quale sboccano l'esofago e i condotti della ghiandola digerente; e la regione ventrale, a forma di sacca, nella quale si trova lo stilo del cristallino, anch'essa ghiandolare, secernente una serie di enzimi, quali amilasi, cellulasi e lipasi. Questi enzimi vengono assorbiti dalla matrice proteica mano a mano che questa si forma sul fondo della sacca. Le pareti del tratto superiore della sacca sono rivestite di ciglia che imprimono allo stilo, come già precedentemente visto, un movimento rotatorio. Cosicché quest'ultimo, che ha un'estremità poggiante sullo scudo gastrico, si consuma per sfregamento, liberando nello stomaco gli enzimi che contiene.

La velocità di rotazione dello stilo è condizionata dalla temperatura, dal pH e dalla pressione del cibo presente nello stomaco [21]. Il cordone mucoso che penetra attraverso l'esofago è diretto verso lo stilo, il quale agisce facilitando sia la penetrazione del cordone alimentare nello stomaco sia, durante il disfacimento del cordone stesso, il mescolarsi delle particelle alimentari con gli enzimi e la loro distribuzione sulle pareti dello stomaco.

L'intestino, anch'esso cigliato, si prolunga posteriormente verso il retto, il quale attraversa il pericardio e il ventricolo per sboccare nell'ano, situato all'altezza del muscolo adduttore posteriore, nella cavità soprabrancale, da dove le feci vengono espulse all'esterno.

Il tempo di permanenza delle particelle alimentari nel tratto digerente o tempo di digestione dei molluschi bivalvi è controverso; si ritiene che il transito duri generalmente da 0,5 a 2 giorni, essendo condizionato dai fattori che ne determinano in maggiore o minor misura i processi metabolici, quali a esempio i fattori legati al mollusco stesso e le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua. Dodgson [22] ritiene che il transito degli alimenti attraverso il tratto alimentare sia più rapido, richiedendo solamente 1,25 ore.

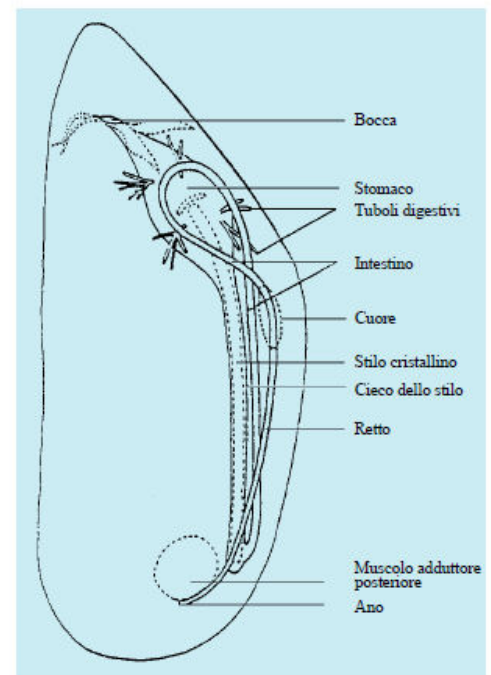


Figura 5 Schema dell'apparato digerente.

## 1.3 DINOFLAGELLATE E BLOOM ALGALI

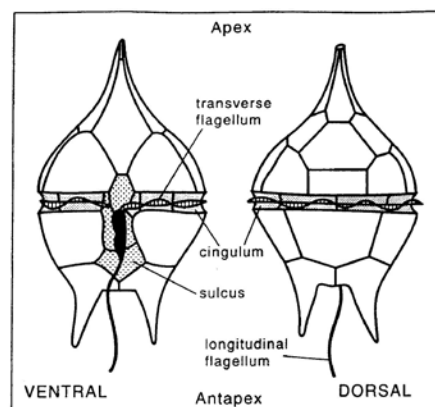
Le dinoflagellate sono un'importante componente del fitoplancton. Più di mille specie vivono in acqua dolce e salmastra, ma prevalentemente si trovano in mare. La flora del Mediterraneo comprende più di 300 specie ben note [13]. Conosciute anche come dinoficee (perdinee o dinoflagellate), esse sono ben rappresentate nel Mediterraneo da entrambe le sottoclassi. Sono alghe prevalentemente unicellulari, generalmente provviste di 2 lunghi flagelli e di una membrana cellulosica, i loro prodotti di riserva sono rappresentati da olii e amido. La morfologia odierna è il risultato dell'evoluzione che ha interessato le dinoflagellate nel corso dei millenni. Tali organismi presentano una parete cellulare, detta *amphiesma*, che consiste di una membrana esterna e una interna, fra le quali sono situate una serie di vescicole che possono contenere o meno *placche* di cellulosa. In base alla struttura dell'amphiesma, le dinoflagellate si suddividono in *tecate* (presentano placche di cellulosa) e *nude* (apparentemente prive di corazza, ma generalmente dotate di placche cellulosiche molto più sottili). L'insieme delle vescicole e delle placche di cellulosa contenute al loro interno prende il nome di *tabulazione*.

La forma delle dinoflagellate è abbastanza variabile: il corpo cellulare può avere un profilo tondeggiante oppure spigoloso, spesso dotato nelle specie *tecate* di *corni*, spine o altre appendici.

Una scanalatura più o meno mediana, detta *cingolo*, circonda il corpo cellulare dividendolo in un *epicono* superiore e un *ipocono* inferiore. Una scanalatura longitudinale, il *solco*, scorre perpendicolarmente al cingolo lungo l'ipocono. In esse, sulla superficie ventrale della parete, si inseriscono i due *flagelli*, tipici di tale phylum, di cui uno, posto trasversalmente all'interno del cingolo, determina la propulsione della cellula durante il movimento e l'altro, longitudinale e presente nel solco, determina la direzione dello spostamento [23], rimando alla **Figura 6**.

Un primo tentativo di classificazione delle dinoflagellate è stato fatto da Taylor [24-26] e da Fensome [27], che, in base alla distribuzione delle vescicole e delle placche sull'amphiesma, hanno distinto sei tipi di tabulazione (**Figura 7**), con i quali hanno definito sei livelli tassonomici:

- tipo *gymnodinioide*: rappresentato soprattutto da organismi viventi, esistono anche forme fossili;
- tipo *suessioide*: costituito soprattutto da organismi fossili, esistono anche forme viventi, presenta nove serie latitudinali di vescicole contenenti sottili placche di cellulosa;
- tipo *gonyaulacoide-peridinioide*: comune tra le dinoflagellate odierne, rappresenta la maggior parte dei reperti fossili. Sulla parete sono presenti sei serie latitudinali di vescicole contenenti placche di cellulosa, ben visibili;
- tipo *dinophysioide*: limitato solo alle specie viventi, anche se esistono due specie fossili che sembrano avere caratteristiche tipiche dei dinophysioidi. Questi organismi si riconoscono perché sono bilaterali, divisi da una sutura sagittale. In alcune specie dinophysioidi tropicali, come *Ornithocercus* e *Histioneis*, il cingolo e il solco sono sporgenti.
- tipo *prorocentroid*: anche questo tipo di tabulazione è limitato alle sole specie viventi e si differenzia dal tipo dinophysioide perché manca di cingolo e solco e i flagelli sono inseriti nel corpo cellulare sulla superficie anteriore;



**Figura 6** Morfologia di una dinoflagellata tipica. Il cingulum e il sulcus sono ombreggiati, il poro flagellare è nero.

- tipo *nannoceratopsioide*: con caratteristiche intermedie tra il tipo gonyaulacoideperidinioide e quello dinophysioide, è limitato alle sole specie fossili.

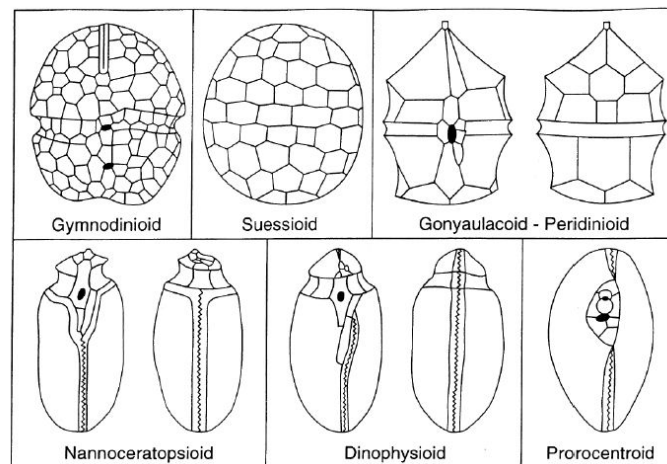


Figura 7 Tipi di tabulazione nelle dinoflagellate. In nero è evidenziato il poro flagellare.

Molte dinoflagellate planctoniche, tra cui *Ceratium* spp., *Peridinium* spp. e *Prorocentrum* spp., sono in grado di compiere migrazioni giornaliere lungo la colonna d'acqua alla ricerca di nutrimento. Ciò è regolato solo in parte dai ritmi circadiani di alternanza tra il giorno e la notte [28].

Almeno quattro generi di dinoflagellate, indicate come *zooxanthellae*, formano associazioni simbiotiche con altri organismi, tra cui protisti e invertebrati marini [29, 30]. La relazione simbiotica più studiata è quella tra la zooxantella *Symbiodinium* sp. e i coralli che formano la barriera corallina. Tra questi due organismi si stabilisce una simbiosi mutualistica, dalla quale il corallo trae vantaggio in quanto, grazie alla fissazione del CO<sub>2</sub> da parte di *Symbiodinium* sp., è in grado di calcificare molto più velocemente di quanto avviene in sua assenza [31], mentre la dinoflagellata riceve un notevole apporto di nutrienti dall'organismo ospite in acque altrimenti oligotrofiche. Questi fenomeni di simbiosi tra dinoflagellate ed altri organismi contribuiscono notevolmente al successo ecologico di entrambe le specie [32, 33].

Le dinoflagellate possiedono un consistente numero di caratteristiche genetiche che le differenziano dalle altre alghe eucariotiche [34]. In particolare, esse presentano un contenuto di DNA che varia dai 3 ai 250 pgDNA/cellula (circa 3000-215000 Mb), mentre la maggior parte delle alghe eucariotiche ne contiene in media circa 0.54 pgDNA/cellula [35]. È stato ipotizzato che ciò sia dovuto a fenomeni di poliploidia o di politenia [36]. Inoltre, il nucleo delle dinoflagellate varia nella forma (può essere circolare, tetragonale, triangolare, simile ad un rene o ad un ferro di cavallo), e può contenere un elevato numero di cromosomi (circa 143 in *Alexandrium fundyense*) che restano attaccati all'involucro nucleare durante la divisione cellulare [37]. I cromosomi sono tutti simili da un punto di vista morfologico [38] e durante il ciclo cellulare sono sempre condensati [39]. Tali organismi sono gli unici eucarioti il cui DNA contiene il 5-idrossimetiluracile, che sostituisce il 12-70% delle timine normalmente presenti nel DNA [40]. Altre basi anomale sono la 5-metilcitosina e, raramente, la N6-metiladenina [41].

Nel nucleo il DNA non è associato agli istoni ma sono presenti proteine basiche ad essi simili [34]. Infine sono assenti elementi regolatori della trascrizione tipici degli organismi eucarioti (come le TATA box e i siti di poliadenilazione) [42-44]. Circa la metà delle dinoflagellate conosciute in letteratura sono autotrofe. Tali organismi rivestono una

notevole importanza da un punto di vista economico ed ecologico. Alcune specie di dinoflagellate sono note per la loro capacità di produrre biotossine.

La fioritura di tale specie algali viene spesso indicata come marea rossa (o red tide), anche se questo termine non è corretto in quanto spesso la fioritura di tali organismi tossici non è associata a cambiamenti nel colore dell'acqua, che al contrario possono avvenire a seguito della fioritura di alghe non tossiche [45]. Per questo motivo si preferisce indicare tale fenomeno con il termine "*harmful algal blooms*" (o HABs, letteralmente fioriture di alghe tossiche). Negli ultimi anni, la frequenza, l'intensità e la distribuzione geografica delle HABs è aumentata, così come il numero di composti tossici trovati nella catena alimentare marina.

Tale aumento è dovuto sia alla disponibilità di un numero maggiore di dati, dovuto ad un maggiore interesse nei confronti delle specie algali, sia a diversi fenomeni economici e ambientali, quali il commercio e il conseguente trasferimento di riserve di molluschi da un'area all'altra del mondo, l'eutrofizzazione, un fenomeno causato dall'aumento di nutrienti nel corpo dell'acqua e i cambiamenti climatici [46].

Le tossine algali possono colpire gli uomini e gli altri mammiferi, gli uccelli marini, i pesci e molti altri organismi, ma il maggior impatto avviene quando gli organismi filtratori, come i molluschi, incorporano le specie tossiche, le cui tossine vengono accumulate a livelli tali da poter essere letali per tutti quegli organismi che si nutrono di essi [47]. La presenza di tali tossine ha un impatto non solo a livello ecologico, in quanto provocano la morte di numerosi organismi marini, ma anche a livello economico, determinando la sospensione della pesca e delle attività turistico-ricreative nelle aree interessate da HABs, causando perdite di ingenti somme di denaro che causando il tracollo di intere cooperative di mitilicoltori. Il problema delle HABs e dei fermi pesca è quindi da ritenersi un importante problema sociale.

Le dinoflagellate producono tossine in grado di contaminare mitili e pesci. In base alle sindromi da esse causate, vengono divise in cinque gruppi:

1. *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP): probabilmente la più diffusa tra queste sindromi, è dovuta alle saxitossine, una famiglia di composti guanidinici che si legano ai canali del Na, responsabili del flusso degli ioni Na e K all'interno delle cellule muscolari e nervose, impedendo così la trasmissione degli impulsi nervosi e di conseguenza provocando paralisi. Sembra che le tossine PSP siano prodotte dagli organismi del genere *Alexandrium* [48], ma, a questo genere appartengono anche specie non tossiche, alcuni ricercatori ritengono quindi che le tossine vengono in realtà prodotte da batteri simbiotici piuttosto che dalle dinoflagellate stesse [49]. Altre dinoflagellate capaci di produrre PSP sono *Gymnodinium catenatum* [50] e *Pyrodinium bahamense* var *compressum* [51]. Il fenomeno delle PSP interessa tutto il mondo, in quanto sono state ritrovate in Nord e Sud America, sulle coste del Giappone, del Nord Europa e del Mediterraneo. In particolare in Italia la loro presenza è stata determinata già dal 1994 in Emilia Romagna [52, 53], nel 2001 in Friuli Venezia Giulia [54] e nel 2002 nel Golfo di Olbia (Sardegna) [55].

2. *Diarrhoeic Shellfish Poisoning* (DSP), di cui tratterò nel paragrafo successivo.

3. *Neurologic Shellfish Poisoning* (NSP): è causata da una tossina che prende il nome di *brevetossina* e che è prodotta da *Gymnodinium breve*. Tale composto è tossico per i pesci, i mammiferi marini, gli uccelli e gli uomini, ma non per i molluschi. Una caratteristica peculiare della brevetossina è la formazione di aerosol tossici dovuti al movimento ondoso delle acque, che possono portare a sintomi simili a quelli dell'asma negli uomini. Si ritiene che *G. breve* sia endemico del Golfo del Messico, altre dinoflagellate appartenenti al genere dei *Gymnodiniales* sono presenti in Giappone, Russia, Sud Africa, Nuova Zelanda [56].

4. *Azaspiracid Shellfish Poisoning* (AZA): recentemente è stata associata alla presenza della specie eterotrofica *Protoperidinium crassipes* [57]. Tale sindrome è dovuta alla presenza di neurotossine liposolubili, che danno sintomi

molto simili a quelli dovuti a DSP, con le quali vengono spesso confuse. Test di laboratorio condotti su topi hanno dimostrato che tali tossine sono in grado di danneggiare il fegato, l'intestino, i tessuti linfoidei e di causare tumori polmonari [58]. Questi composti sono in grado di causare apoptosi e di inibire la sintesi proteica in una coltura cellulare [59]. Tra le tossine azaspiracide la prima ad essere stata identificata è la KT-3, isolata nel 1995 in seguito ad intossicazione di 9 persone in Olanda che avevano consumato esemplari di *Mytilus edulis* allevati in Irlanda [60].

5. *Ciguatera Fish Poisoning* (CFP): questa sindrome è nota già da secoli, in quanto sono state riportate già nelle Indie occidentali nel 1511 da Peter Martyr de Anghera, nelle isole dell'oceano Indiano da Harmansen nel 1601 e in diversi arcipelaghi dell'oceano Pacifico da De Quiros nel 1606 [61]. Le zone endemiche sono soprattutto le regioni tropicali e subtropicali dell'oceano Pacifico, le regioni insulari dell'oceano Indiano e dei Caraibi tropicali, ma anche aree costiere continentali sono affette [62]. In passato le popolazioni indigene erano le sole ad essere interessate da tale sindrome. Tuttavia, con l'aumentare del commercio e del consumo di specie marine provenienti da zone diverse del mondo e del turismo internazionale, essa si è estesa a tutto il mondo. Si stima che tra le 10000-50000 persone all'anno sono affette da tale patologia, che perciò è diventata un problema sanitario globale. Il nome ciguatera è stato dato da Don Antonio Parra nel 1787 quando si ebbe un'intossicazione a Cuba in seguito al consumo di un mollusco univalve, il *Turbo pica*, il cui nome spagnolo è "cigua" [63]. Le ciguatossine sono polieterei liposolubili dalla struttura carboniosa molto complessa. Sono molecole resistenti al calore e la loro tossicità persiste anche dopo cottura o esposizione a condizioni acide o basiche. Le ciguatossine derivano dalla biotrasformazione nei pesci delle gambiertossine. Queste ultime sono prodotte dalla dinoflagellata *Gambierdiscus toxicus*, che sintetizza due tipi di tossine diverse: le *maitotossine* (o MTX), che sono state isolate prevalentemente nell'intestino dei pesci erbivori e che non sono coinvolte nelle CFP, e le ciguatossine.

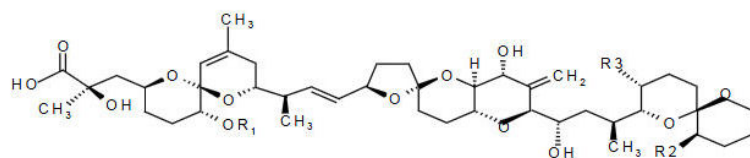
Queste vengono accumulate lungo la catena alimentare a partire dai pesci erbivori che pascolano lungo la barriera corallina per poi accumularsi negli organi dei pesci carnivori che si nutrono di essi [64]. La *G. toxicus* è stata per la prima volta identificata nel 1970 vicino alle isole Gambier. Essa vive in associazione con le alghe brune e verdi o libero nei sedimenti e nei frammenti di coralli [46]. La mancanza di fenomeni visibili sulla superficie marina associati alla fioritura di *G. toxicus* ha contribuito alla diffusione delle CSP [63].

Esiste infine un'altra sindrome causata da tossine marine, che però sono prodotte da alcune specie di diatomee, tra cui *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* [46].

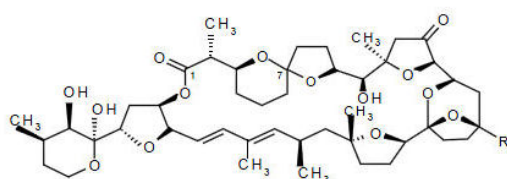
Tale patologia è comunemente indicata come *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP), ed è stata riscontrata per la prima volta nel 1987 in Canada, dove si ebbero 105 casi in seguito al consumo di *Mytilus edulis* contaminati. I sintomi che la caratterizzano sono crampi addominali, vomito, disorientamento e amnesia. L'agente eziologico che causa l'ASP è l'acido domoico [46]. Sono stati riscontrati casi di ASP anche lungo le coste occidentali degli Stati Uniti, in Giappone e Nuova Zelanda. Nel Golfo di Napoli è stata documentata la presenza di *P. multistriata*, capace anch'essa di produrre acido domoico [65]. La descrizione tassonomica delle diverse specie di dinoflagellate è basata sulla descrizione morfologica dei diversi organismi, ed in particolare sul numero, la forma e le dimensioni delle placche che ricoprono la superficie cellulare. Tale approccio è molto difficile e dispendioso, sia da un punto di vista temporale che economico, e in più è soggetto a molti errori in quanto molte specie differiscono tra loro per pochi caratteri morfologici. Per questo motivo negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi molecolari per la caratterizzazione delle dinoflagellate, basati in particolare sul sequenziamento del DNA di tali organismi, che si sono rivelati uno strumento utile e meno costoso rispetto a quello precedente [66-68].

## 1.3.1 LE BIOTOSSINE DSP

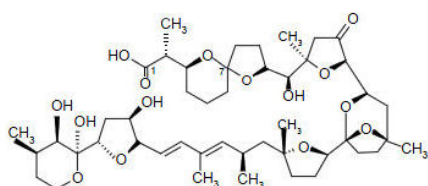
Le tossine che causano la sindrome diarroica, oggetto di questo lavoro, vengono divise in diverse classi in base alla loro struttura chimica, **Figura 8**. Le DSP sono state isolate per la prima volta nel 1976 in Giappone dove hanno causato



	R1	R2	R3
okadaic acid (OA)	H	H	CH <sub>3</sub>
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH <sub>3</sub>	H
dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



	R	C-7
Pectenotoxin-1 (PTX1)	CH <sub>2</sub> OH	R
Pectenotoxin-2 (PTX2)	CH <sub>3</sub>	R
Pectenotoxin-3 (PTX3)	CHO	R
Pectenotoxin-4 (PTX4)	CH <sub>2</sub> OH	S
Pectenotoxin-6 (PTX6)	COOH	R
Pectenotoxin-7 (PTX7)	COOH	S



	C-7
Pectenotoxin-2 seco acid (PTX2SA)	R
7-epi-PTX2SA	S

**Figura 8** Struttura chimica dell'acido okadaico, delle dinofisitossine e delle pectenotossine

(DTX1, DTX2 e DTX3), che di norma sono prodotte dalle dinoflagellate appartenenti al genere *Dinophysis* e *Prorocentrum* [69]. Queste tossine sono composti lipofili che si accumulano nei tessuti grassi dei molluschi e che provocano nell'uomo infiammazioni al tratto gastro-intestinale [46]. E' stato dimostrato in test con modelli animali che l'acido okadaico e la DTX1 sono promotori tumorali [70].

Il secondo gruppo è costituito dalle tossine neutre che prendono il nome di *pectenotossine*, anche queste causano diarrea. Dieci pectenotossine sono state isolate fin'ora e sei di queste sono state chimicamente identificate: PTX1, -2, -3, -4, -6 e -7. Dal momento che PTX2 è stata trovata solo nel fitoplancton (*D. fortii* in Giappone e in Europa) e mai nei molluschi, si ipotizza che un'ossidazione nell'epatopancreas del mollusco produca altre PTX (PTX1, PTX3 e PTX6) [71-73].

L'ultimo gruppo è invece costituito dalle *yesotossine*, composti contenenti zolfo che non causano diarrea, ma

molti problemi alla pesca di capesante (*Pecten jacobaeus*). Tra il 1976 e il 1982, circa 1300 casi di presenza di DSP sono stati riportati in Giappone, nel 1981 più di 5000 casi sono stati registrati in Spagna e nel 1983 circa 3300 in Francia. Nel 1984, le DSP hanno causato il blocco dell'industria dei molluschi per circa un anno in Svezia. E' noto che le DSP sono distribuite in Giappone, Europa, Cile, Thailandia, Scozia e molto probabilmente in Australia e Nuova Zelanda [46]. Le tossine DSP sono liposolubili e vengono accumulate nei tessuti grassi dei bivalvi, gli effetti sull'uomo, causati dall'ingestione di molluschi contaminati, è evidente dopo 30 minuti ad alcune ore dopo l'ingestione e il completo ricovero avviene entro i 3 giorni dall'avvenuta intossicazione.

Il primo gruppo comprende le tossine acide, tra cui l'acido okadaico (OA) e i suoi analoghi, le dinophysitossine

attaccano il muscolo cardiaco di topi a seguito di iniezione intraperitoneale. Se ossidate invece danneggiano il fegato [70]. Una rivalutazione della loro tossicità, probabilmente porterà a togliere queste tossine dal gruppo delle DSP [74].

Le tossine appartenenti al gruppo acido sono potenti inibitori fosfatasi e questa proprietà è correlata all'infiammazione del tratto intestinale nell'uomo [46, 73]. DTX 1 è stata isolata per la prima volta in Giappone, nella dinoflagellata *Dinophysis fortii*; DTX2 è stata identificata in molluschi provenienti dall'Irlanda durante episodi di DSP [70]. Essa è stata anche isolata da una biomassa fitoplanctonica principalmente formata da *Dinophysis acuta* [75]. Un nuovo isomero della DTX2, denominato DTX2B è stato isolato da estratto di mitili prelevati in Irlanda [76]. DTX3 originariamente descriveva un gruppo di derivati delle tossine DSP dove i saturi o insaturi gruppi grassi acilici sono attaccati al gruppo 7-OH della DTX1. Da 6 anni circa è stato dimostrato che sia l'OA, sia la DTX1 che la DTX2 possono essere acilate da saturi o insaturi gruppi grassi dal C<sub>14</sub> al C<sub>18</sub> [46, 77]. Un rapporto dell'EU dichiara che la lunghezza degli acidi grassi può variare da C<sub>14</sub> al C<sub>22</sub> e che il numero delle non saturazioni può variare da 0 a 6. L'acido grasso predominante in DTX3 è l'acido Palmitoyl [78], che mostra anch'esso di avere attività tossica. Dal momento che questi composti sono stati individuati nella ghiandola digestiva di mitilo contaminato, è presumibile supporre che DTX3 sia un prodotto metabolico e non un prodotto *de novo* prodotto dalle microalghe [77].

[79] hanno dimostrato la trasformazione di DTX1 a 7-O-acyl-DTX1 (DTX3) in *Patinopecten yessoensis*. Il legame estere del composto acilato può essere idrolizzato scaldandolo a 75°C per 40 minuti in una soluzione 0.5 M NaOH/metanolo al 90%. Il legame estere in DTX3 può essere facilmente idrolizzato da lipasi e colesterolo-esterasi [78]. Due naturali esteri-derivati, chiamati diol-esteri sono stati isolati in alcune specie di *Prorocentrum*. *In vitro* non hanno un effetto inibitorio sulle fosfatasi, ma va notato che i gruppi allylic diol -esteri possono essere idrolizzati e divenire composti attivi con effetto DSP [46]. Draisci *et al.* [80] riporta il rilevamento di un altro isomero dell'OA, il DTX2C e sebbene la sua struttura non sia stata completamente ricostruita, questo composto è stato isolato da *D. acuta* raccolta in acque irlandesi.

## 1.3.2. METODI DI RILEVAMENTO DELLE BIOTOSSINE DSP

Ad oggi bisogna dire che non esistono metodi di rilevazione delle tossine DSP universalmente accettati dalla Comunità Scientifica [81]. Purtroppo qualsiasi metodica applicata presenta delle problematiche di non poca importanza e vi è una reale difficoltà nell'eliminazione di tali ostacoli.

Per avere una completa panoramica di quelli che sono i metodi sviluppati per il rilevamento delle biotossine marine, rimando il lettore al report della FAO sulle biotossine marine [82]. Di seguito sono riportati i principali.

Tra i saggi *in vivo*, il più diffuso è il test sul topo [83, 84] che viene riconosciuto dalla EU con la direttiva 91/492/CEE e dalla Legislazione italiana con il D.Lgs 530/92, poi modificato dal decreto n. 165/2002.

Il test prevede l'estrazione con acetone e può essere utilizzato per individuare acido okadaico, dinophysitossine, pectenotossine e yessotossine. Il test può essere, se necessario, completato mediante fasi di separazione liquido/liquido con acetato d'etile/acqua o diclorometano/acqua per eliminare potenziali interferenze. Per ogni test occorre utilizzare tre topi. La morte di due topi su tre entro 24 ore dall'inoculazione di un estratto equivalente a 5 g di epatopancreas o 25 g del corpo intero (in ciascun topo) deve essere considerato un risultato positivo per la presenza di una o più tossine di cui all'art. 1 a livelli superiori a quelli fissati dagli articoli 2, 3 e 4. L'estrazione del materiale di prova con acetone mediante separazione liquido/liquido con etere etilico non consente la determinazione completa di yessotossine e azaspiracidi in quanto perdite di tali tossine possono verificarsi nella fase di separazione.

La tossicità del campione espresso in Mouse Unit/g dell'intero tessuto (MU/g whole tissue) è determinato dalla minor dose alla quale due o più topi muoiono nelle 24 ore successive all'iniezione. In molti paesi, il livello regolato è di 0,05 MU/g whole tissue. Un report della FAO [85] stabilisce come provvisorio livello di riferimento per un'intossicazione acuta di tossine DSP una dose di 0,33 µg OA equ/kg bw, tale livello soglia è ottenuto sulla base di dati forniti da diversi Paesi. Non è possibile, come affermato nello stesso report, stabilire invece il quantitativo di possibile ingestione quotidiana di campioni DSP contaminati, in quanto non sono disponibili sufficienti dati sugli effetti cronici. Attraverso il Mouse test tutte le componenti DSP sono rilevabili, incluse quelle che non causano diarrea (PTX e YTX) e hanno un effetto sull'uomo ad oggi non completamente delucidato. E' importante sottolineare che questo saggio ha lo svantaggio della mancanza di specificità in quanto non è in grado di differenziare le diverse componenti delle tossine DSP), risente della soggettività della cavia in risposta dell'iniezione, inoltre il mantenimento e l'uccisione delle cavie di laboratorio oltre ad essere dispendioso, pone crescenti problematiche e dubbi etici sull'applicazione di questo test. In più il saggio richiede diverso tempo e può fornire falsi positivi dovuti alle interferenze con altri composti lipidici, come ad esempio acidi grassi liberi che sono molto tossici per i topi [86] e mostra notevoli differenze se l'estratto proviene dal corpo intero o dal solo epatopancreas [87] e [70]. Una variante del test del topo di Yasumoto è il test sui ratti, anch'esso riportato negli stessi testi legislativi del primo. Esso si basa sull'induzione diarroica nei ratti. I ratti, mantenuti in una condizione di digiuno, vengono alimentati con tessuto di mollusco sospettato di essere DSP contaminato e addizionato alla loro normale dieta. Essi vengono osservati per 16 ore al fine di rilevare la consistenza delle feci o comportamenti di rifiuto del cibo. Una reazione diarrogena dei tre ratti è considerata risultato positivo della presenza di acido okadaico, tossine da dinoflagellate e azaspiracidi a livelli superiori a quelli di cui all'art. 2 e all'art. 4. Questo metodo è semi-quantitativo e non rileva PTX e YTX [46, 70]. Il test del ratto è d'uso comune in Olanda ed è riconosciuto dalla legislazione dell'EU.

Un altro metodo introdotto per il rilevamento dell'OA è il saggio su *Daphnia magna*. Il metodo di estrazione permette la determinazione dell'OA e del DTX1. Risulta essere economico e sensibile, a volte viene usato in sostituzione del test del topo in quanto ha un limite di rilevazione di OA dieci volte inferiore al test del topo [88].

La cromatografia liquida combinata con la spettrometria di massa a ionizzazione di elettrospray (LC-ESI-MS) è il più sensibile e rapido test per la rilevazione di OA tra quelli analitici [46]. Nondimeno però standard analitici puri e materiali di riferimento sono difficilmente recuperabili e pronti all'uso immediato, questo è il principale svantaggio che non elegge i metodi analitici a test validati di consuetudine per il rilevamento di tossine DSP [82].

Successivamente sono stati messi a punto saggi di rilevazione di tipo biochimico che si sono rivelati essere sensibili, veloci e semplici da applicare. Ci sono infatti numerosi test immunodiagnostici per le biotossine, ad esempio per le DSP sono stati messi a punto test basati sugli anticorpi anti-OA. Numerosi kit di *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) o basati su biosensori ottici che riconoscono specifici anticorpi sono in vendita già da diversi anni e sono stati ampiamente validati [81]. Nonostante siano test molto sensibili, specifici e veloci rispetto alla cromatografia liquida, essi presentano lo svantaggio di essere in grado di rilevare solo le sostanze che possiedono una specifica struttura chimica riconosciuta dagli anticorpi, non fornendo quindi informazioni sulla presenza di analoghi risultanti dalle trasformazioni biochimiche operate dal metabolismo dei mitili.

Tra i metodi *in vitro* vorrei ricordare il saggio di inibizione enzimatica della protein-fosfatasi (PP2A), sviluppato da Tubaro *et al.*[89]. Il saggio sfrutta la capacità della PP2A di defosforilare un substrato incolore (p-nitrophenyl phosphate, p-NPP) in un medium alcalino, ottenendo un prodotto (p-nitrophenol, p-NP) di colore giallo, rilevabile con uno spettrometro. Questo metodo è sensibile, rapido e non richiede materiali costosi, ma il principale svantaggio è la necessità di disporre di enzimi di buona qualità e prontamente disponibili e l'impossibilità di fornire informazioni sul profilo tossico [82].

## 1.4 MEDOTOLOGIE MOLECOLARI PER L'ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

Nel mitilo, come in altri organismi, le risposte funzionali indotte, così come i processi fondamentali per la crescita e la riproduzione, si basano sull'espressione di geni specifici e quindi di proteine che agiscono opportunamente a livello sub-cellulare, cellulare e tissutale [90].

Anche le risposte difensive verso potenziali patogeni (virus, batteri, parassiti) e le modulazioni funzionali che si stabiliscono in condizioni critiche (es. temperatura elevata, ipossia, tossine algali) dipendono dall'espressione di geni e proteine (es. peptidi antimicrobici, citochine, proteine del complemento).

Lo studio dell'espressione genica costituisce un approccio originale e promettente per studiare come gli organismi reagiscono o si adattano ai cambiamenti dell'ambiente esterno. La valutazione dell'espressione genica a seguito dell'esposizione ad agenti chimici può avere svariate applicazioni, quali:

- Classificazione dei contaminanti. Composti strutturalmente non correlati possono essere inclusi in una stessa classe chimica in base alla somiglianza delle conseguenze tossicologiche provocate. Hamadeh *et al.* [91] hanno effettuato uno studio sul fegato di ratti esposti ad una pluralità di composti, dimostrando come sostanze appartenenti ad una stessa classe chimica producano simili, ma tuttavia distinguibili profili di espressione genica. Analoghi risultati sono stati ottenuti da Waring *et al.* [92], i quali hanno dimostrato come epatotossine con simile meccanismo tossico producano un simile profilo di espressione genica nei ratti, pur non mostrando una identità completa. Steiner *et al.* [93], analizzando i profili di espressione genica in ratti trattati con epatotossine, hanno dimostrato inoltre la capacità predittiva dei profili di espressione genica, in quanto essi permettono di classificare correttamente il trattamento a cui è stato sottoposto l'organismo. In generale, questo tipo di studi rende possibile individuare potenziali geni marcatori di esposizione a determinati contaminanti.
- Identificazione della funzione di geni non noti. Gruppi di geni coespressi o affini per profilo di espressione possono rivelarsi simili per funzione, regolazione o localizzazione [94]. La loro individuazione apre la strada alla caratterizzazione di nuovi geni coinvolti nei meccanismi di tossicità o di difesa dagli xenobiotici, a partire dai geni a funzione già nota.
- Comprensione dei meccanismi di tossicità. Lo studio dei profili di espressione generati in risposta ai vari contaminanti può essere utile per meglio comprendere gli aspetti ecologici, fisiologici, strutturali e funzionali dei sistemi ambientali e degli organismi che li compongono [95-99].

L'individuazione di biomarker dello stress a livello sub-cellulare e cellulare rappresenta un approccio integrato che può contribuire a determinare la tossicità di sostanze inquinanti, partendo dal presupposto che i pattern molecolari attivati in loro presenza porterebbe a indicare precocemente un segnale di allerta correlato agli effetti tossici di alcuni composti sugli organismi oggetto di studio [100, 101].

## 1.4.1 MICROARRAY DI DNA

Il sequenziamento sistematico di librerie di cDNA si è rivelato il metodo più efficace per l'identificazione di nuovi geni e per la determinazione del profilo trascrizionale [102-104]. Infatti è sufficiente una breve sequenza di circa 300-400 bp (detta Expressed Sequence Tag, EST) per individuare in modo univoco un singolo cDNA e quindi il trascritto corrispondente [105]. L'applicazione dei microarray per l'analisi dell'espressione genica è stata presentata per la prima volta nel 1995 [106] e da allora sono stati pubblicati migliaia di lavori che l'hanno utilizzata come metodica di analisi.

Nonostante richieda, un lavoro iniziale di selezione delle sonde che compongono il microarray, abbastanza impegnativo, consente di esaminare il profilo d'espressione di un gene o di identificare la presenza di un gene o di una EST all'interno di una miscela di migliaia di geni (spesso anche tutto il patrimonio genetico di un organismo).

Per la costruzione dell'array viene selezionato un clone rappresentativo per ogni trascritto che andrà a costituire un archivio permanente. Il cDNA di ciascun clone viene poi amplificato mediante PCR con *primer* universali, purificato, sequenziato e infine depositato su un apposito supporto. Ecco che un microarray di DNA (conosciuto come gene chip, biochip o matrice ad alta densità) è costituito da un insieme di microscopiche sonde di DNA che vengono permanentemente legate a un supporto, che può essere un vetrino, di plastica o un chip di silicio. I microarray sfruttano una tecnica di ibridazione inversa, che consiste nel fissare tutti i segmenti di DNA (sonde) su un supporto. Le sonde vengono quindi denaturate e convertite in elica singola, per permettere l'ibridazione con il cDNA marcato di interesse, nel caso di piattaforme di vetro o direttamente sintetizzate sui chip. L'acido nucleico che vogliamo identificare viene marcato mediante sostanze radioattive (questo accadeva in passato per i microarray a bassa densità) o fluorescenti. Quest'ultima marcatura può essere effettuata utilizzando coloranti fluorescenti (Cy3 e Cy5) coniugati alla base azotata di un nucleotide e quindi direttamente incorporati durante la reazione di retrotrascrizione (marcatura diretta), oppure i fluorofori si possono legare in seguito ad un nucleotide modificato che è stato fornito durante la reazione di retrotrascrizione (marcatura indiretta) [107]. Nelle piattaforme di questo tipo l'uso di due fluorofori diversi (Cy3 e Cy5) permette di ibridare in modo competitivo due campioni sullo stesso vetrino, eliminando così molti fattori di variabilità che possono presentarsi confrontando esperimenti diversi ed aumentando quindi l'accuratezza dell'analisi comparativa. Il risultato è una misura di abbondanza relativa dei diversi trascritti presenti, ottenuta confrontando i segnali di fluorescenza del campione test e del campione di riferimento [108]. Nella tecnologia Affymetrix® il target utilizzato è l'mRNA di un determinato organismo che viene amplificato (aRNA) e marcato con un fluorocromo, quale la biotina. L'ibridazione dell'*array* di ologonucleotidi non è competitiva (un campione alla volta) ed è rilevata allo *scanner* tramite l'aggiunta di un composto fluorescente della streptavidina, che si lega ai gruppi di biotina incorporati nelle molecole di aRNA. In questo modo il segnale di intensità di fluorescenza rappresenta una misura assoluta dell'espressione genica [107]. I microarray possono essere fabbricati usando diverse tecnologie, come la stampa di micro solchi, con un particolare microspillo appuntito su una lastrina di vetro dove verrà legata covalentemente la sonda ottenuta per clonazione, questa tecnica viene detta fotolitografia; usando maschere preformate e acquistate da ditte specializzate. Le recenti tecniche che utilizzano una matrice di silicio invece che il supporto vetroso, hanno il vantaggio di avere un'alta riproducibilità della sintesi *in situ* e l'elevata qualità dei *chip* Affymetrix® permettono di confrontare i dati provenienti da laboratori diversi e di analizzare isoforme diverse dello stesso gene.

Il primo genoma eucariotico completato con analisi di microarray fu quello di *Saccharomyces cerevisiae* nel 1997 [109].

I *microarray* possono essere visti come un'evoluzione di metodiche classiche applicate da anni sia in biologia molecolare che cellulare, con particolare riferimento alle tecniche di ibridazione degli acidi nucleici (*Southern* e *Northern Blot*) e all'uso della microscopia a fluorescenza (*FISH*). Infatti, l'idea di utilizzare matrici di DNA per l'identificazione e la quantizzazione degli acidi nucleici è stata proposta da Southern già nel 1994 [110], utilizzando come substrato le membrane porose di nitrocellulosa o nylon.

La peculiarità dei microarray è l'utilizzo di piattaforme molto compatte che consentono di legare un numero elevato di frammenti di DNA occupando una superficie ridotta. Sebbene tale tecnologia si basi su metodiche già esistenti, per la sua realizzazione è stato necessario il completamento di progetti di sequenziamento sistematico, che hanno permesso il

clonaggio di cDNA; di sistemi robotizzati ad alta precisione per la deposizione del DNA ad alta densità su piccoli supporti; di fluorofori adatti per la marcatura e l'avvento di tecniche semplici e affidabili per la rilevazione dei segnali di fluorescenza.

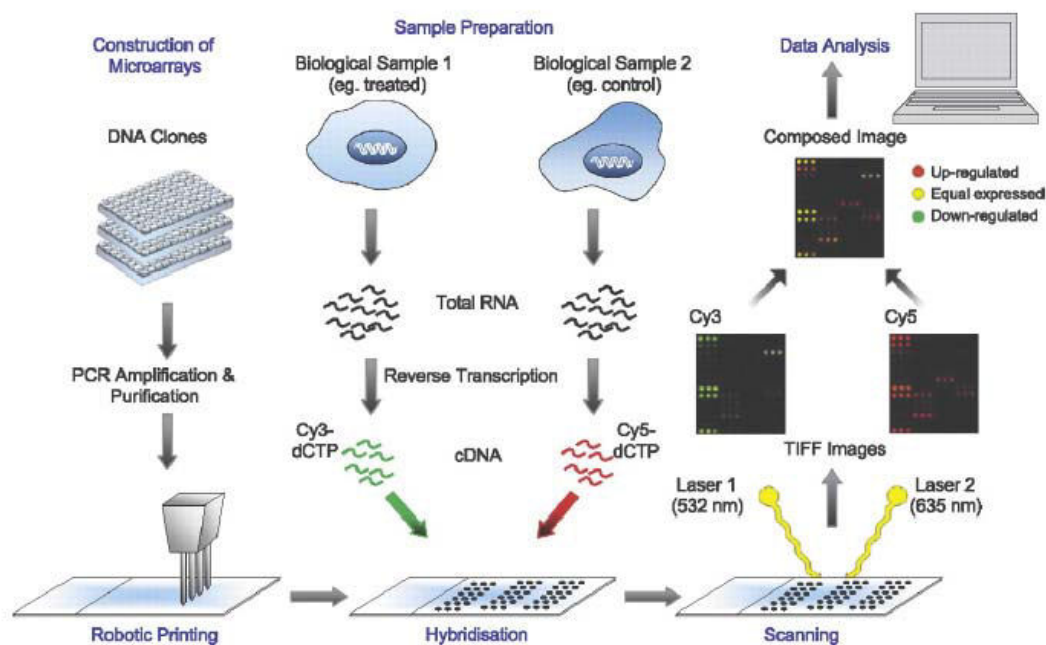


Figura 9 Fasi di un esperimento di ibridazione su su microarray su supporto di vetro ( tratto da <http://www.anst.uu.se>). Da sinistra a destra sono riportate: la preparazione del microarray di DNA, la preparazione dei due campioni da sottoporre a ibridazione competitiva e l'analisi dei dati per produrre i risultati.

Una breve descrizione delle principali fasi di impiego di un microarray sono riportate in **Figura 9**. Come brevemente descritto sopra, viene preparato un *target* a partire dall'RNA totale del campione d'interesse. Questo *target* viene marcato con fluorescenza e viene fatto ibridare al DNA precedentemente immobilizzato su di un supporto solido. In seguito viene misurata la fluorescenza emessa da ogni singolo *spot* in cui l'ibridazione è avvenuta: l'intensità del segnale fluorescente che si genera è un indice diretto dell'abbondanza di ogni singolo trascritto. In questo modo si ottengono i dati di espressione di più geni contemporaneamente.

Monitorare l'espressione genica non consiste nella determinazione della concentrazione assoluta di ogni trascritto cellulare, bensì nella rilevazione dell'abbondanza relativa di ogni specie di RNA in due campioni diversi. Con questo approccio è possibile, ad esempio, paragonare i livelli di espressione genica nei diversi tessuti di un organismo allo scopo di identificare i trascritti tessuto-specifici [111], oppure identificare specifici cluster genici che vengono attivati o repressi in particolari situazioni stressanti [112] o durante le fasi del ciclo cellulare [113].

Sebbene tra i microarray, siano generalmente utilizzati supporti planari, una recente alternativa definita "bead array" prevede l'utilizzo di una collezione di microscopiche biglie di polistirene, ciascuna delle quali con una specifica sonda marcata con due o più marcatori che non interferiscono con il fluoroforo usato per marcare la sequenza target. Le biglie

vengono completamente impregnate con diverse concentrazioni di fluorofori. Un rilevatore ottico registra in tempo reale le emissioni fluorescenti correlate agli eventi di ligazione che avvengono sulla superficie delle biglie stesse.

Proprio a causa delle diverse strategie utilizzate per la costruzione dei microarray, delle differenze tra diverse piattaforme e del gran numero di informazioni ottenute dall'analisi bioinformatica dei dati, i ricercatori hanno la necessità di avere degli *standard* che permettano loro di interpretare i risultati in modo indipendente. L'Istituto Europeo di Bioinformatica (EBI) ha sviluppato la guida MIAME: *Minimum Information about a Microarray Experiment*, in cui vengono descritte le informazioni minime necessarie a questo scopo [114].

La valutazione dei cambiamenti nei profili trascrizionali si propone come un potente strumento per ampliare lo studio degli effetti degli xenobiotici ambientali in organismi sentinella come il mitilo.

Sebbene in uno stesso organismo tutte le cellule possiedano lo stesso corredo genetico, ogni cellula produce trascritti diversi a seconda del tipo di tessuto a cui appartiene e alle condizioni ambientali a cui è sottoposta. E' fondamentale comprendere che i geni sono regolati sia in condizioni fisiologiche, che in risposta a fattori di stress.

La conoscenza della sequenza del genoma di un organismo non è sufficiente per comprendere come i geni nel loro insieme possano modulare le molteplici attività delle cellule di un organismo. E' in base al trascrittoma che nelle cellule si definisce il contenuto di proteine e si realizzano le risposte funzionali. Quando gli organismi cambiano il loro stato durante lo sviluppo o in seguito a uno stimolo esterno, il profilo di espressione genica viene alterato in relazione alle risposte funzionali che vengono coinvolte [115]. Lo studio dei cambiamenti dell'espressione genica in seguito all'esposizione a biotossine, ad esempio, può quindi permettere una migliore comprensione dei meccanismi di tossicità coinvolti e permettere l'identificazione di nuovi marcatori che possano affiancare quelli già in uso.

Oggi, lo sviluppo delle conoscenze di genomica, proteomica e bioinformatica si vanno estendendo da organismi modello molto studiati a specie di interesse per gli studi e il monitoraggio dell'ambiente sia acquatico che terrestre.

Vi sono numerosi lavori che dimostrano come i microarray siano utili al fine di analizzare sia le risposte difensive nei confronti di potenziali patogeni o in particolari condizioni ambientali.

Ad esempio, *Hypomesus transpacificus* è un pesce pelagico a rischio di estinzione ed endemico dell'estuario di San Joaquin-Sacramento (CA, USA). Esso è considerato un indicatore dello stato di salute ecosistemico. La presenza del rame, potente contaminante, presente nelle acque californiane, minaccia lo sviluppo e la sopravvivenza di questa specie. La combinazione sperimentale di biomarcatori molecolari ha permesso l'interpretazione delle risposte in un contesto funzionale che potrebbe essere utilizzato per la predizione degli effetti dannosi da esposizione del rame. Tale analisi è stata condotta sviluppando un microarray specifico per la specie che ha consentito di operare uno screening per individuare i marcatori molecolari più adatti al fine di essere impiegati in programmi di monitoraggio [116].

Uno studio condotto su ratto, utilizzando una piattaforma Affymetrix di oligonucleotidi, ha dimostrato una profonda alterazione nell'espressione genica in individui esposti a esa-cloro-benzene (HCB). E' stata individuata un'induzione degli enzimi implicati nel metabolismo degli xenobiotici, una sovraespressione dei geni codificanti per le citochine, per proteine della risposta infiammatoria e della via del complemento [117].

L'influenza sull'espressione genica delle diverse situazioni ambientali è particolarmente evidente nell'ecosistema acquatico dove gli organismi sono continuamente esposti a condizioni variabili. Piccole alterazioni della composizione dell'acqua, della temperatura, dei gas disciolti e delle sostanze presenti, compresi gli inquinanti, possono avere profondi effetti sull'espressione genica.

Nell'ostrica americana (*C. virginia*) la produzione di cDNA e il sequenziamento sistematico ha portato a individuare geni implicati nei meccanismi della risposta immunitaria e nella risposta a xenobiotici tossici [118]. Nel 2007 Jenny *et al.* hanno pubblicato un *microarray* di cDNA specifico per l'ostrica [119].

Per *Danio rerio*, nel 2003, è stata creata una piattaforma di cDNA costituita da 4512 geni rappresentativi di tessuti adulti ed embrionali (cuore e muscolo scheletrico) e con esperimenti di ibridazione è stato possibile analizzare come variano i profili di espressione genica in risposta a situazioni di ipossia e quali sono i meccanismi coinvolti durante lo stress [120]. Recenti studi, utilizzando sempre la tecnologia dei *microarray*, hanno evidenziato specifici profili di espressione causati in *Danio rerio* a seguito di infezioni di *Salmonella* [121] e a seguito dell'esposizione a bisfenolo [122]. Analogamente altri studi hanno fornito numerose indicazioni per comprendere gli effetti dei pesticidi sull'attività estrogenica nel persico trota *Micropterus salmoides* [122] o per approfondire le conoscenze sulla regolazione della riproduzione del pesce rosso [123].

Sono stati valutati i meccanismi di acclimatazione di *Gillichthys mirabilis* [124] e l'alterazione dell'espressione genica indotta dai cambiamenti di temperatura in *Mytilus edulis* [125]. Utilizzando una piattaforma di 160 geni del teleosteo marino *Platichthys flesus*, un pesce che è spesso utilizzato per studi di biomonitoraggio, è stato possibile individuare nuovi marcatori molecolari, per la valutazione dello stress dovuto alla presenza di inquinanti, quali idrocarburi policiclici aromatici, metalli pesanti, xenoestrogeni [126]. Inoltre sono stati analizzati gli effetti di inquinanti di vario tipo sul profilo di espressione genica di *Mytilus galloprovincialis* [127, 128].

Bisogna comunque tener presente che l'analisi dell'intero trascrittoma non basta a fornire una visione completa dell'attività genica: diversi esperimenti hanno evidenziato situazioni di disparità tra i livelli di mRNA e le corrispondenti proteine [129]. Per questo lo studio del proteoma, ovvero l'insieme delle proteine presenti nella cellula, sta assumendo un ruolo di primaria importanza, anche nella definizione dei meccanismi di controllo dell'attività genica. Sono di recente impiego anche i *microarray* di proteine (detti anche *biochip*, *proteinchip*, *protein microarray*). Essi vengono ottenuti fissando su un *microarray* differenti proteine, come viene fatto con le sonde. I *microarray* di proteine sono usati per identificare le interazioni proteina-proteina o, ad esempio, per identificare i substrati delle proteine chinasi o per identificare gli obiettivi di piccole molecole biologicamente attive. Le proteine più comunemente usate sono gli anticorpi monoclonali, che vengono usati come sonde per rilevare le proteine del lisato cellulare. L'uso di anticorpi monoclonali però ha dei limiti, infatti non esistono anticorpi per la maggior parte delle proteine e l'utilizzo di queste piattaforme prevede che l'estrazione delle proteine dal campione di interesse sia assicurata. Tale cosa non è sempre scontata considerando che quando si studia un organismo che non sia modello, di cui poco si conosce riguardo il profilo proteico, è possibile commettere errori e non estrarre tutte le proteine presenti. Grande limite e difficoltà che si presenta nell'utilizzo delle proteine è proprio la loro solubilizzazione in idonee soluzioni. Più recentemente, ci si sta spingendo verso altri tipi di molecole da usare come sonde, quali peptidi di piccole, medie e grandi dimensioni. Tuttavia, oggi gli anticorpi rappresentano ancora la sonda più efficace per i *microarray* di proteine. Tali piattaforme sono utilizzate nelle applicazioni biomediche per determinare la presenza e/o la quantità di proteine in campioni biologici, ad esempio nel sangue. Anche se i *protein microarray* usano metodi di rilevazione simili ai DNA *microarray*, essi presentano un altro problema: le concentrazioni delle proteine in un campione biologico può presentare molti ordini di grandezza di differenza da quello degli mRNA. Di conseguenza, i metodi di rilevazione dei *protein microarray* devono avere una gamma molto più vasta di rilevazione. Comunque il metodo preferito di rilevazione è ancora quella a fluorescenza, poiché è sicuro, sensibile e può dare alte risoluzioni.

Nonostante i mitili siano utilizzati da diversi decenni come indicatori dell'inquinamento costiero, sia analizzando contaminanti bioaccumulati nei tessuti molli, che applicando i *biomarker* più validati, il gruppo di lavoro entro cui si è sviluppata questa tesi, propone ora, per la prima volta, l'analisi dello stato funzionale del mitilo valutando contemporaneamente la risposta di migliaia di geni con cDNA *microarray* (*MytArray* 1.0 [130]) in mitili sperimentalmente contaminati con OA, confrontando tali risultati su tessuti DSP contaminati provenienti dall'ambiente naturale e proponendo un preliminare profilo proteico dei campioni naturalmente contaminati. Il *MytArray* 1.0 è un microarray di cDNA costituito da 1758 EST 3'-terminali amplificate mediante PCR: 1693 EST nucleari di mitilo, 21 EST mitocondriali di mitilo e 44 EST di altre specie (12 EST di *Coffea* sp. e 32 EST batteriche). Ogni amplificato è stato depositato in duplice copia ad una concentrazione minima di 50 ng/μl. I singoli spot distano tra loro 180 μm e hanno un diametro medio di 80-100 μm mentre i subarray sono a distanza di 4500 μm. Ogni vetrino (Micromax Glass Slide superChip™, Perkin Elmer) contiene due copie del *MytArray* 1.0 ad una distanza di circa 2 cm (**Figura 10**). Questa piattaforma è stata depositata presso GEO (Gene expression omnibus) il database di profili di espressione dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL1799>).

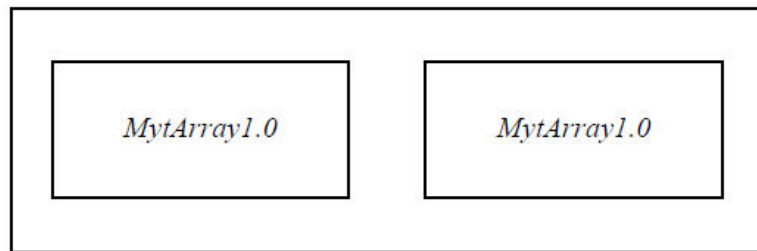


Figura 10 Disposizione delle due piattaforme *MytArray* 1.0 nei vetrini utilizzati

## 1.4.2 REAL TIME PCR QUANTITATIVA

La rilevazione e l'amplificazione degli acidi nucleici sono metodi utilizzati nella ricerca scientifica di base, in biotecnologia, in medicina, nelle scienze forensi, in diagnostica e molto altro e vengono utilizzati per svariate applicazioni. Per alcune applicazioni il profilo qualitativo degli acidi nucleici è sufficiente, in altre, invece, è necessaria un'analisi quantitativa. La scelta del metodo più adatto per il tipo di indagine che si vuole condurre richiede un'ampia conoscenza delle tecnologie disponibili.

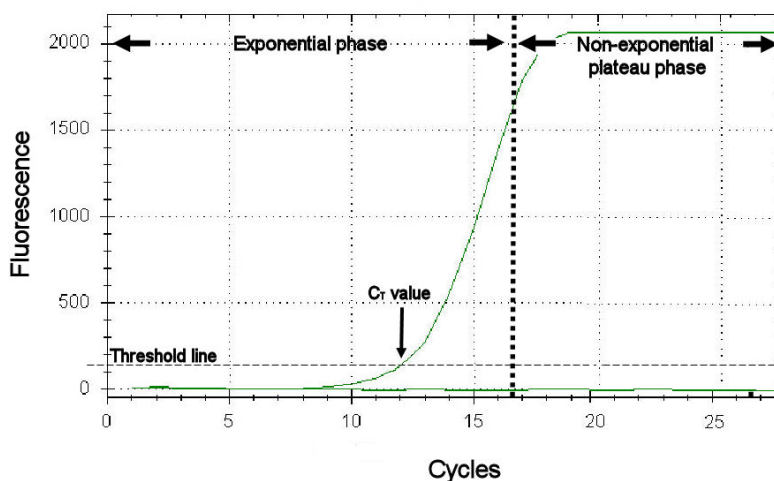
In una PCR convenzionale [131] il prodotto amplificato o anche detto amplicone, viene rilevato al termine dell'analisi, generalmente mediante corsa su gel di agarosio dopo che la reazione è stata completata. All'opposto, la real-time PCR rileva e monitora l'accumulo del prodotto amplificato durante la progressione della reazione, quindi in "tempo reale" [132-135]. Tale rilevamento è reso possibile includendo nella mix di reazione una molecola fluorescente che emette un segnale di fluorescenza in proporzione all'accumulo della quantità di DNA, nel corso della PCR.

La chimica fluorescente impiegata per questo scopo include l'utilizzo di marcatori che legano il DNA e sequenze di primer o sonde marcate con fluorofori. Termociclatori equipaggiati con appositi rilevatori vengono impiegati per rilevare il segnale crescente di fluorescenza generato durante l'amplificazione del campione. La fluorescenza misurata riflette quindi la quantità di amplificato prodotto ad ogni ciclo.

Il principale vantaggio della real-time PCR rispetto alla PCR tradizionale è che la prima permette di determinare il numero di copie del template iniziale con accuratezza ed elevata sensibilità. La real-time PCR risulta essere sia qualitativa (determina la presenza o l'assenza di una sequenza), che quantitativa (determina il numero di copie del DNA), in quest'ultimo caso prende il nome di real-time PCR quantitativa, anche detta qRT-PCR [133, 134], mentre la PCR convenzionale è al massimo semi-quantitativa. Inoltre, la real-time PCR può essere valutata senza la necessità di effettuare il controllo su gel di agarosio, risultando in una riduzione delle tempistiche dedicate agli esperimenti e all'aumento del rendimento.

In fine, siccome le reazioni di corsa e i dati vengono valutati in un sistema chiuso, in quanto tutto il processo avviene senza mai dover recuperare o spostare il campione in altre provette, le opportunità di contaminazione vengono notevolmente ridotte e la necessità di operare step di post-amplificazione vengono eliminate.

Per comprendere come la real-time PCR funzioni esaminiamo la **Figura 11**. Nel plot è evidenziato il numero dei cicli di PCR sull'asse delle x e la fluorescenza su quello delle y, quest'ultima, come già detto, è proporzionale alla quantità di prodotto amplificato nella provetta. In **Figura 11** sono evidenziate due fasi, la prima è quella esponenziale, poi seguita da quella non esponenziale (le due fasi sono separate mediante la linea tratteggiata in **Figura 11**). Durante la fase esponenziale l'ammontare del prodotto di PCR indicativamente raddoppia ad ogni ciclo di PCR. Durante, però, il procedimento della PCR i componenti vengono consumati e la reazione rallenta fino ad entrare in una fase di plateau (cicli 17 in poi in **Figura 11**).



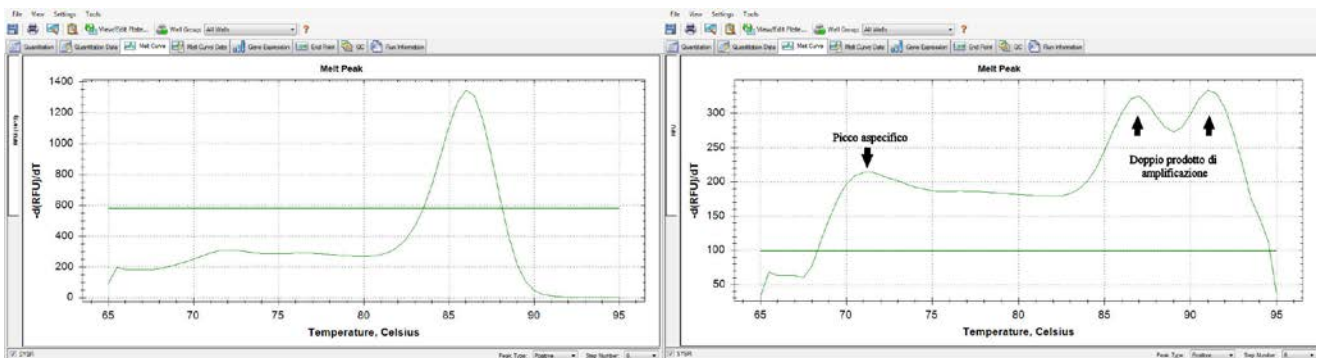
**Figura 11** Plot di amplificazione, la Threshold line indica la baseline di fluorescenza sottratta alla procedura di quantificazione (Chiara Manfrin ©).

Si noti come inizialmente la fluorescenza rimane a livello del background e aumenti nel segnale non sono rilevabili (cicli 1-11 in **Figura 11**) anche se il prodotto viene accumulato esponenzialmente. Il numero del ciclo al quale comincia a essere rilevato il segnale di fluorescenza viene detto Threshold cycle, o Ct. Considerato che il valore di Ct è misurato nella fase esponenziale, quando i reagenti non sono limitanti, la qRT-PCR può essere utilizzata per fare stime accurate della quantità iniziale di template presente nella reazione. Il Ct di una reazione viene principalmente determinato dalla quantità di template presente all'inizio della reazione, alcuni cicli di amplificazione saranno necessari per accumulare una quantità di prodotto sufficiente ad essere rilevato come segnale di fluorescenza, superiore al livello di background (cioè il Threshold level in **Figura 11**). Ci saranno quindi reazioni che hanno bassi o rapidi Ct, mentre, ovviamente, una reazione di amplificazione che parte da una quantità di campione bassa necessiterà di più cicli di amplificazione perché il segnale fluorescente relativo al campione superi il background, in questo caso avremmo Ct elevati o ritardati.

Queste correlazioni sono le basi dell'aspetto quantitativo della real-time PCR. Un altro punto fondamentale quando si parla di qRT-PCR è la chimica utilizzata per ottenere il segnale fluorescente durante la reazione di amplificazione. La sonda più comunemente usata per legare il DNA durante una real-time PCR è il SYBR Green [136], che lega in modo non-specifico il doppio filamento di DNA (dsDNA). Il SYBR Green emette bassi valori di fluorescenza quando è libero nella soluzione, ma la sua fluorescenza aumenta drasticamente (fino a 1000 volte) quando lega il dsDNA. Quindi la fluorescenza catturata in una reazione deriva soprattutto dalla quantità di dsDNA presente, ed aumenta in relazione al target amplificato. I vantaggi dell'utilizzo di un fluoroforo di questo tipo, che lega il dsDNA, sono legati alla possibilità di utilizzare primer normalmente usati nella PCR tradizionale, senza bisogno di particolari restrizioni o sonde specifiche legate alle sequenze nucleotidiche. Altri pro consistono nella possibilità di validare trascritti risultati, ad esempio, da un esperimento di microarray, senza il bisogno di specifiche sonde, ancora i bassi costi di questa procedura (le sonde sono infatti più costose) e la possibilità di osservare la specificità dei primer durante la reazione, controllando la Melt Curve, potendo così distinguere i prodotti secondari o i dimeri di primer dall'amplificazione specifica.

L'analisi della Melt-curve può essere utilizzata per identificare i prodotti di reazione, includendo anche quelli non specifici. Dopo il completamento della reazione, viene generata una melt curve incrementando la temperatura di poche

differenze di gradi centigradi e monitorando la fluorescenza ad ogni ciclo di amplificazione, il dsDNA ad ogni ciclo denatura e la fluorescenza diminuisce. La negativa della derivata prima del cambiamento di fluorescenza viene elaborata in funzione della temperatura ottenendo un grafico, come in **Figura 12**. Un picco caratteristico della temperatura di melting ( $T_m$ , la temperatura alla quale il 50% delle paia di basi di un duplex di DNA sono separate) di un amplicone permette di distinguere l'amplicone stesso dagli altri prodotti, come potrebbero essere dimeri di primer, che si appaiano a diverse temperature, generalmente più basse di quelle di un prodotto specifico o la presenza di un doppio amplificato. Un esempio è riportato nella **Figura 12**, nella parte sinistra si nota un singolo picco che descrive il prodotto specifico di un sistema di primer e a destra i doppi picchi che descrivono la presenza di una doppia amplificazione aspecifica.



**Figura 12** Esempi di Melt curve: a sinistra è riportata la Melt curve di un'amplificazione specifica, risultante in un unico picco e a destra la presenza di più picchi, uno aspecifico e due che descrivono la presenza di una doppia amplificazione (Chiara Manfrin ©).

Il maggior svantaggio di questo sistema è la mancanza di specificità, in quanto il SYBR Green si lega a qualsiasi dsDNA, come risultato si ottiene la presenza di prodotto non specifico che contribuisce al segnale di fluorescenza in una real-time PCR, falsando la quantificazione del prodotto. Un altro problema è dato dal fatto che questo tipo di fluorescenza non può essere utilizzata in multiplex, perché la fluorescenza derivata da diversi ampliconi non può essere distinta, d'altra parte però è possibile condurre reazioni multiple, in parallelo, tra geni di interesse e specifici reference. Sono molti i primer fluorescenti in vendita in diverse ditte che sono specificatamente create per real-time PCR. Tra queste vi sono le sonde TaqMan [137], i Beacon molecolari [138], le sonde di ibridazione [139], le sonde Eclipse [140], i primer Scorpion [141], i LUX [142] e i BD QZyme [143].

In una qRT.PCR risulta essere di fondamentale importanza il tipo di quantificazione che può essere condotta all'interno dell'esperimento. Possiamo quindi avere una quantificazione assoluta, ottenuta comparando i valori del Ct di un campione rispetto ad una curva standard, ottenendo come risultato dell'analisi la quantità di acidi nucleici (numero di copie,  $\mu\text{g}$ ) su una quantità nota di campione (su cellula, su  $\mu\text{g}$  di RNA totale). Oppure una quantificazione relativa, che invece ha come risultato il seguente rapporto: la quantità relativa di un acido nucleico target (in termini di differenza di espressione) per un'equivalente quantità di campioni trattato e di controllo.

Sia nella quantificazione assoluta, che in quella relativa, le quantità devono essere normalizzate per ottenere dati significativi. Questo viene ottenuto attraverso l'uso di normalizzatori. Nella quantità assoluta i normalizzatori sono usati per normalizzare o standardizzare la quantità del target rispetto all'unità del campione. Nella quantificazione relativa, servono per poter comparare le quantità dei target provenienti da unità equivalenti dei campioni.

E' possibile anche, come è stato fatto in questo lavoro, utilizzare dei trascritti di riferimento (detti anche reference gene o housekeeping gene) il cui livello di espressione è costante in tutti i campioni e non risente del trattamento al quale gli organismi sono stati posti. L'utilizzo di un gene di riferimento è vantaggioso nei casi dove non è possibile quantificare il preciso valore dell'RNA, perché magari si sta partendo da un template presente in piccole quantità.

Esistono diversi metodi per ottenere le quantificazioni assolute e relative dei campioni analizzati, sotto riporto solo alcuni esempi.

Per quanto riguarda la quantificazione assoluta, come detto prima, un metodo molto utilizzato è l'uso di una curva standard. Essa viene ricavata facendo diluizioni seriali e crescenti di un template, considerato come campione di riferimento, quindi servendosi di concentrazioni note e decrescenti. Il campione trattato viene testato nella stessa reazione di amplificazione degli standard e la comparazione, utilizzando la curva standard delle concentrazioni del campione di riferimento, serve per ottenere un dato di quantificazione del campione di interesse. È un metodo molto simile all'utilizzo di una scala di riferimento molecolare in un gel di agarosio.

La curva standard viene ottenuta con il logaritmo del numero di copie iniziali dello standard (quantità) plottato lungo l'asse delle x, rispetto ai valori di Ct. L'equazione per la retta di regressione lineare è la seguente [ $y = mx + b$ , o  $Ct = m(\log \text{ della quantità}) + b$ ]. Basato sull'equazione della retta di regressione lineare è possibile derivare l'equazione per determinare la quantità del campione sconosciuto:

$$N_n = 10^{\left(\frac{n - b}{m}\right)}$$

dove  $n = Ct$

$$\text{Quantità} = 10^{\left(\frac{Ct - b}{m}\right)}$$

Le applicazioni più comuni della quantificazione assoluta in Real-Time PCR avvengono per la determinazione cromosomica, per determinare il numero delle copie di geni o la determinazione della carica virale. Questo metodo di quantificazione è concettualmente semplice e matematicamente facile da calcolare. Tale metodo, comunque, richiede un campione di concentrazioni conosciute per essere usato come sistema di riferimento e lo standard può essere amplificato in parallelo rispetto al campione che si vuole determinare.

La quantificazione relativa, invece, viene generalmente impiegata quando si vuole calcolare la quantità relativa di un gene tra quantità equivalenti di diversi campioni.

Per comprendere meglio, introdurrò due esempi Esempio 1: Un ricercatore estrae RNA da 1000 cellule di branchie di mitili sottoposti a sbalzi di calore e da 1000 cellule di branchie di mitili non trattati. Il ricercatore vuole sapere quante volte viene espressa la heat shock protein 90 (HSP90) nelle cellule trattate e quante volte nelle cellule di controllo. Per ottenere questa informazione, ci si può approcciare in due modi, a) essendo partito dallo stesso identico numero di cellule, può fare una retrotrascrizione qPCR specifica per l'HSP90 e rilevare il valore di espressione relativo agli

mRNA specifici per quella proteina considerando il rapporto tra il numero degli mRNA HSP90-specifici e le molecole totali di RNA sia nel tessuto non trattato che in quello trattato con calore.

Esempio 2: un ricercatore ha osservato che il livello di espressione della beta actina ( $\beta$ -actin) è costante sia in mitili trattati con il calore che in quelli non trattati. Il ricercatore può quindi estrarre l'RNA da un numero approssimativamente equivalente di cellule branchiali, senza aver determinato in modo esatto il numero di cellule. Il livello della  $\beta$ -actin e dell'HSP90 viene determinato nei campioni mediante qRT-PCR. L'espressione relativa dell'HSP90 in cellule trattate con calore comparata con l'espressione della stessa proteina in cellule non trattate viene determinata considerando il rapporto della  $\beta$ -actin (gene normalizzatore)/ HSP90 nei due diversi campioni.

Nell'esempio sopra riportato è stato scelto di fare una quantificazione relativa perché si era interessati alla quantità di acido nucleico in due campioni diversi di equivalente quantità. La differenza tra le due analisi descritte sopra risiede nel tipo di normalizzatore impiegato. Nel primo scenario, il normalizzatore è il numero di cellule, nel secondo, è il rapporto tra un gene reference (o normalizzatore) e quello di interesse. In entrambi i casi quello che viene ottenuto è una descrizione quantitativa di un fenomeno che si vuole analizzare tra più campioni.

Il vantaggio di utilizzare un gene normalizzatore invece che un'unità di massa, come potrebbe essere il numero di cellule, sta nel fatto che non è necessaria una quantificazione accurata del campione di partenza, come nel caso della scarsa disponibilità di un campione. Lo svantaggio sta invece nella necessità di conoscere già in partenza geni normalizzatori dei quali si sa che la loro espressione è sempre costante.

Ora descriverò brevemente i tre metodi più utilizzati per la quantificazione relativa.

Il metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  è stato proposto da Livak per operare un'analisi di espressione genica relativa [144]. Questo metodo parte dall'assunto che sia il target che il gene di riferimento vengano amplificati con efficienze vicine al 100% e del 5% tra loro. Prima di utilizzare il  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  è quindi necessario verificare l'assunto di partenza verificando le efficienze di amplificazione del target e del gene di riferimento. Una volta determinato che le efficienze di amplificazione sono vicine al 100%, le differenze relative dell'espressione genica possono essere determinate utilizzando gli step sotto riportati:

per prima cosa, bisogna normalizzare il Ct del gene target con quello di riferimento nel campione trattato (test) e in quello non trattato (calibrator):

$$\Delta Ct_{(test)} = \Delta Ct_{(target, test)} - \Delta Ct_{(reference, test)}$$

$$\Delta Ct_{(calibrator)} = \Delta Ct_{(target, calibrator)} - \Delta Ct_{(reference, calibrator)}$$

Successivamente viene normalizzato il  $\Delta Ct$  del campione trattato su quello del campione di controllo:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(test)} - \Delta Ct_{(calibrator)}$$

Ora è possibile calcolare il rapporto di espressione:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{rapporto di espressione normalizzato}$$

Il risultato ottenuto è un aumento (o diminuzione) di espressione del gene target nel campione trattato in relazione al campione non trattato e normalizzato sull'espressione di un gene di riferimento. La normalizzazione dell'espressione di un gene target su un reference compensa qualsiasi differenza nelle quantità iniziali dei campioni analizzati.

Se il gene target e quello di riferimento non hanno efficienze di amplificazione simili è possibile ottimizzare o pianificare l'analisi utilizzando il Metodo di Pfaffl descritto qui di seguito [145].

In pratica se l'efficienza di amplificazione non è di 2 (cioè del 100%) viene applicata una formula modificata del metodo di Livak dove al valore di 2 viene sostituito quello reale dell'efficienza di amplificazione ottenuta nel campione analizzato, ad esempio se l'efficienza di amplificazione sia del target che del reference è 1,95, la formula che dovrà essere utilizzata è  $1,95^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Quando invece l'efficienza di amplificazione dei due ampliconi è diversa, deve essere applicata una formula alternativa che riporto qui di seguito:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct, \text{target (calibrator - test)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct, \text{ref (calibrator - test)}}$$

L'equazione parte dall'assunto che ciascun gene (target e reference) ha la stessa efficienza di amplificazione nel campione trattato e in quello di controllo, ma non necessariamente che sia la stessa tra il target e il reference.

La più comune applicazione della real-time PCR è nello studio dell'espressione genica. La quantificazione di un'espressione genica è di fondamentale importanza in diversi settori della ricerca scientifica, che va dalle scienze di base alle applicazioni pratiche in campo, industriale, medico e di monitoraggio. Nella maggior parte degli studi di espressione genica i ricercatori sono interessati a determinare la quantità relativa dei livelli di espressione genica in campioni trattati, rispetto a quelli di controllo.

## SCOPO DEL LAVORO

### 2.0 SCOPO DEL LAVORO

In questi 3 anni di dottorato mi sono occupata dell'analisi dei profili di espressione genica nel mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*), in particolare ho ottenuto e analizzato profili di espressione genica di mitili contaminati con tossine DSP, in particolare con acido okadaico.

Dapprima, mi sono occupata di individuare i trascritti attivati e inibiti dalla presenza di acido okadaico in mitili, attraverso metodiche prettamente molecolari, come l'impiego di una piattaforma di microarray specifica di mitilo, all'interno di una sperimentazione in ambiente controllato. Lo scopo di questa parte del lavoro è stato quello di ottenere, per la prima volta, profili di espressione genica di mitili contaminati con acido okadaico e di ottenere un set di trascritti differenzialmente espressi, tra i quali vi potrebbero essere putativi marcatori di tale contaminazione. Attraverso una real time PCR quantitativa ho analizzato un set di geni, al fine di validare i dati ottenuti dalla sperimentazione in laboratorio. Per poter discriminare l'effetto dell'acido okadaico rispetto ad altre possibili contaminazioni ho provveduto ad analizzare gli stessi trascritti in mitili contaminati con *Alexandrium minutum*, produttore di tossine PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), potendo così discriminare le due diverse contaminazioni, almeno in condizioni sperimentali.

Risulta infatti di importanza primaria, per far fronte alle problematiche dei bloom algali e ai conseguenti blocchi pesca nelle mitilocolture, individuare metodi di pronta rilevazione della presenza di biotossine. Questa prima parte del mio lavoro è consistita nel creare un database di trascritti differenzialmente espressi scelti all'interno di una piattaforma di microarray (MytArray 1.0) di 1758 cloni specifici di mitilo e di validarli, attraverso Real Time-PCR quantitativa (qRT-PCR), per confermare l'efficienza dell'approccio e del microarray stesso per studi a fini di biomonitoraggio ambientale. Nella sessione Produzione scientifica del candidato è riportato l'articolo frutto di questo lavoro pubblicato sulla rivista Environmental Science & Technology.

Successivamente ho ampliato il set di geni sovra espressi in condizioni sperimentali, analizzandoli mediante qRT-PCR, su campioni di mitili raccolti dall'ARPA di Gorizia e risultati essere naturalmente contaminati da DSP, mediante il saggio del topo, unica metodica riconosciuta dalla legislazione italiana (D.Lgs 165/2002) per la quantificazione di tossine DSP. Questa parte del lavoro ha permesso la conferma dei trend di espressione dei trascritti selezionati e analizzati in condizioni sperimentali, su mitili raccolti durante naturali eventi di DSP. Questo tipo di approccio permette di rilevare pattern di espressione a rapida attivazione, al fine di evidenziare la tossificazione dei mitili da tossine DSP, già ai primi stadi di contaminazione. La finalità di questo lavoro è stata quella di fornire dati utili per lo sviluppo di futuri kit di rilevazione di tossine DSP in *Mytilus galloprovincialis*, nell'ottica di poter operare celeri e opportuni interventi di detossificazione dei mitili stessi. In Produzione scientifica del candidato è riportato l'articolo frutto di questo lavoro che al momento è in submission alla rivista Aquatic toxicology.

Una terza parte del lavoro di dottorato è stata quella dell'analisi, preliminare, dei profili di espressione proteica. Questo al fine di individuare possibili cambiamenti, a livello proteico, tra campioni contaminati da tossine DSP e campioni risultati essere negativi al test del topo.

Infine, una quarta parte del lavoro di dottorato ha riguardato il mio coinvolgimento nello studio di trascritti immuno-correlati come le proteine contenenti domini C1q (C1qDC), risultati essere abbondanti tra i trascritti di *Mytilus galloprovincialis* [146]. Tale studio è il risultato dell'analisi bioinformatica operata all'interno del MytiBase, il primo database di mitilo di 7112 EST annotate messo a punto dal Laboratorio di Genetica nel quale ho lavorato e il gruppo di

## SCOPO DEL LAVORO

Padova [147], nella sezione Produzione scientifica del candidato ne riporto la pubblicazione sulla rivista *Developmental & Comparative Immunology*.

I metodi applicati in questi studi permettono di rilevare, già a livello molecolare, variazioni indotte da agenti stressogeni di origine sia biotica (come nel caso specifico di questo studio), che abiotica, ponendo tali tipologie di analisi fra le più promettenti per l'analisi dell'immunità e della resistenza a contaminanti in mitilo, validato organismo sentinella della qualità degli ecosistemi costieri marini.

## 3.0 MATERIALI E METODI

La sezione Materiali e Metodi è stata suddivisa in modo da presentare in modo sequenziale il trattamento dei campioni e i principali protocolli applicati nelle diverse fasi di questo lavoro. Dapprima saranno riportati i Materiali e Metodi applicati ai campioni utilizzati per la prima parte sperimentale, successivamente quelli per i campioni naturalmente contaminati e infine i protocolli utilizzati per l'estrazione delle proteine. Alcuni metodi verranno ripetuti perché comuni, ad esempio, ai mitili utilizzati nella fase sperimentale e in quelli naturalmente contaminati, impiegati nella successiva fase di validazione. Ho deciso di seguire questo tipo di presentazione del lavoro eseguito, così da rendere più facilitata la lettura, a chi fosse interessato solo ad alcune parti del lavoro.

## 3.1 CAMPIONI SPERIMENTALMENTE CONTAMINATI

## 3.1.1 RACCOLTA, STABILIZZAZIONE E SOMMINISTRAZIONE DELL'ACIDO OKADAICO

I mitili impiegati per questa parte del lavoro sono stati raccolti a Grignano (45°42'N 13°42'E), nel Golfo di Trieste e appartenevano a un range di lunghezza della conchiglia tra 4,5-6,4 cm.

Tutti i campioni prelevati sono stati mantenuti in due vasche da 25 litri (dimensioni: 25x60x40 cm), riempite con acqua di mare filtrata 1 µm e fornite di due ossigenatori e una pompa per il ricircolo dell'acqua con 120 l/h di portata.

Per evitare stress addizionali, i mitili sono stati mantenuti a una temperatura dell'acqua di 17°C e a una salinità di 37 g l<sup>-1</sup> costanti, inoltre sono stati sottoposti a un fotoperiodo stagionale di 10 ore di luce e 14 di buio. L'acqua nelle vasche è stata sostituita settimanalmente e giornalmente ne è stata controllata la salinità. In una vasca sono stati posti 15 mitili di controllo e nell'altra 15 mitili trattati con la biotossina Acido Okadaico (OA).

Un campione di controllo composto di 3 mitili è stato raccolto dopo due settimane di acclimatazione (definito periodo T0) e a ogni time point dell'esperimento sono stati prelevati 3 mitili dallo stesso gruppo, per poter operare confronti tra i mitili successivamente trattati tenendo in considerazione la variabile "mantenimento in vasca" durante tutto il decorso dell'esperimento. Sia il gruppo di controllo che quello trattato sono stati alimentati con invertebrati marini commerciali (Elos S.r.l.), con la sola differenza che al gruppo trattato il cibo fornito è stato addizionato con acido okadaico (C44H68O13 okadaic acid ricavato da *Prorocentrum concavum*, Sigma-Aldrich).

I mitili trattati sono stati alimentati per 5 settimane, ogni 3 giorni, con 2,5 g di cibo a cui sono stati addizionati 6,5 µg di OA ogni volta, il quale non essendo idrosolubile è stato precedentemente diluito in 1 ml di etanolo. Il cibo assegnato al gruppo di controllo è stato trattato anch'esso con 1 ml di etanolo al fine di omologare la qualità del cibo fornita a entrambi i gruppi. In tutti e due i casi il cibo è stato fornito solo dopo completa evaporazione dell'etanolo, come riportato in Auriemma e Battistella [148]. I mitili trattati (3 organismi) sono stati raccolti al terzo giorno dall'inizio dell'esperimento (T1), nello stesso modo dopo una settimana (T2), 3 settimane (T3) e 5 settimane (T4). I punti sperimentali T1 e T2 sono stati scelti per analizzare l'effetto immediato dell'OA, mentre T3 e T4 sono stati presi in considerazione per analizzare il massimo effetto dell'OA sull'espressione genica.

## 3.1.2 ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE

I mitili sono stati prima sezionati e nello specifico la ghiandola digestiva è stata omogenizzata in RNAtidy G (Applchem). Considerando che il peso medio della parte di una ghiandola digestiva di mitilo utilizzata è di 0,2 g e che il rapporto tra quantità di tessuto e buffer utilizzato deve essere pari a 1:30, si sono utilizzati 6 ml di buffer (da notare

che è un rapporto 6 volte maggiore di quello consigliato dal protocollo, accorgimento dovuto alla grande attività RNasica intrinseca del tessuto in analisi). Successivamente sono stati aggiunti 0,2 volumi di cloroformio alla soluzione, il lisato è stato centrifugato a 4000 rpm per 25' a 4 °C. La fase acquosa è stata trasferita in una nuova provetta e ad essa è stato aggiunto 1 volume di isopropanolo. Dopo successiva centrifuga a 7000 rpm per 20' a 4 °C è stato eliminato il surnatante e il pellet è stato lavato con 2 ml di etanolo 75%. Al termine di una seconda centrifuga a 7000 rpm per 10' a 4 °C il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato lasciato ad asciugare per un paio di minuti e poi risospeso in 1 ml di H<sub>2</sub>O RNase-free. Alla soluzione sono stati aggiunti 0,3 volumi di Litio cloruro 8M ed è stata lasciata a precipitare overnight a 4°C. Il giorno successivo dopo una centrifuga a 13000 rpm per 20' a 4°C è stato eliminato il surnatante e il pellet è stato lavato con 0,5 ml di etanolo 75%. Al termine di una seconda centrifuga a 13000 rpm per 10' è stato fatto asciugare il pellet e successivamente risospeso in 100 µl di H<sub>2</sub>O RNase-free. Le concentrazioni dei campioni sono state misurate mediante lettura allo spettrofotometro e i campioni sono stati conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

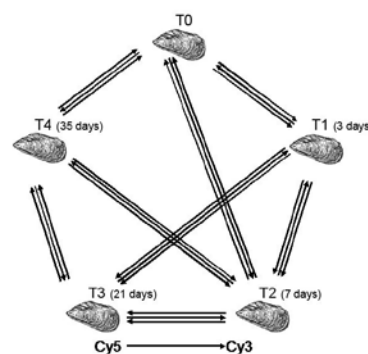
Per la retrotrascrizione sono state alternativamente utilizzate diversi enzimi retrotrascrittasi MMLV-point mutant come la SuperScriptIII (Invitrogen), la Power Script™ (Clontech) e l'ArrayScript™ Reverse Transcriptase (ABII) con i relativi buffer, seguendo le indicazioni riportate dal produttore.

### 3.1.3 IBRIDAZIONE SUL MICROARRAY

Per la marcatura del ssDNA (single-strand DNA) è stata scelta una marcatura di tipo indiretta derivata dal protocollo TIGR ([http://pga.tigr.org/sop/M004\\_1a.pdf](http://pga.tigr.org/sop/M004_1a.pdf)), questo metodo consente di legare un amminoallyl marcato con un nucleotide ad un ssDNA. In questo modo si ottengono dei singoli filamenti di DNA che hanno una porzione nota alla quale è possibile legare in maniera specifica un fluorocromo, al fine di osservare l'ibridazione sull'array. Per la purificazione è stato utilizzato il Qiagen MinElute™ PCR Purification kit (Qiagen), seguendo le indicazioni riportate dal produttore.

Per la totalità delle reazioni sono state utilizzate mix di nucleotidi concentrate 10 mM.

E' stato seguito per 3 volte un Loop Design [149], appositamente modificato per il nostro studio e riportato in **Figura 13**, al fine di operare ibridazioni competitive tra i campioni di controllo, quelli trattati, più alcune ottenute attraverso l'analisi computazionale. I cDNA-amminoallyl marcati sono stati legati ai fluorofori Cy5 o Cy3 (GE Healthcare) e sono stati ibridati overnight a 48°C in SSC 5X, Sarcosile 0,1% e soluzione Denhardt 1X. Le piattaforme di microarray sono state poi lavate con buffer a stringenza decrescente fino a una concentrazione di SSC 0,05%. Il loop design è stato completato per 3 volte, alternando i due diversi fluorocromi per la marcatura dei campioni, questo per eliminare l'effetto "marcatura" che si riscontra in questo tipo di esperimenti. Tre repliche biologiche sono state alternativamente marcate con Cy5 o Cy3 ottenendo un numero totale di 24 slide di microarray e 48 serie di dati, ciò significa aver analizzato per 48 volte 1758 trascritti.



**Figura 13** Unsaturated loop design rappresentante le ibridazioni tra i diversi campioni, alternando la marcatura con Cy5 o Cy3. Ciascuna freccia rappresenta una singola ibridazione, il loop design completo è composto da 8 ibridazioni indipendenti. Esso è stato completato per 3 volte ottenendo un numero totale di 24 slide di microarray e 48 serie di dati, ciò significa aver analizzato per 48 volte 1758 trascritti.

I microarray sono stati scannerizzati con una risoluzione di 3 µm e l'immagine è stata convertita in intensità numeriche con il VersArray ChipReader (Bio-Rad).

## 3.1.4 ANALISI DEI DATI DEL MICROARRAY

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software open source Bioconductor [150]. I dati delle intensità rilevate sono stati normalizzati utilizzando un approccio detto lowess, al fine di ridurre la variabilità tra i campioni ibridati nello stesso vetrino. Successivamente è stata applicata una quantile-normalization per ridurre la variabilità tra i microarray. La comparazione tra i campioni trattati e non trattati è stata ottenuta attraverso l'utilizzo del pacchetto Limma [151].

I trascritti differenzialmente espressi sono stati identificati utilizzando un moderated t-statistic (con un Bayesian adjusted denominator) come descritto in [152]. Successivamente è stata applicata al test una correzione FDR (False Discovery Rate) con un p-value di 0,01 come valore di cut-off. Le intensità e i dati normalizzati sono disponibili nel sito GEO (Accession no. GSE14885, <http://www.wip.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). In **Tabella S1** nella sezione delle Informazioni di Supporto sono riportati in dettaglio i dati processati e i principali parametri di analisi.

Dopo l'analisi statistica dei dati, le EST risultate essere sovra espresse sono state identificate all'interno del MytiBase, il database interattivo del trascrittoma di *Mytilus galloprovincialis* [147], attribuendo ai corrispettivi cluster le EST up-regolate al fine di ridurre la ridondanza e per comparare le annotazioni disponibili dei trascritti stessi.

## 3.1.5 VALIDAZIONE MEDIANTE qRT PCR

Una reazione di real-time PCR, perché sia efficace, richiede efficienti e specifiche reazioni di amplificazione del prodotto. Sia i primer che le sequenze target possono influenzare questa efficienza.

Vi sono quindi delle linee guida da rispettare per ottimizzare la reazione.

Per quanto riguarda l'amplicone:

- Esso deve avere una dimensione compresa tra 75-200 paia di basi (bp). Questo perché ampliconi più corti vengono amplificati con una migliore efficienza, non deve comunque essere inferiore alle 75 bp per poterlo distinguere dai dimeri di primer che potrebbero formarsi durante la reazione di amplificazione.
- Bisogna evitare la formazione di strutture secondarie, come formazioni a forcina o self-appaiamenti.
- Evitare che nel template ci siano ripetizioni dello stesso nucleotide maggiori di 4.
- avere una percentuale di GC intorno al 50-60%.

Anche i primer sono stati disegnati rispettando le principali caratteristiche necessarie al loro impiego in real-time PCR, quali:

- avere anch'essi una percentuale di GC intorno al 50-60%.
- Devono avere una temperatura di Melting (Tm) compresa tra 50 e 60°C.
- Bisogna evitare la formazione di strutture secondarie, come formazioni a forcina o self-appaiamenti.
- Evitare ripetizioni di G o C più lunghe di 3 paia di basi.
- Posizionare le G e C all'estremità terminale dei primer.
- Assicurarsi che il primer reverse e il forward non presentino complementarità all'estremità 3', al fine di evitare la formazione di dimeri di primer.
- Verificare che i primer disegnati si appaiano nella sequenza di interesse e nella posizione desiderata. Per far questo esistono programmi di allineamento locale come può essere il BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponibile presso il sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

Per confermare i dati di espressione genica ottenuti dopo il trattamento con la biotossina acido okadaico sono stati selezionati un set di geni risultati essere up-regolati. La selezione dei trascritti testati è stata operata scegliendo le sequenze aventi una media di A-value (media del log<sub>2</sub> del livello di espressione di un gene rispetto ai canali e a tutti i microarray dell'esperimento) più alta tra i valori di media degli A-value appartenenti alle EST formanti il MytArray 1.0, nella totalità dei microarray impiegati nell'esperimento.

Per poter ottenere una buona rappresentazione, è stato deciso di focalizzarsi sui trascritti sovra-espresi comuni a più time point o esclusivi di un particolare punto sperimentale, utile per poter delineare il profilo di espressione genica, come può essere, ad esempio, il punto a 3 giorni dall'inizio dell'esperimento, al fine di individuare una risposta acuta al trattamento con OA.

I primer sono stati disegnati utilizzando il programma on-line Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), seguendo le linee guida sopra descritte e la formazioni di possibili dimeri o strutture secondarie è stata controllata con il programma Oligocalculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) disponibile in internet.

In **Tabella 1** sono riportate le sequenze dei primer utilizzati per validare i dati ottenuti con il microarray.

**Tabella 1** lista dei primer usati per la validazione in qRT-PCR, il primo, RpL19 è il gene utilizzato come normalizzatore. In tabella sono riportate l'ID del cluster depositato presso il MytiBase, il gene target, la direzione del primer e la sua sequenza ed in ultimo la lunghezza dell'amplicone prodotto.

MytiBase ID Cluster	Targeted gene	Sense	Primer sequences, 5'-3'	Amplicon size (bp)
MGC00083	RpL19	reverse	CCATGTGACGTCCTTTTCCT	80
		forward	ATCCGTAACCTGTGGCAGT	
MGC00038	Veliger digestive gland 3 (Vdg 3)	reverse	AAGCGGTGAACCAAACCTCTG	90
		forward	TGAATGCCACACACTCATCC	
MGC01332	Gene for endo-1,4-mannanase, exons 1-6	reverse	ACAGACGTGAACCAACGACA	102
		forward	GGGTTGAGGGCTCACAAATA	
MGC01455	Elongation factor 2-like	reverse	CCATGGGATTTTCCTTCAATG	121
		forward	ATGGACTTGGCCTTGTGAC	
MGC01563	Without similarity	reverse	TGGCCAGTAGTTTCAGAGG	126
		forward	CAACATGACGGAAATGGTCA	
MGC01731	Elongation factor-1 gamma (Fragment)	reverse	AATCTCCCTCCCAATTCCAG	139
		forward	TGGAAAGGACCCAAATTAGC	
MGC02188	CAMP responsive element binding protein-like (CREB-like) (Fragment).	reverse	CTGGCACTCTGTCTGCTACG	130
		forward	TGGACAGCACAGTCATGGAT	
MGC02223	Gene for endo-1,4-mannanase, exons 1-6	reverse	GCCCCACATCAAGGATATGA	123
		forward	GCGTGTGGGTTGGTAGATT	
MGC03065	Partial Ubiquitin gene	reverse	TGCACAAAAGTTTCGTTCTTG	101
		forward	CCACACTCCATCTGGTTTTG	

In qRT-PCR, sono stati analizzati anche mitili contaminati con il ceppo tossico AL9T di *Alexandrium minutum*, conosciuto come produttore di tossine PSP, come gruppo trattato e mitili trattati con il ceppo non tossico AL1T di *Alexandrium minutum*, come gruppo di controllo. Il protocollo di contaminazione dei mitili con *A. minutum* si basa sugli esperimenti di Suzuki *et al.*, [153] e Ichimi *et al.*, [154].

I mitili di lunghezza di 5 cm sono stati stabulati in una vasca della capienza di 1 m<sup>3</sup> con acqua naturale filtrata per 2 settimane. Successivamente sono stati acclimatati per due giorni alle condizioni di laboratorio e posti, in gruppi da 9, in becher da 5L contenenti 3 L di acqua naturale filtrata su filtri da 0.22 µm. Ogni becher è stato areato e tenuto a

condizioni di temperatura costante di 15°C e i mitili sono stati sottoposti ad un fotoperiodo luce:buio di 14 e 10 ore, rispettivamente. L'acqua di ogni becher è stata sostituita giornalmente. Le colture di *A. minutum* AL1T e AL9T sono state mantenute a condizioni standard a 15°C, con fotoperiodo luce buio 14:10 usando il mezzo B [155].

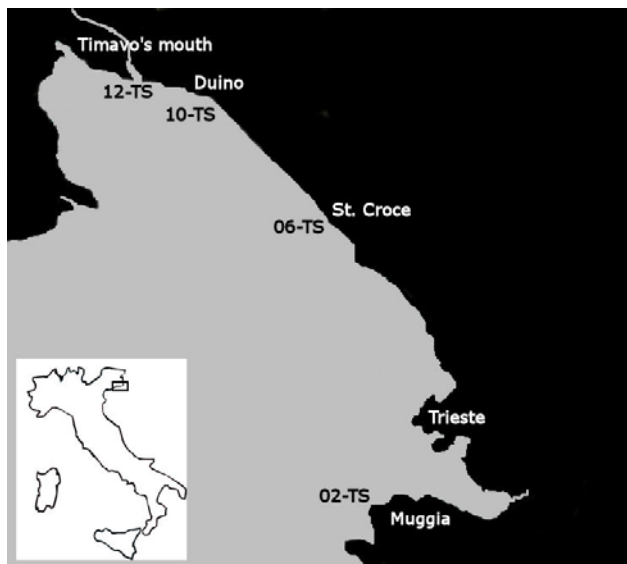
Dopo il periodo di acclimatazione, ad ogni gruppo sono state fornite 40 mila cellule di *Alexandrium minutum* per mitilo, ogni due ore, per cinque volte al giorno (ore 10, 12, 14, 16, 18). Al gruppo di controllo il ceppo fornito è stato quello non tossico, l'AL1T e al gruppo trattato è stato dato il ceppo tossico, produttore di tossine PSP, AL9T. I campioni utilizzati per la qRT-PCR appartenevano, come per l'esperimento di contaminazione con OA ai punti sperimentali T0 (non trattati, ma solo acclimatati) e T1 (dopo tre giorni dall'inizio dell'esperimento). La qRT-PCR condotta su questi campioni è servita per poter poi operare un confronto con i profili di espressione ottenuti nei mitili contaminati con OA. In pratica la qRT-PCR condotta sui campioni contaminati con OA è servita per validare i risultati ottenuti con il microarray, mentre la qRT-PCR degli stessi trascritti selezionati e condotta sui campioni contaminati con *A. minutum* ha avuto il fine di verificare se poteva essere possibile evidenziare due profili di espressione diversi e riconducibili ai due trattamenti effettuati.

Per tutti i campioni considerati 1 µg di RNA totale è stato trattato con Turbo DNase (Life Technologies) e retro trascritto in un volume di 15 µL usando 1 U di iScript Reverse Transcriptase (iScript cDNA Synthesis kit, Bio Rad). Le reazioni di PCR sono state eseguite nel termociclatore CFX96 Real-Time PCR (Bio Rad) usando l'iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad) seguendo le indicazioni riportate dal produttore e utilizzando il seguente profilo termico: 95 °C per 5', seguito da 40 cicli a 95 °C per 30'', 56 °C per 20'', 72°C per 30'', e una melt curve da 65 a 95 °C con un incremento di temperatura di 0,5°C ogni 0,5''. Le reazioni di PCR sono state condotte in triplicato comparandole con quelle dei campioni di controllo attraverso un metodo di quantificazione relativa [145]. Come gene reference è stato scelto una proteina ribosomale, L19 che nel MytArray 1.0 ha dimostrato di avere un andamento costante durante tutto l'esperimento. Le efficienze di PCR sono state calcolate con il programma LinReg [156], utilizzando le impostazioni di default. I dati ottenuti dalle qRT-PCR sono stati analizzati ed elaborati con il software Bio Rad CFX Manager (versione 1.0.1035.131) utilizzando le impostazioni di default.

## 3.2 CAMPIONI NATURALMENTE CONTAMINATI

I campioni naturalmente contaminati e quelli non contaminati da tossine DSP, mi sono stati gentilmente forniti dai Dott. Zanolin Bruno e Franceschini Fabio, per conto dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente del Friuli Venezia Giulia (ARPA-FVG).

Un quantitativo di 4 kg di mitili è stato prelevato da ogni punto indicato nella **Figura 14** e i campioni analizzati



**Figura 14** Distribuzione geografica dei siti di raccolta dei campioni naturalmente contaminate con i rispettivi identificativi. Le coordinate geografiche sono le seguenti: Foce del Timavo 45°46' N, 13° 35' E; Duino: 45°47' N, 13°36' E, S. Croce: 45°44' N, 13°41' E e Muggia: 45°36' N, 13°45' E (Chiara Manfrin ©)

facevano parte di un sub-campione del peso di 100 g di polpa. Stimando che un mitilo intero, compreso di conchiglie, pesa sui 9 g, i gruppi analizzati erano costituiti da 11 mitili ciascuno. Due pool, il TS\_09+ e il TS\_10+, raccolti rispettivamente a Muggia e a Duino, sono risultati essere positivi al Mouse test per tossine DSP, mentre gli altri due campioni, il TS\_09- e il TS\_10- non sono risultati essere DSP contaminati e sono stati utilizzati come gruppo di controllo. I mitili sono stati raccolti in diversi siti del Golfo di Trieste, in **Figura 14** sono riportate le posizioni geografiche e gli ID dei siti di raccolta.

La concentrazione delle tossine DSP è stata determinata applicando il Mouse bioassay, previsto dal D.Lgs 165/2002. Tale procedura prevede presso i laboratori dell'ARPA-FVG, prevede l'estrazione della frazione lipidica mediante solventi, quali acetone, metanolo e

diclorometano dall'omogenato di polpa dei molluschi. Successivamente l'estratto viene separato in due frazioni che vengono utilizzate a fini di indagine per la ricerca di Acido Okadaico e di Yessotossine. Specificatamente per l'OA, il campione viene concentrato e risospeso in Tween 60 ed è così pronto per essere impiegato nel saggio del topo. La morte dei topi viene osservata dopo aver iniettato intraperitonealmente l'estratto e la loro morte indica la presenza delle tossine. Si osservano i topi per 24 ore per la presenza dell'Acido Okadico, e 5 ore per la presenza delle Yessotossine.

I campioni sono stati raccolti in due anni consecutivi, il 2009 e il 2010 e la **Tabella 2** riporta i principali dettagli riguardanti le date di campionamento, la positività o meno alla presenza di tossine DSP e il metodo con il quale è stato rilevato.

**Tabella 2** Dettagli relativi ai campioni naturalmente contaminati forniti dall'ARPA-FVG: partendo dalla colonna di sinistra è riportato l'identificativo del campione, poi la sigla del sito di raccolta, la data di campionamento e la concentrazione di tossine DSP rilevate. Per tutti i campioni il metodo utilizzato per rilevarle le tossine è stato il saggio del topo.

Sample ID	Sampling place ID	Sampling place location	Date	DSP concentration
TS_09 -	12-TS	Timavo's mouth	9.06.2009	negative
TS_09 +	02-TS	Muggia	1.07.2009	Mice death between 5 and 19 hours
TS_10 -	06-TS	S. Croce	26.04.2010	negative
TS_10 +	10-TS	Duino	26.04.2010	Mice death between 5 and 19 hours

## 3.2.1 qRT PCR

Sui campioni naturalmente contaminati e sui relativi gruppi di controllo si è deciso di verificare se fosse possibile evidenziare un pattern di espressione comune a quello individuato durante la contaminazione sperimentale con l'OA.

A questo scopo sono stati disegnati primer specifici per sequenze sovra espresse nell'esperimento di microarray portando il set di geni selezionati da un numero di 8 trascritti a 14. È stata condotta una ricerca approfondita sui geni housekeeping specifici per mitilo. Osservando la lista dei trascritti che non avevano espressioni differenziate tra i vari time point analizzati nel microarray, sono stati scelti due trascritti che possedevano gli A-value ( $A = \frac{1}{2} \log(\text{channel}_{\text{Red}} * \text{channel}_{\text{Green}})$ ) più elevati e gli M-value ( $M = \log(\text{channel}_{\text{Red}}/\text{channel}_{\text{Green}})$ ) intorno a zero. Gli A-value indicano le intensità rilevate negli spot dove sono ibridati i geni in considerazione, quindi avere elevati livelli di intensità fa sì che il livello di espressione di un determinato gene sia a sua volta elevato. Gli M-value, invece, indicano la predominanza del canale rosso su quello verde. Quindi con un valore di M pari a zero viene osservato un segnale del canale del rosso uguale a quello del canale del verde, sapendo così che quel trascritto non è né sovraespresso e nemmeno silenziato. In definitiva, ho scelto trascritti non differenzialmente espressi, ma che avessero un buon livello di espressione.

I geni reference scelti secondo questo criterio sono stati il fattore di allungamento 1 alfa (EF1- $\alpha$ ) [157-161], e il fattore di allungamento 2 (EF-2) [161, 162].

**Tabella 3** Lista dei primer utilizzati in qRT PCR sui campioni naturalmente contaminati. I primi due sistemi, Elongation factor 1-alpha ed Elongation factor 2 sono i due trascritti housekeeping come normalizzatori.

MytiBase ID Cluster	Targeted gene	Sense	Primer sequences, 5'-3'	Amplicon size (bp)
MGC00145	Elongation factor 1-alpha	reverse	GGCTGGAGCAAAGGTAACAA	145
		forward	CCTCCACCATCAAGACCTA	
MGC00047	Elongation factor 2	reverse	TCCTTCAGGTCCAAAACACC	144
		forward	TTACCAGAAGGCTGTGCTGA	
MGC00038	Veliger digestive gland 3 (Vdg 3)	reverse	AAGCGGTGAACCAAACCTCTG	90
		forward	TGAATGCCACACACTCATCC	
MGC00464	Heat shock protein 90	reverse	ACAATGCAACAAGGGGAGGT	81
		forward	AGTAATGAAAGACATCCTGGACAAG	
MGC01563	Without similarity (non coding transcript)	reverse	TGGCCAGTAGTTTCAGAGG	126
		forward	CAACATGACGGAAATGGTCA	
MGC01714	Without similarity	reverse	CCGTCTCTCCATCTTTGTCC	142
		forward	CAGGCATGATTCCATCACAG	
MGC02033	CG17838-PD, isoform D (RNA binding protein)	reverse	CATCCAGTGCCTTTTCATCT	139
		forward	ATGGCAGAGACGGACAATC	
MGC02106	Without similarity (vWFA containing protein)	reverse	ACCAGAAGCATCCAAGAGGA	99
		forward	AGCATGCTCCCAACATATCC	
MGC02188	CREB protein-like (Fragment)	reverse	CTGGCACTCTGTCTGTCTACG	130
		forward	TGGACAGCACAGTCATGGAT	

MytiBase Cluster	Targeted gene	Sense	Primer sequences, 5'-3'	Amplicon size (bp)
MGC02221	Without similarity (non coding transcript)	reverse	CGGGAGTCATCGGATACATT	124
		forward	CGTCGTCGTCGGTAACTTT	
MGC02223	Endo-1,4-mannanase, exons 1-6	reverse	GCCCCACATCAAGGATATGA	123
		forward	GCGTGTTGGGTTGGTAGATT	
MGC02225	Reductase-related protein	reverse	TCCACAAAATGGGGTTAGGA	150
		forward	CCATGACACTGGAAGAAGCA	
MGC02229	Without similarity (non coding transcript)	reverse	ACGGGTTCTGGTGAATCGTA	135
		forward	CAGGCAACACTTGAAATCCA	
MGC02386	Aldehyde dehydrogenase	reverse	TGCCAAACCATAACTGTTCG	82
		forward	TGGTCCAGTGATGCCAATTA	
MGC02558	Without similarity	reverse	ACAAGTCGTGACCTGGGAAC	119
		forward	CTGGGATGCTAGGGACAAAC	
MGC03065	Partial ubiquitin gene	reverse	TGCACAAAAGTTTCGTCTTG	101
		forward	CCACACTCCATCTGGTTTTG	

I primer sono stati disegnati utilizzando il programma on-line Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), seguendo le linee guida sopra descritte e la formazioni di possibili dimeri o strutture secondarie è stata controllata con il programma Oligocalculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) disponibile in internet.

Per tutti i campioni considerati 1  $\mu$ g di RNA totale è stato trattato con Turbo DNase (Life Technologies) e retro trascritto in un volume di 15  $\mu$ L usando 1 U di iScript Reverse Transcriptase (iScript cDNA Synthesis kit, Bio Rad). Le reazioni di PCR sono state eseguite nel termociclatore CFX96 Real-Time PCR (Bio Rad) usando l'iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad) seguendo le indicazioni riportate dal produttore e utilizzando il seguente profilo termico: 95 °C per 5', seguito da 40 cicli a 95 °C per 30", 56 °C per 20", 72°C per 30", e una melt curve da 65 a 95 °C con un incremento di temperatura di 0,5°C ogni 0,5". Le reazioni di PCR sono state condotte in triplicato comparandole con quelle dei campioni di controllo attraverso un metodo di quantificazione relativa [145].

Le efficienze di PCR sono state calcolate con il programma LinReg [156], utilizzando le impostazioni di default. I dati ottenuti dalle qRT-PCR sono stati analizzati ed elaborati con il software Bio Rad CFX Manager (versione 1.0.1035.131) utilizzando le impostazioni di default.

## 3.3 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE

Non conoscendo a priori quale tipologia di proteine possa avere un diretto coinvolgimento con le tossine DSP (cioè se di natura acida, basica, ecc.) ho deciso di applicare un protocollo di estrazione in 3 step che mi permettesse di recuperare in una sola operazione di estrazione proteine solubili in 3 diverse soluzioni, rispettivamente salina, alcolica e acida.

## 3.3.1 PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE

Il protocollo di estrazione applicato è una modifica di Silano [163], che è un metodo utilizzato per recuperare le componenti proteiche da sfarinato, ma che può essere usato anche per le proteine animali, in questo studio è stato utilizzato sulle polpe totali dei campioni naturalmente contaminati e fornitimi dall'ARPA-FVG.

Di ciascun campione analizzato, TS\_09+ e il TS\_10+, e i loro rispettivi controlli negativi TS\_09- e il TS\_10- sono stati utilizzati 100 mg di polpa totale omogenata in 1 ml di soluzione  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  preparata utilizzando  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,04M e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,8M a pH 7,0. Dopo una rotazione Over Night a 4°C e una centrifuga a 14000 rpm a 15°C per 15' è stato raccolto il surnatante in nuovi tubi e conservato a 4°C. Il pellet depositato sul fondo, a seguito della centrifuga, è stato risospeso in 1ml di etanolo 70% con omogeneizzatore Dremel, perché molto compatto. Anche in questo caso i campioni sono stati messi a rotazione Over Day a 4°C. Dopo circa 9 ore, i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm a 15°C e per 15', il surnatante è stato raccolto e conservato a 4°C. Il pellet rimasto è stato a sua volta risospeso in 1 ml di Acido acetico 0,1M con omogeneizzatore Dremel e lasciato in rotazione Over Night a 4°C. I campioni sono stati tutti sottoposti a dialisi al fine di poter rimuovere i sali che potessero interferire nel gel di corsa. Per questo scopo i campioni sono stati posti in membrane della Spectra/Por, dalle seguenti caratteristiche: vol/cm 3,2 ml, m w cutoff 6000-8000, dry cylinder dia 20,4 mm e dry thickness .0012''. Le membrane sono state dapprima lavate in acqua deionizzata ( $\text{H}_2\text{O}$  DI), bollite per 10' in una soluzione di EDTA 1mM e successivamente lavate di nuovo con  $\text{H}_2\text{O}$  DI. Un ml di ciascun campione è stato inserito nelle membrane appositamente trattate e poste in acqua MilliQ in agitazione a 4°C per 1h30'. Tutti i campioni sono poi stati liofilizzati e il prodotto è stato conservato a -80°C.

Al momento del loro utilizzo i campioni sono stati risospesi in acqua MilliQ e per aiutare la solubilizzazione dei pellet sono stati aggiunti alla frazione solubile in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10mM di Tris-HCl a pH 6,8 e alla frazione solubile in Acido acetico un'ulteriore aggiunta di 0,05M di Acido acetico.

I campioni sono stati quantificati seguendo il Metodo Waddell [164] che prevede letture allo spettrofotometro leggendo una diluizione 1:500 alle lunghezze d'onda di 215 e di 225. La prima lunghezza d'onda è specifica per i legami peptidici e la seconda per il background. In media sono stati estratti 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  di frazione proteica in ciascun campione. Le rese minori (cioè di 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) si sono ottenute per le frazioni solubili in etanolo 70%.

Per la corsa su gel ad ogni campione è stata aggiunta una soluzione di Loading buffer a concentrazione finale 1X composta di Tris-HCl 200mM pH 6,8, DTT 400mM, SDS 8%, Glicerolo 40%, BBF a occhio e acqua MilliQ. Tutti i campioni sono poi stati fatti bollire per 10' e conservati in ghiaccio fino al loro caricamento su gel SDS-PAGE.

## 3.3.2 SDS-PAGE MONODIMENSIONALE

In due gel precasted di Tris-glicina (Mini-PROTEAN® 3 Cell, PowerPac Basic (Bio Rad) sono stati caricati 30  $\mu\text{g}$  di ciascun campione e fatti correre in un tampone di corsa MOPS-SDS 1X preparato con MOPS 1M, Tris 1M, SDS 69,3M

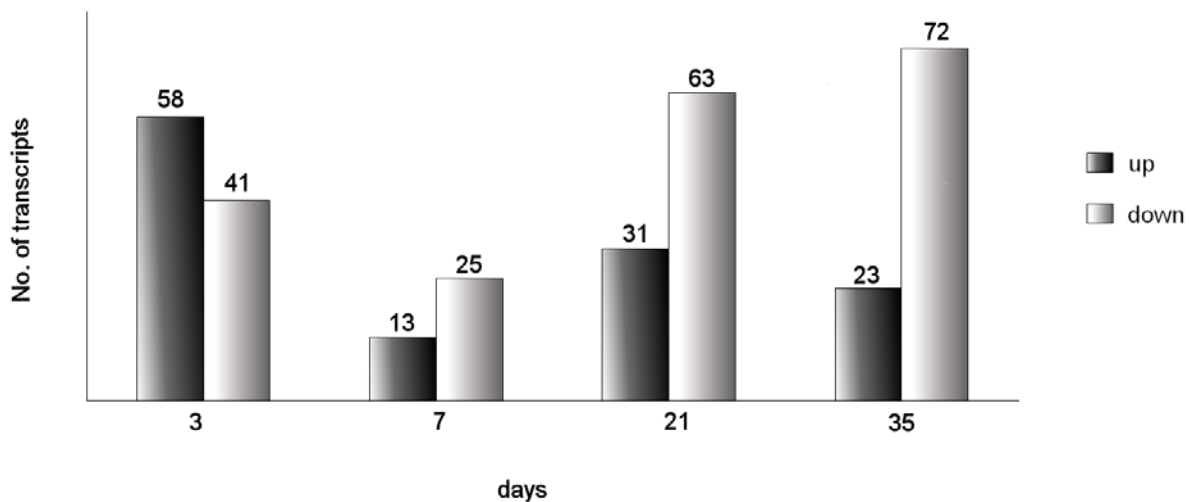
ed EDTA 20,5M, a 180 V. I gel sono stati lasciati a colorare Over Night in agitazione in una soluzione di colorazione preparata con 0,25 g Commassie Blu 250 colloidale, 225 ml di Metanolo, 225 ml di H<sub>2</sub>O DI e 50 ml di Acido acetico glaciale.

Il giorno successivo sono stati decolorati con una Destaining solution (Volume finale 500 ml) composta da 225 ml di Metanolo, 225 ml di H<sub>2</sub>O DI e 50 ml di Acido acetico glaciale e successivamente fotografati.

## 4.1 RISULTATI E DISCUSSIONE DELLO STUDIO SPERIMENTALE

## 4.1.1 PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA

I cambiamenti dell'espressione genica del mitilo mediterraneo contaminato con la biotossina OA sono stati analizzati attraverso l'utilizzo della piattaforma MytArray 1.0. Volendo ottenere maggiori serie di dati con un numero limitato di ibridazioni rispetto a un reference design [149], l'RNA ottenuto dai campioni prelevati in diversi time point del trattamento è stato comparato con gli altri in accordo con un Unsaturated Loop Design (riportato in **Figura 13**, nella sezione Materiali e Metodi a pagina 33). Dopo le procedure di normalizzazione e analisi statistica dei segnali di ibridazione, sono state ottenute 628 sonde risultate essere differenzialmente espresse nel corso dell'esperimento. La ridondanza delle EST è stata manualmente ridotta mediante un procedimento di clustering delle EST, ottenendo una lista finale di 326 trascritti differenzialmente regolati: 125 sovraespressi e 201 sottoespressi, distribuiti nei 4 punti sperimentali che sono stati analizzati in questo studio, come riportato nella **Figura 15**



**Figura 15** Numero dei trascritti differenzialmente espressi per punto sperimentale. I geni sovra espressi sono riportati in nero e quelli sottoespressi in grigio.

Come si può osservare dalla **Figura 15**, al terzo giorno di trattamento il numero dei trascritti sovra espressi (58) è più elevato di quelli sottoespressi (41), suggerendo che la sovraespressione, piuttosto marcata nel primo punto sperimentale, sia indicativa di un aggiustamento fisiologico o dell'attivazione di un possibile meccanismo di difesa indotto dal primo contatto con la tossina OA.

A 7 giorni dall'inizio del trattamento si osserva un generale decremento numerico sia dei trascritti up regolati e sia di quelli down regolati, suggerendo l'esistenza di una fase di acclimatazione rispetto alle dosi somministrate nei mitili.

Successivamente è evidenziabile, a 21-35 giorni dell'inizio del trattamento, una fase sub-acuta caratterizzata da un escalation di trascritti che vengono silenziati (72 trascritti repressi contro 23 sovraespressi), segnalando un possibile break down di molti processi cellulari causati dall'accumulo della tossina. Questo trend potrebbe essere spiegato con il progressivo aumento delle alterazioni cellulari indotte dall'OA, che potrebbe alterare alcuni pathway metabolici nel mitilo stesso.

Una risposta bifasica è stata riportata anche in mitili contaminati con acido domoico dove una fase acuta è stata riportata a 48 ore dall'inizio della contaminazione e una successiva fase di recupero è stata osservata a 7 giorni [165]. Anche nel caso riportato in questo studio di contaminazione con la biotossina OA a 7 giorni si osserva un generale decremento sia dei trascritti up regolati e sia di quelli down regolati.

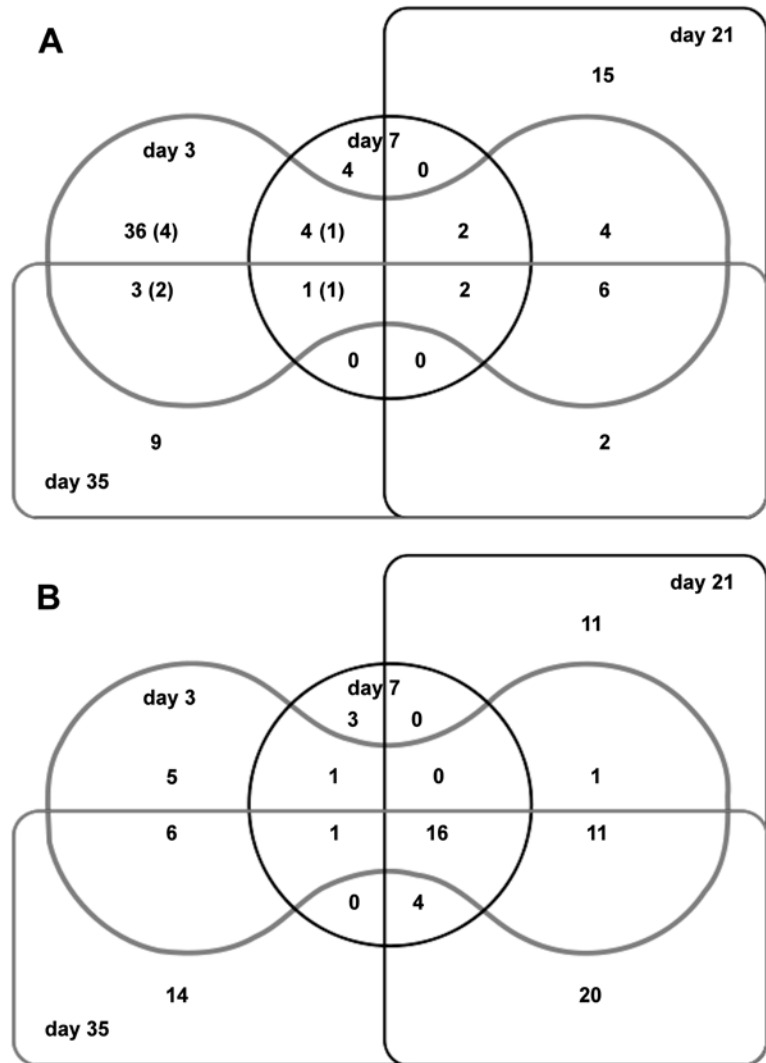
I diagrammi di Venn riportati in **Figura 16** (A e B riportano gli up e i down, rispettivamente), confermano il trend osservato nella **Figura 15** ed evidenziano il numero dei trascritti in comune a diversi time point o esclusivi di un punto sperimentale ben specifico. Il basso numero di trascritti sovra espressi e comuni ai 4 punti sperimentali analizzati (2) sottolinea il diverso stato funzionale dei mitili campionati alla prima o nella terza-quinta settimana, che potrebbe identificare quindi una risposta acuta e una sub-acuta, rispettivamente (**Figura 16 A**).

Al contrario, possiamo identificare 16 trascritti sottoespressi e comuni a tutti i time point, che probabilmente descrivono lo stress indotto da OA e rappresentano il 64% di quelli identificati al settimo giorno del trattamento (**Figura 16 B**).

Tra i trascritti sovra espressi al terzo giorno del trattamento, 36 su 58 (rappresentanti il 62%) sono esclusivi di questo punto sperimentale e putativamente identificano l'iniziale risposta acuta dei mitili alla biotossina. Ventidue su 58 trascritti invece sono espressi in uno o più successivi time point, suggerendo che circa il 40% dei trascritti sovra espressi al terzo giorno potrebbe giocare un ruolo nella risposta fisiologica a lungo termine alla presenza della tossina.

Se, come noi ipotizziamo, la terza e la quinta settimana descrivono una fase sub-acuta (che potrebbe divenire cronica in caso di continua e persistente contaminazione con OA), dovremmo attenderci una buona sovrapposizione dei trascritti espressi in questi due time point, infatti 51 trascritti sono condivisi in questi ultimi due punti sperimentali e ciò pare confermare l'ipotesi secondo la quale potrebbe essere presente un alterato stato fisiologico comune (**Figura 16 B**). Durante tutto lo studio non è stato riportato alcun caso di mortalità e questo indica un buon livello di salubrità delle condizioni dei mitili.

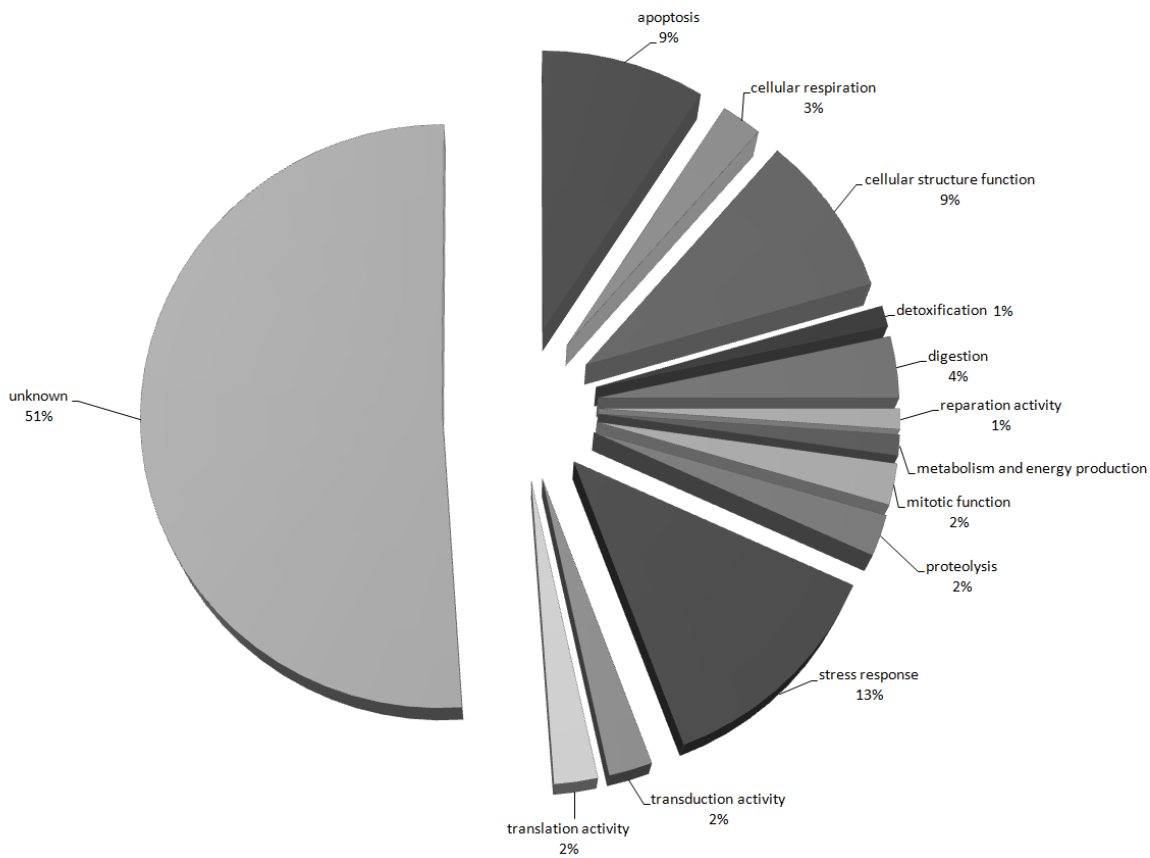
I geni coinvolti nella risposta allo stress operata dai bivalvi potrebbe ampiamente comprendere meccanismi di regolazione del ciclo cellulare, turnover proteico, detossificazione e meccanismi di immunità. Nell'ottica di identificare



**Figura 16** Diagramma 4-way di Venn dove sono rappresentati i numeri dei trascritti up- (A) e down-regolati (B) in relazione ai 4 punti sperimentali analizzati. Tra parentesi il numero dei trascritti utilizzati per la validazione mediante qRT-PCR.

trascritti correlati alla somministrazione di OA, si è deciso di focalizzarci sui trascritti sovra espressi perché, nonostante i trascritti sottoespressi siano di eguale importanza nella risposta alla presenza di OA nel mitilo, quelli sovra espressi sono più promettenti nell'ottica di future caratterizzazioni come l'identificazione di biomarker OA-correlati.

Le putative funzioni dei trascritti risultati essere sovra espressi sono state ottenute mediante l'utilizzo del programma annot8r [166] che permette di ottenere annotazioni delle sequenze peptidiche di interesse interrogando contemporaneamente tre banche dati, GO (Gene Ontology), EC (Enzyme Commission website) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Le ricerche mediante annot8r sono state comparate con le annotazioni ricavate dal MytiBase, talvolta incrementando le informazioni fin'ora possedute. Un riassunto dei risultati ottenuti dalle ricerche di annotazioni sui trascritti sovraespressi sono riportati nel diagramma a torta in **Figura 17**.



**Figura 17** Diagramma a torta rappresentante la distribuzione delle annotazioni delle principali categorie funzionali ottenute dai confronti con sequenze simili conservate nelle banche dati pubbliche di GO, EC e KEGG.

La categoria maggiormente rappresentata rimane quella dei geni a funzione sconosciuta con il 51% delle sequenze, seguita dalla categoria delle sequenze implicate nella risposta allo stress (come ad esempio heat shock proteins, MAPK signalling pathway) rappresentanti il 13%, trascritti implicati nell'apoptosi e nella funzione strutturale della cellula sono rappresentate entrambi dal 9%. Non risulta quindi semplice avere una dettagliata visione dei processi cellulari alterati dall'OA dal momento che la metà dei trascritti differenzialmente sovra espressi nell'intero studio non hanno similarità con le sequenze sia nucleotidiche, che proteiche, conservate nei database pubblici. Nonostante questo, se si considera la

loro rimarcata sovra espressione è ragionevole supporre che alcuni di questi trascritti siano direttamente correlati alla presenza di OA.

La lista completa dei trascritti differenzialmente espressi con le relative annotazioni ottenute dal MytiBase è riportata nelle Informazioni di supporto nella **Tabella S2** e fornisce una panoramica generale dei cambiamenti funzionali che avvengono nella ghiandola digestiva dei mitili contaminati con OA. In **Tabella 4** invece è riportata la lista dei 58 geni sovra espressi al terzo giorno dall'inizio dell'esperimento. Questi trascritti hanno costituito il set di geni utilizzati per indagare un "early warning" nei mitili trattati con OA.

In accordo con le annotazioni funzionali, la maggior parte dei trascritti sovra espressi a funzione conosciuta ricadono principalmente in 3 categorie, precisamente struttura cellulare, apoptosi e stress. Qui di seguito è riportata una breve discussione di queste 3 principali categorie e le loro possibili implicazioni nelle risposte fisiologiche ad una contaminazione di OA.

**Tabella 4** Lista dei trascritti sovra espressi al terzo giorno dall'inizio del trattamento con le relative annotazioni.

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>
MGC00206	AJ625054	Without similarity	/
<u>MGC00038</u>	AJ624419	Veliger digestive gland 3	/
MGC00464	AJ625974	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region
<b>MGC00665</b>	AJ623726	Ubiquitin C variant (Fragment)	Ubiquitin
<b>MGC00670</b>	AJ625915	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region
<b>MGC01310</b>	AJ625403	Heat shock protein 70	Heat shock protein Hsp70, Heat shock protein 70
<u>MGC01332</u>	AJ516362	gene for endo-1,4-mannanase	/
<b>MGC01366</b>	AJ516421	Heat shock cognate 70	/
MGC01399	AJ625117	Without similarity	/
MGC01436	AJ516533	Without similarity	/
<b>MGC01455</b>	AJ624248	Elongation factor 2	Protein synthesis factor, GTP-binding
MGC01523	AJ516688	Without similarity	/
<u>MGC01563</u>	AJ516757	Without similarity	/
MGC01566	AJ516760	Without similarity	/
MGC01622	AJ516858	gene for twitchin	/
<b>MGC01624</b>	AJ623451	C-myc proto-oncogene homolog (Fragment)	von Willebrand factor, type C; Metridin-like ShK toxin
MGC01692	AJ623424	C-myc proto-oncogene homolog protein, (Fragment)	von Willebrand factor, type C
MGC01710	AJ623462	Without similarity	/
MGC01714	AJ623482	Without similarity	/
<b>MGC01731</b>	AJ625123	Elongation factor-1 gamma (Fragment)	Translation elongation factor EF1B gamma chain
MGC01750	AJ623586	Without similarity	/
MGC01789	AJ623701	Without similarity	/
MGC01856	AJ623958	Without similarity	/
MGC01886	AJ624023	Without similarity	/
MGC01920	AJ624089	DEAD-box RNA-dependent helicase p68	ATP-dependent helicase; DEAD/DEAH box helicase
MGC01960	AJ624147	Without similarity	/
MGC02033	AJ624622	CG17838-PD, isoform D	NA-binding region RNP-1; HnRNP
MGC02047	AJ624274	Heat shock cognate 71	/
<b>MGC02065</b>	AJ624300	40S ribosomal protein S4 (Fragment)	Ribosomal protein S4E; KOW
MGC02104	AJ624351	Without similarity	/
MGC02106	AJ624353	Without similarity	von Willebrand factor, type A
MGC02124	AJ624391	Without similarity	/
<b>MGC02152</b>	AJ624440	Without similarity	/

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>
<u>MGC02188</u>	AJ624494	CAMP responsive element binding protein-like	/
MGC02221	AJ624541	Without similarity	/
<u>MGC02223</u>	AJ624543	gene for endo-1,4-mannanase	/
MGC02225	AJ624544	Reductase-related protein	NAD-dependent epimerase/dehydratase
<b>MGC02229</b>	AJ624552	Without similarity	/
<b>MGC02267</b>	AJ624615	heat shock cognate 71	Heat shock protein Hsp70; Heat shock protein 70
MGC02369	AJ624748	Without similarity	C2 calcium-dependent membrane targeting
MGC02386	AJ624775	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	Aldehyde dehydrogenase
MGC02470	AJ624889	Without similarity	Fumarate lyase
MGC02558	AJ625004	Without similarity	/
MGC02591	AJ625039	Without similarity	/
MGC02624	AJ625082	Without similarity	/
MGC02661	AJ625141	Without similarity	/
<b>MGC02672</b>	AJ625159	Without similarity	/
<b>MGC02998</b>	AJ625768	Without similarity	/
MGC03002	AJ625614	Without similarity	/
<u><b>MGC03065</b></u>	AJ625700	Partial Ubiquitin gene	Ubiquitin
MGC03210	AJ626006	C-myc proto-oncogene homolog protein (Fragment)	von Willebrand factor, type C; Metridin-like ShK toxin
MGC03253	AJ626184	Int-6 protein	Proteasome component region PCI
MGC03342	AJ626232	Without similarity	/
MGC03388	AJ626305	Without similarity	/
<b>MGC03415</b>	AJ626346	gene for twitchin	/
MGC03427	AJ626361	Heat shock cognate 71	/
<b>MGC03464</b>	AJ626416	Without similarity	/
MGC10001	AJ623880	mitochondrion	/

L'OA causa la perdita nella stabilità dell'adesione focale e una perdita nell'organizzazione del citoscheletro, questi effetti sono conseguenza di un'alterazione nello stato di fosforilazione della tirosina delle proteine chinasi e delle paxilline, tipiche proteine di adesione focale [167]. Inoltre, è ben documentata in letteratura l'azione dell'OA nell'inibizione dell'attività fosfatase della proteina PP2A, che causa la dissociazione dei microtubuli (MT) e la destabilizzazione del loro network, causando così la destrutturazione del citoscheletro in toto [168]. E' chiaro che la mancanza di una corretta struttura cellulare compromette molte importanti funzioni quali la funzione meccanica e strutturale della cellula, la migrazione di molecole associate ai pathway apoptotici e fagocitari, che sono alla base dell'eliminazione di prodotti dannosi o danneggiati, l'integrità e la comunicazione cellulare, inoltre i microtubuli determinano le posizioni degli organelli e dirigono il trasporto intracellulare (ad esempio nella formazione del fuso mitotico). E' quindi interessante notare che, in accordo con le annotazioni funzionali, circa il 9% dei trascritti sovra espressi sono potenzialmente coinvolti nell'organizzazione del citoscheletro, suggerendo una relazione con l'effetto destabilizzante dell'OA. In particolare, vi è una sovra espressione, già dal terzo giorno, di trascritti codificanti per l'actina (cluster MytiBase: MGC00318), per l'mRNA del precollagene-P (MGC02420) e per il gene twitchin (MGC01622 e MGC03415), tutti direttamente coinvolti nell'organizzazione della struttura cellulare.

E' stata ipotizzata l'induzione della risposta apoptotica considerata la presenza del 9% dei trascritti risultati sovra espressi appartenenti a questa funzione. In particolare sono stati identificati fattori induttori dell'apoptosi (MGC00694 e MGC02980), un regolatore dell'apoptosi (MGC02287) e gli omologhi del C-myc proto oncogene (MGC01558, MGC01624, MGC03210 e MGC01692) la cui regolazione è fondamentale per dirigere le cellule verso la via apoptotica [169, 170].

Sono stati anche identificati trascritti sovra espressi codificanti per attività di degradazione, tipica di situazioni critiche, quando proteine ripiegate non correttamente vengono accumulate e sono indirizzate alla via del proteasoma attraverso l'aggiunta di catene di ubiquitina. L'attività proteolitica, rappresentata solo dal 2% dei trascritti sovra espressi è comunque legata alla via apoptotica. Vari mRNA coinvolti nell'attività proteasomica sono risultati essere sovra espressi, come il parziale mRNA per la variante C dell'ubiquitina e un gene parziale dell'ubiquitina (MGC00665 e MGC03065, rispettivamente).

Un altro trascritto sovra espresso codifica putativamente per una Integration site 6 protein (Int-6) (MGC03253) ed è caratterizzato da un dominio proteico a funzione proteasomale. Un possibile collegamento al trattamento con OA e questa sovra espressione potrebbe essere spiegata dal fatto che i proteasomi sono direttamente coinvolti nella degradazione delle proteine tau [171], una componente presente nel compartimento dei microtubuli. La proteina tau rimane in uno stato di iperfosforilazione a seguito dell'inibizione della PP2A indotta dall'azione dell'OA e questo direttamente stimola un aumento dell'attività del proteasoma [172].

Come atteso, è stata osservata una sovra regolazione dei geni legati allo stress, come ad esempio le heat shock protein (HSP) rappresentate dal 13% di tutti i trascritti sovra espressi. Le HSP vengono reclutate per fronteggiare un ampio range di fattori di stress ambientali e la loro espressione viene scatenata da proteine ossidate o parzialmente denaturate o mal ripiegate presenti nelle cellule [173]. La sovra espressione di diverse HSP, in particolare HSP90 durante il trattamento con l'OA, conferma, in condizioni sperimentali, la capacità da parte dell'OA di causare danni a livello molecolare nel mitilo. Le HSP90 e 70 possono interagire direttamente con una ubiquitina-ligasi, detta CHIP (Carboxyl terminus of the Hsc70-Interacting Protein) nell'uomo. Questo complesso chaperonico CHIP/HSP induce l'ubiquitinazione delle proteine associate ai microtubuli (MAP), tau [173] quando si verifica l'accumulo di aggregati proteici anormali. Una situazione simile, caratterizzata da aggregati iperfosforilati di tau, potrebbe essersi verificata a seguito della somministrazione di OA [168, 172].

Prese insieme le categorie dei trascritti più sovra espresse potrebbero essere correlate all'effetto di destabilizzazione del citoscheletro indotta dall'OA e ai processi cellulari conseguentemente attivati (stimolazione dell'ubiquitinazione/attività proteasomica). Questa ipotesi dell'espressione genica indotta dall'OA si confà con le analisi istologiche che hanno evidenziato la presenza di una degenerazione delle cellule della ghiandola digestiva evidenziate alla seconda settimana dall'esposizione con l'OA [148]. Inoltre, considerando che più della metà dei trascritti sovra espressi rimane ancora a funzione sconosciuta, non è semplice ottenere una chiara e ben definita visione degli effetti molecolari che l'OA esercita nel mitilo. Successive analisi funzionali dirette alle sequenze sconosciute potrebbero permettere di incrementare le conoscenze sui pathway metabolici direttamente associati agli effetti esercitati dall'OA.

#### 4.1.2 VALIDAZIONE MEDIANTE qRT PCR

Otto trascritti sovraespressi al terzo giorno dall'inizio della contaminazione con OA, nella piattaforma di microarray MytArray 1.0, sono stati testati mediante qRT PCR sia per validare i risultati del microarray e sia per individuare putativi marcatori della presenza di OA. Gli stessi trascritti sono anche stati testati nei mitili trattati con il clone non tossico AL1T e in mitili trattati con il clone tossico AL9T di *A. minutum*, un produttore di tossine PSP (Paralytic Shellfish Poisoning). Il pool trattato con AL1T è stato utilizzato come gruppo di controllo sul quale sono stati normalizzati i livelli di espressione in accordo con il metodo di quantificazione relativa di Pfaffl [145]. La selezione di queste sequenze nucleotidiche (sottolineate nella **Tabella 4**) è stata operata selezionando i trascritti che avessero una media di A-value (media del log<sub>2</sub> del livello di espressione di un gene rispetto ai canali e a tutti i microarray

dell'esperimento) più alta tra i valori di media degli A-value appartenenti alle EST presenti sul MytArray 1.0, nella totalità delle piattaforme impiegate in questo studio. Per poter operare un'indagine rappresentativa e ottenere una buona validazione ci siamo focalizzati sui trascritti sovra espressi condivisi tra più time point dell'esperimento o esclusivi di un singolo punto sperimentale (riportati tra parentesi nella **Figura 16 A**) che avessero sia una ben delineata annotazione e quindi un'elevata similarità con sequenze nucleotidiche conservate nelle banche dati pubbliche o su sequenze tutt'ora sconosciute. Il gene housekeeping utilizzato come standard interno nella qRT PCR è stato individuato tra i non differenzialmente espressi nel MytArray 1.0 che avessero i più alti A-value. Il gene reference risultato da questa ricerca è stata la proteina ribosomale L19, impiegata come reference anche in letteratura [174]. Le sequenze dei primer utilizzati nella qRT PCR e le relative dimensioni degli ampliconi sono riportate in **Tabella 1**, nella sezione 3.1 dei Materiali e Metodi. In accordo con il metodo di quantificazione relativa di Pfaffl è stata operata una procedura di normalizzazione (applicando uno Standard Error Mean  $\pm 1$ ) utilizzando il gene housekeeping e il campione non trattato raccolto a 3 giorni dall'inizio dell'esperimento, come normalizzatori.

Nella **Figura 18**, riportata qui di seguito, vengono globalmente illustrati i risultati della normalizzazione dei livelli di espressione genica nei gruppi trattati con OA (T1A e T1B) e in quelli trattati con il clone tossico AL9T di *A. minutum* (t1a e t1b). Oltre a evidenziare una differenza inter-individuale nel livello di espressione nei diversi pool, i dati ottenuti rivelano un trend simile a quello ottenuto con i microarray. Come indicato in **Figura 18**, 4 trascritti testati su 8 (rappresentanti il 50%) sono stati trovati up regolati anche nei mitili trattati con *A. minutum* e 2 su 8 (25%) sono risultati essere down regolati nei mitili trattati con *A. minutum*, ma sovra espressi nei mitili trattati con OA. Tra i trascritti che sono risultati essere sovra espressi in entrambi i trattamenti c'è da notare che c'è una rimarcabile differenza nei livelli di espressione tra i due trattamenti. Ad esempio, il fattore di allungamento 1-gamma (EF1- $\gamma$ ) appartenente al cluster riportato in MytiBase MGC01731 è ventidue volte più elevato nei mitili trattati con OA, similmente il trascritto codificante per veliger digestive gland 3 (vdg3) appartenente al cluster MGC00038, è up regolato in entrambi i trattamenti, con un valore normalizzato di espressione 4,4 volte più elevato nei mitili trattati con OA. Da queste considerazioni i trascritti validati mediante qRT PCR forniscono, nelle condizioni sperimentali del nostro esperimento, due pattern trascrizionali distinti. Questa validazione ha permesso di distinguere i trascritti putativamente correlati all'OA e quelli relativi ad una risposta generale dello stress. Per questa ragione ulteriori validazioni sui 58 trascritti differenzialmente sovra espressi a 3 giorni dall'inizio del trattamento potrebbero dare maggiori informazioni sul profilo genico correlato alla presenza di OA.

Recenti studi in *Mytilus* spp hanno riportato correlazioni nella trascrizione genica in risposta a mix di petrolio e mercurio [101], al rame [100], al benzo(a)pirene [175] e a condizionidi ipossia [176].

Similmente, in questo studio sono stati identificati trascritti differenzialmente espressi in risposta a una contaminazione con OA in *Mytilus galloprovincialis* attraverso l'utilizzo di una piattaforma di microarray.

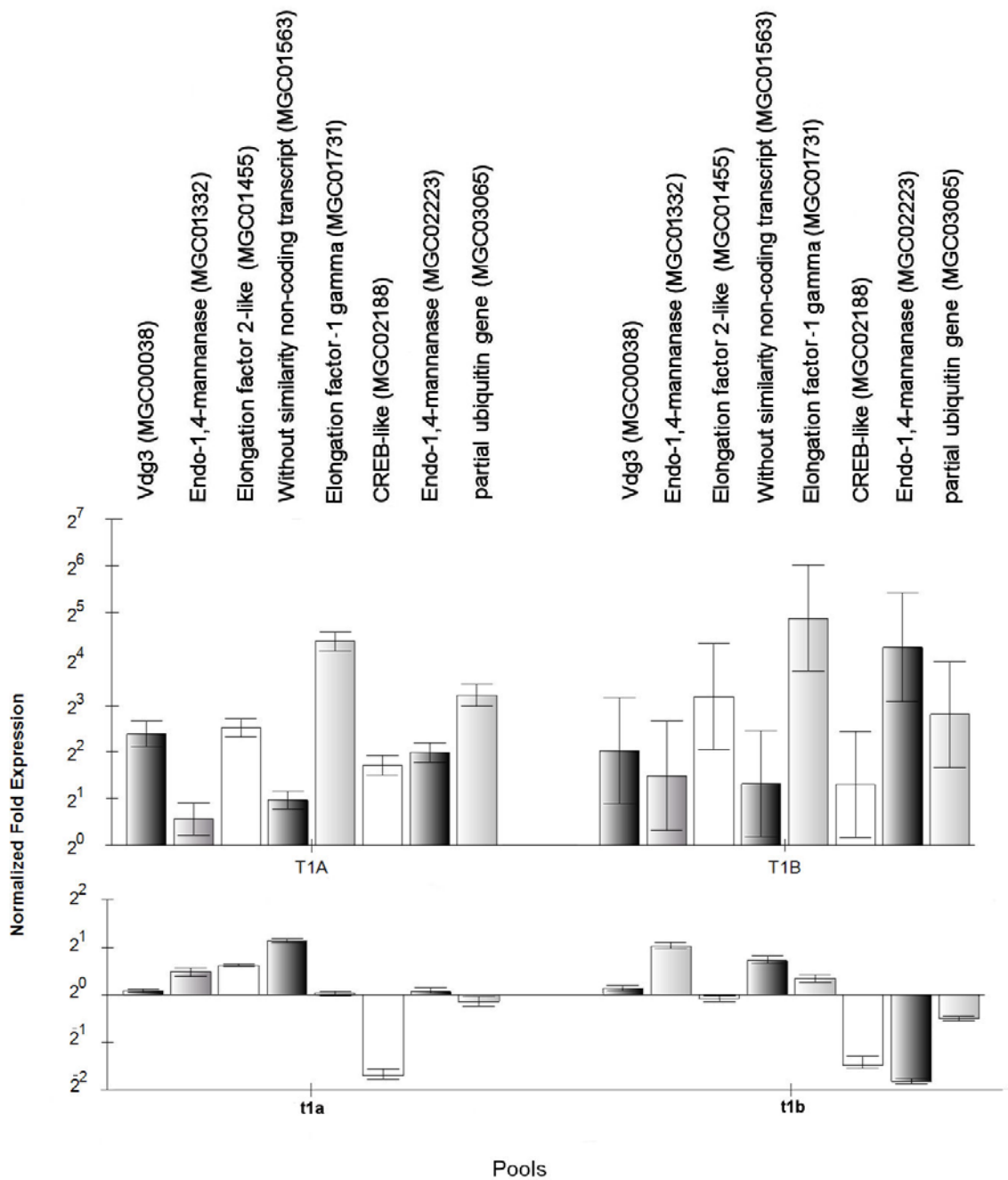


Figura 18 Validazione dei dati attraverso qRT PCR. Otto trascritti sono stati testati in mitili trattati con OA e con *A. minutum* clone AL9T. T1A e T1B sono due pool di 3 mitili ciascuno contaminati con OA e t1a e t1b sono due pool di 3 mitili ciascuno contaminati con *A. minutum*. I mitili sono stati raccolti a 3 giorni dall'inizio dei trattamenti. Nella Figura sono riportate le annotazioni dei trascritti testati.

I risultati di esposizione ai tossici hanno un effetto diretto sull'espressione genica, dovuto alla specifica interazione dell'agente tossico con il suo recettore o indiretto, dovuto all'induzione di segnali a cascata intracellulari. È ragionevole supporre che un certo numero dei trascritti sovra espressi in questo studio non siano direttamente correlati all'esposizione con OA, ma possano appartenere ad un pathway di attivazione indiretta comune anche ad altri tipi di stress. Ad esempio la risposta delle Heat Shock (HSR) è anche stimolata dall'esposizione all'aria e a diverse temperature indicando che anche condizioni di ipossia potrebbe indurre l'espressione di Hsp90 e Hsp70 nei tessuti di *M.*

*Galloprovincialis* [177, 178]. Inoltre le stesse categorie trovate sopra espresse in questo studio, cioè degradazione proteica, folding e chaperoni, trafficking e signalling intracellulare e attività citoscheletrica sono state riportate in *L. elliptica* a seguito di stress termico [179]. Nondimeno, nel nostro esperimento, la temperatura dell'acqua è stata costantemente monitorata e non sono state riportate variazioni termiche, quindi i pathway molecolari up regolati in questo studio non sono conseguenti all'effetto degli stessi stress riportati in Truebano *et al*, 2010 [179].

Al fine di individuare trascritti specifici della contaminazione con OA, i trascritti sopra espressi a 3 giorni dall'inizio del trattamento sono stati comparati con i dati presentati in Venier *et al*. [128], nel quale sono stati identificati trascritti caratterizzanti un trattamento con metalli pesanti. Un totale di 16 trascritti è stato condiviso nell'esperimento di contaminazione con OA, questi trascritti sono riportati in grassetto in **Tabella 4**.

Nonostante la loro possibile implicazione in altri tipi di stress, la loro sovra espressione potrebbe ancora essere utile per la rilevazione di una contaminazione di OA, qualora appartenessero ad un set di geni coinvolti nella risposta specifica all'OA. Al contrario, 42 trascritti non sono stati rilevati nel trattamento con metalli pesanti e quindi sono potenzialmente coinvolti in una risposta specifica all'OA. Inoltre sono stati validati i dati ottenuti dall'applicazione del MytArray 1.0, analizzando un set di 8 trascritti mediante qRT PCR in due diverse tipologie di contaminazione, OA e saxitossina (mediante contaminazione con il ceppo tossico AL9T di *A. minutum*) (**Figura 18**).

Nonostante sia estremamente problematico rilevare la presenza di due diverse contaminazioni osservando semplicemente la magnitudo di espressione di specifici geni, sono stati individuati due trascritti, tra quelli validati, che sono stati sovra espressi nei mitili contaminati con OA e sotto espressi in quelli contaminati con *A. minutum*.

Il cAMP responsive element binding-protein-like (CREB-like) e un gene parziale codificante per l'ubiquitina hanno mostrato di avere un trend di espressione opposto rispetto ai due trattamenti. Dalla letteratura si è visto che la somministrazione di OA aumenta i livelli di CREB-fosforilata. La fosforilazione è necessaria per far sì che il CREB legghi il cAMP response element nel promotore di alcuni geni di risposta precoce, quindi l'espressione di questi geni è essenzialmente regolata dallo stato di fosforilazione di CREB. In letteratura è stato riportato che l'OA è un modulatore dell'espressione genica della fosforilazione di CREB in vitro [180] e per questo è ipotizzabile un'espressione differenziale dei trascritti coinvolti in questo meccanismo. Nondimeno il ruolo dell'ubiquitina è già stato descritto in questo studio. Ulteriori e future analisi comparative condotte su altri stressori ambientali (ad esempio la temperatura, l'ipossia, la salinità, la forza predatoria o altri contaminanti) potrebbero essere direzionate al fine di individuare marcatori specifici per l'OA.

Sarebbe inoltre interessante estendere i dati ottenuti in questo studio genico ad altre piattaforme di microarray specifiche per specie strettamente correlate al mitilo, le quali potrebbero fornire ulteriori informazioni sul profilo dell'espressione genica di bivalvi di interesse commerciale, come *Crassostrea virginica* e *C. gigas*. Due diverse piattaforme di microarray sono state prodotte proprio da queste due specie [181] e [182].

All'interno dei trascritti differenzialmente espressi in questo studio, 1/3, cioè 56 e 49 nelle piattaforme di Jenny [181] e Fleury [182], rispettivamente sono rappresentati nei trascritti ortologi delle due piattaforme menzionate.

L'avvento del sequenziamento di Next generation aprirà nuove frontiere in questo campo di ricerca sia sugli organismi modello e sia in quelli di cui non si possiede ancora il genoma. I geni direttamente attivati da una contaminazione di OA potrebbero essere individuati nel set di trascritti ad oggi sconosciuti, dal momento che gli effetti fisiologici dell'OA nei mitili sono per la maggior parte completamente sconosciuti.

## 4.2 RISULTATI E DISCUSSIONE DELLO STUDIO SUI NATURALMENTE CONTAMINATI

Per poter trovare una correlazione tra i dati ottenuti durante le contaminazioni in vasca con OA e quello che avviene a livello trascrizionale nei mitili durante un evento di contaminazione da tossine DSP, si è analizzato un set di 14 trascritti risultati essere sovra espressi nell'esperimento di microarray [183]. Quattro campioni raccolti nel Golfo di Trieste, due negativi e due positivi alla presenza di DSP mediante l'applicazione del saggio del topo, sono stati indagati analizzando i 14 trascritti scelti. I campioni sottoposti ad analisi sono stati raccolti in due anni successivi, nel Luglio 2009 e nell'Aprile 2010 nel Golfo di Trieste, come riportato in **Figura 14**. I trascritti scelti sono stati testati mediante qRT PCR utilizzando come geni housekeeping l'Elongation Factor 1- $\alpha$  (EF-1- $\alpha$ ) e l'Elongation Factor 2 (EF-2). La scelta di questi due geni è stata operata tra tutti i trascritti che avevano un'espressione stabile nella piattaforma di microarray, ed essi sono risultati avere un segnale di intensità maggiore della proteina ribosomale L19 (RpL19), utilizzata come normalizzatore nell'esperimento precedente, nonostante questa scelta possiamo affermare che RpL19 rimane un buon housekeeping. Inoltre EF-1- $\alpha$  e EF-2 sono risultati essere stabili, per cui housekeeping ottimali, anche in *Ostrea edulis* [157], ed EF-2 in *Mya arenaria* [161].

Dal momento che le concentrazioni di tossine DSP accumulate nei mitili possono essere diverse e influenzate da numerosi parametri ambientali e stagionali (come ad esempio la salinità, la temperatura, la fase riproduttiva, ecc) queste possono variare tra i due campioni analizzati. Per questa ragione ci si attende un trend di espressione comune nei trascritti la cui regolazione viene modulata dalle tossine DSP, ma non necessariamente uno stesso valore di espressione. I risultati ottenuti dalla qRT PCR sui due pool di mitili raccolti durante due diversi eventi di DSP e la cui espressione è stata normalizzata utilizzando mitili non contaminati e i due geni reference scelti, sono riportati in **Figura 19** (dati pubblicati in [184]).

Il trend comune che si osserva nei due diversi pool suggerisce che potrebbero esserci comuni pathway molecolari influenzati dalla contaminazione di tossine DSP.

Applicando un cut-off di 2 al livello di espressione trascrizionale, 9 trascritti su 14 (il 64%) vengono confermati come sovra espressi in entrambi i campioni analizzati. Il gene più sovra espresso risulta essere un trascritto rappresentato in MytiBase dal cluster MGC01714, la cui funzione è ancora sconosciuta.

Un trascritto, la veliger digestive gland 3 (Vdg3; MGC00038), ha confermato la propria sovra espressione nei campioni naturalmente contaminati, dato ottenuto anche nel precedente studio. Di questa proteina è tutt'ora sconosciuta la precisa funzione, ma si sa che è coinvolta nello sviluppo della regolazione cellulare ed è stata rilevata in *Hyriopsis cumingii* a seguito di contaminazione con microcistine-LR, che sono potenti epatotossine [185]. Sono anche risultati essere sovraespressi sono una proteina con un'attività di RNA-binding (MGC02033), una proteina contenente un dominio von Willebrand factor, type A (MGC02106), una proteina con una putativa attività reduttasica (MGC02225) e 5 trascritti che risultano tutt'ora a funzione sconosciuta (MGC01563, MGC02221, MGC02229 e MGC02558).

È stata riportata la sovra regolazione di 3 trascritti la cui espressione è risultata però essere inferiore al cut-off applicato di 2, e sono un cyclic AMP response element-binding (CREB)-like (MGC02188), un partial ubiquitin gene (MGC03065) e un'aldehyde dehydrogenase (MGC002386).

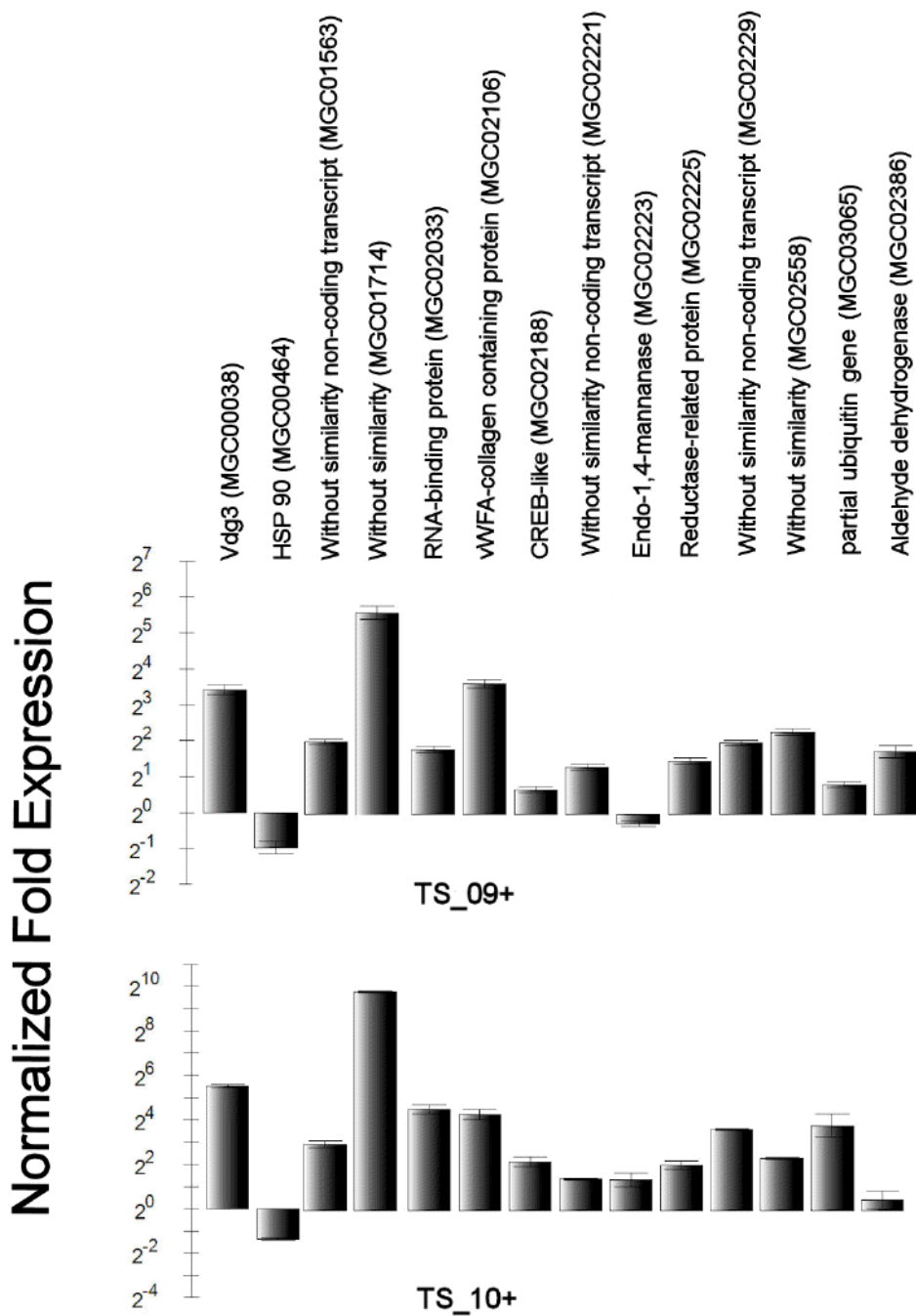


Figura 19 Livello di espressione normalizzato di 14 trascritti analizzati mediante qRT PCR in mitili naturalmente contaminati con tossine DSP. Nella Figura sono riportate le annotazioni dei trascritti testati

Due su 14 trascritti (MGC00464 e MGC02223) hanno avuto un trend di espressione in disaccordo con i risultati ottenuti con i microrarray, ed è ipotizzabile che l'espressione di questi trascritti non sia direttamente correlata alla presenza delle tossine DSP, quanto piuttosto sia influenzata da altri fattori ambientali.

Rimane un'incognita di non poca importanza, il riuscire, attraverso ulteriori studi condotti in mesocosmi e successivamente validati da campioni contaminati in natura a diversi tempi di esposizione, a correlare l'attivazione trascrizionale di alcuni trascritti in relazione al tempo di esposizione e di accumulo alle biotossine. Se come riportato

nello studio sperimentale le HSP vengono attivate in risposta al contatto immediato con la tossina e i campioni raccolti in natura sono stati esposti alle biotossine DSP per un tempo maggiore, la down regolazione di questi chaperoni non si discosterebbe dai dati sperimentali. Nonostante queste supposizioni e in un'ottica di individuazione e selezione di trascritti marcatori di tossine DSP l'HSP o altri trascritti presi singolarmente non sarebbero validi biomarker. È quindi necessario individuare pathway molecolari composti da diversi trascritti che vengano attivati durante le contaminazioni di dinoflagellati tossici.

L'analisi di questi campioni ha permesso di compiere un passo in più nel correlare i dati ottenuti dagli studi sperimentali con quello che avviene in un evento di contaminazione naturale. È stata osservata una buona concordanza tra i risultati ottenuti in ambiente controllato e quelli ricavati dall'analisi di campioni naturali, con 9 trascritti su 14 selezionati che hanno dimostrato avere un trend di espressione superiore del doppio rispetto ai mitili non contaminati.

Queste validazioni compiute su campioni naturalmente contaminati forniscono un'ulteriore informazione su quelli che sono i pattern di espressione trascrizionale attivati in presenza di DSP. In particolare è possibile ipotizzare che vi sia, nei campioni naturalmente contaminati, un silenziamento della HSP90 (MGC00464) analizzata, a favore di meccanismi di splicing alternativo dedotti dalla sovraespressione di 3 trascritti, che al momento si ipotizzano appartenere a regioni non codificanti delle HSP, cioè MGC01563, MGC02221 e MGC02229. Come sopra riportato anche un trascritto codificante per una Endo 1,4-mannanase (MGC02223) è risultato essere in opposizione con i dati ottenuti con il microarray. Questo enzima idrolizza i polisaccaridi ed è stato isolato da batteri [186-189], funghi [190], piante e molluschi. A differenza dei batteri, funghi e piante, nei molluschi non è stato bene determinato.

Altri trascritti, non validati precedentemente sui campioni contaminati con OA, sono quelli codificanti per un'aldeide deidrogenasi (MGC02386), la cui attivazione potrebbe essere correlata a meccanismi di detossificazione cellulare, una RNA binding-protein (MGC02033), una von Willebrand Factor, type A (MGC02106), una reductase-related protein (MGC02225) e altri due trascritti che al momento risultano essere sconosciuti (MGC01714 e MGC02558).

La scarsa conoscenza di quelli che sono i meccanismi di detossificazione e resistenza ai contaminanti dei mitili non rende possibile proporre oculate ipotesi di meccanismi d'azione molecolari messi in atto dal mitilo e basati sui trascritti che abbiamo validato essere sovra espressi in campioni naturalmente contaminati.

È quindi ragionevole affermare che attraverso un'analisi di qRT PCR è possibile analizzare trascritti specifici della ghiandola digestiva di mitili raccolti durante recenti eventi di contaminazioni da tossine DSP, al fine di rilevare la presenza di biotossine, come nel caso di questo studio, o di un contaminante. Risulta essere molto importante il poter disporre di un set di marcatori genici di una particolare contaminazione. Una volta ancora, il mitilo è risultato essere un importante biomarker ambientale e gli approcci molecolari applicati potrebbero essere utilizzati al fine di migliorare la comprensione degli effetti dello stress ambientale su organismi sentinella, possibilmente anche quando una contaminazione è presente nell'ambiente a basse concentrazioni.

## 4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE SULLA COMPONENTE PROTEICA

Come ultimo step di analisi di questo argomento si è deciso di recuperare e analizzare la componente proteica dalle polpe totali solo dei campioni forniti dall'ARPA-FVG, che essendo campioni naturalmente contaminati da tossine DSP sicuramente forniscono una visione più vicina a quello che succede nella realtà rispetto all'utilizzo di mitili contaminati con OA, in ambiente controllato.

Per analizzare la componente proteica è stato utilizzato un protocollo di estrazione a 3 step [163] che prevede di recuperare, con una sola estrazione, le componenti proteiche solubili in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , in Etanolo 70% e in Acido acetico.

Per tutte le estrazioni ho ottenuto una resa intorno a  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , fatta eccezione per la componente solubile in etanolo 70% della quale ho recuperato poco meno di un terzo ( $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). In un gel precasted di Tris-glicina ho caricato  $30 \mu\text{g}$  di ciascun campione e li ho fatti correre in un buffer di corsa MOPS 1X. Dopo le procedure di colorazione e destaining ho potuto osservare le bande proteiche solamente nella frazione solubile in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , riportate in **Figura 20**, ma non nelle altre soluzioni di solubilizzazione (figura non riportata).

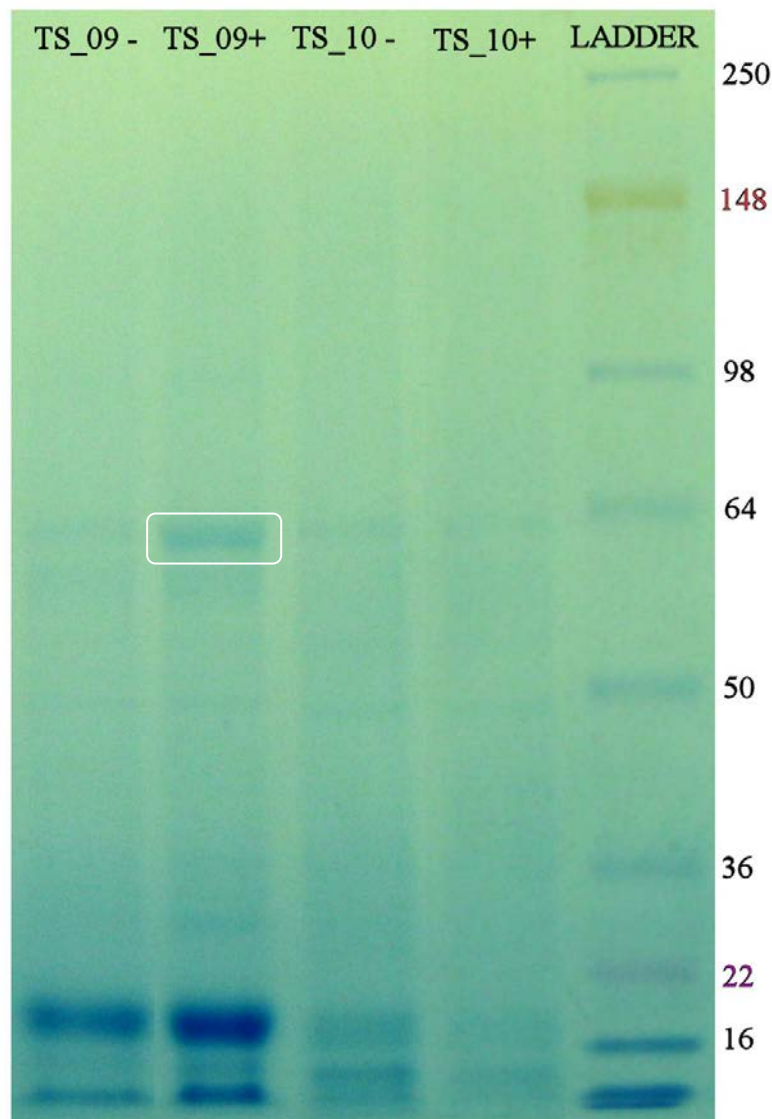


Figura 20 SDS-Page monodimensionale della frazione proteica solubile in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Ladder: See blue plus 2 Pre-Stained Standard (Invitrogen).

Come è possibile osservare nella Figura sopra riportata, è evidenziabile una banda nel campione TS\_09 + che non è presente nel relativo controllo, il TS\_09 -. possiede un peso molecolare di circa 64 KDa.

Tale banda, non è però visibile nel campione contaminato prelevato nel 2010. Al momento non sono in grado di spiegare la presenza della banda nel campione DSP positivo del 2009, e non in quello del 2010. Potrebbero essere molteplici le spiegazioni, ad esempio dal fatto che i campioni del 2009 e il negativo del 2010 (TS\_10 -) sono stati forniti come polpe omogeneizzate e congelate, mentre il campione positivo del 2010, il TS\_10 + è stato fornito come mitili congelati, ma interi. Potrebbe quindi essersi verificata in quest'ultimo campione una lisi della componente proteica in quanto il campione non è stato omogeneizzato subito e quindi ci potrebbe essere stato l'intervento di alcune proteasi. Similmente la banda evidenziata potrebbe non avere nessuna correlazione con la presenza di tossine DSP, ma questa ipotesi dovrebbe essere verificata a partire da campioni conservati nello stesso modo e mediante corse su gel bi-dimensionali, che oltre a separare le frazioni proteiche in base alla loro dimensione, le separa anche in base al loro punto isoelettrico, cioè il valore di pH per cui tutte le cariche positive e negative si annullano. In questo modo non si otterrebbero più delle bande, ma una serie di puntini (ognuno corrispondente ad una sola proteina) ed una risoluzione di gran lunga migliore rispetto alla elettroforesi monodimensionale.

Non possiedo quindi evidenze scientifiche per poter affermare con certezza che le bande proteiche individuate possano essere correlate alla presenza di tossine DSP, piuttosto che essere il risultato dell'effetto di qualche stato ambientale diverso dalla contaminazione rilevata. Ho ritenuto opportuno presentare anche il dato relativo alla componente proteica in quanto non si possiedono informazioni relative alle proteine prodotte e coinvolte nella risposta alla contaminazione di OA in mitilo.

Studi di questo tipo potrebbero evidenziare correlazioni con i trend trascrizionali e con quelli proteici e potrebbero permettere lo sviluppo di nuovi test anticorpali volti al rilevamento di target di marcatori proteici in campioni contaminati.

## CONCLUSIONI

### 5.0 CONCLUSIONI

Solo dieci anni fa uno studente in tesi poteva presentare un progetto volto all'identificazione di un singolo gene o al massimo a un piccolo numero di geni. Generalmente veniva individuato un gene alla volta, normalmente attraverso un'analisi Northern blot. Questa tipologia di esperimenti è praticamente scomparsa nell'era postgenomica, dove i ricercatori interrogano di routine migliaia di trascritti in un solo esperimento.

Con questo lavoro si vuole presentare, per la prima volta, i profili di espressione genica di *Mytilus galloprovincialis* a seguito di contaminazione con tossine DSP.

L'assunto di partenza è che anche il profilo di trascrizione genica può essere uno strumento integrato in grado di rilevare direttamente i meccanismi fisiologici coinvolti nelle contaminazioni di natura biotica, compresa la presenza di tossine DSP.

Questo lavoro suddiviso in 3 parti ha, dapprima sondato l'applicabilità di metodiche molecolari, quali l'impiego di un microarray e le validazioni in qRT PCR, per la rilevazione delle modifiche dei profili trascrizionali indotte dalla presenza delle biotossine DSP. Questa prima parte ha fornito una lista di geni attivati o silenziati nel corso di un esperimento durato 35 giorni in mitili mantenuti a condizioni costanti e contaminati con OA. Sebbene le condizioni di mantenimento non rappresentino le situazioni alle quali i mitili sono sottoposti in natura, ciò ha permesso un'analisi preliminare dei putativi effetti indotti dall'OA.

L'insieme dei trascritti differenzialmente espressi ha consentito di avere una panoramica di quelli che sono i pattern molecolari maggiormente influenzati dalla presenza della biotossina.

Al fine di validare i risultati ottenuti dalle ibridazioni sul MytArray 1.0 e per poter individuare putativi biomarker di OA si è proceduto a validare alcuni trascritti attraverso qRT PCR. Questa analisi ci ha consentito di osservare i livelli di espressione dei singoli trascritti selezionati e non ultimo di validare o meno i risultati ottenuti dal MytArray 1.0.

La disponibilità dei Dott Zanolin e Franceschini ha reso possibile sondare i trascritti ritenuti putativi marker di OA in campioni naturalmente contaminati. 14 trascritti sono stati analizzati nei campioni provenienti da varie zone del Golfo di Trieste. Questa seconda parte del lavoro è stata indispensabile e scientificamente necessaria per poter discriminare i trascritti differenzialmente espressi a seguito della presenza di tossine DSP o a causa del mantenimento in condizioni controllate dei mitili, nell'esperimento iniziale. L'individuazione di pattern molecolari comuni ai campioni naturalmente contaminati e raccolti in anni diversi e ai profili di espressione ottenuti dallo studio iniziale, è un punto di partenza interessante per la ricerca indirizzata all'individuazione di un set di trascritti attivati in modo specifico dalla presenza di tossine DSP e rafforza la validità dell'utilizzo di approcci molecolari negli studi di biomonitoraggio ambientale.

Non ultimo l'analisi dei trascritti proteici, seppure analizzata in modo poco approfondito, costituisce un altro aspetto importante della ricerca volta all'individuazione di trascritti attivati e specificatamente correlati alla presenza di tossine DSP.

Una difficoltà reale è stato il reperire campioni conservati correttamente a fini di studi genetici, purtroppo le metodiche molecolari di analisi del DNA e dell'RNA non sono di prassi comune per gli operatori del settore dell'analisi ambientale che tutt'ora risentono fortemente dell'utilizzo di metodiche analitiche o microbiologiche.

La sinergia dei metodi di rilevamento applicati di routine per l'accertamento della presenza di biotossine, supportato da metodiche di indagine genetica o estese al trascrittoma dell'organismo oggetto di studio, permetterebbero l'individuazione di contaminazioni a livelli sicuramente inferiori rispetto a quelli che sono i limiti di sensibilità dei test oggi applicati. L'applicazione di metodiche molecolari di questo tipo è d'uso crescente in analisi di biomonitoraggio

## CONCLUSIONI

ambientale supportando la validità e la robustezza dei risultati che questi approcci forniscono. In un lasso relativamente breve di 3 anni è stato possibile ottenere e validare un set di risultati correlati alla risposta genica del mitilo sottoposto a contaminazione con tossine DSP. Le problematiche connesse agli eventi di DSP nel nostro Golfo, legato alle pesanti perdite economiche che derivano dalle chiusure delle mitilocolture in alcuni periodi dell'anno e la mancanza di metodiche di rilevamento ad oggi completamente accettate dalla Comunità Scientifica, pongono le metodologie di analisi impiegate in questo studio, tra le più interessanti e sensibili nella rilevazione di situazione di stress ambientale.

## BIBLIOGRAFIA

### BIBLIOGRAFIA

1. Pesca, C.E. *Tecniche di acquacoltura*. 2010 21 Dicembre 2010 1 Febbraio 2011]; Available from: [http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture/aquaculture\\_methods/index\\_it.htm](http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture/aquaculture_methods/index_it.htm).
2. Hui, L., *Comportements cellulaires et régulation génétique au cours des réaction d'immunité innée chez la moule Mytilus galloprovincialis*, in *These de doctorat chez l'Université de Montpellier II*. 2008.
3. Vecchio, P.i., *Naturalis historia*. 77.
4. Gosling, E.M., *Systematic and geographic distribution of Mytilus*, in *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*, E.M. Gosling, Editor. 1992, Developments in Aquaculture and Fisheries Science. p. 1-20.
5. Ministero delle politiche agricole, a.e.f. *Pesca e Acquacoltura*. URL consultato il 19 gennaio 2011; Available from: <http://www.politicheagricole.it/default.html>.
6. Liviero Alessandra, C.A., *La produzione di mitili e vongole nelle regioni Alto Adriatiche.*, in *La Pesca in Numeri*. 2007, Osservatorio Socio Economico della Pesca dell'Alto Adriatico - Veneto Agricoltura: Chioggia (Ve).
7. Gosling, E., *The Mussel, Mytilus: Ecology, Physiology; Genetics and Culture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 1992(25): p. 589 pp.
8. Gosling, E., *Bivalve Molluscs, Biology, Ecology and Culture*. Fishing News Books. 2002: Blackwell Publishing.
9. Jorgensen, C.B., *Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics; Physiology and Ecology*. 1990, Fredensborg (Denmark): Olsen and Olsen. 140 pp.
10. Bayne, B.L., *Marine mussels their ecology and physiology*. 1976, London: Syndics of the Cambridge University Press.
11. Mengoli, A., *Aspetti morfo-funzionali dei mitili*. Laguna, 1998(4): p. 12-19.
12. Mengoli, A., *Aspetti morfo-funzionali dei mitili*, in *Laguna*. 1998. p. 12-19.
13. Riedl, R., *Fauna e Flora del Mediterraneo -dalle alghe ai mammiferi: una guida sistematica alle specie che vivono nel Mar Mediterraneo-*. 1991: Franco Murzio Editore.
14. Grégoire, C., *Structure of the conchiolin cases of the prisms in Mytilus edulis Linne*. The Journal of Cell Biology, 1961. **9**(2): p. 395-400.
15. Tamarin, A. and P.J. Keller, *An ultrastructural study of the byssal thread forming system in Mytilus*. Journal of Ultrastructure Research, 1972. **40**(3-4): p. 401-416.
16. Hagenau, A., et al., *Structural analysis of proteinaceous components in byssal threads of the mussel Mytilus galloprovincialis*. Macromolecular Bioscience, 2009. **9**(2): p. 162-168.
17. Pierce Jr, S.K., *A source of solute for volume regulation in marine mussels*. Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology, 1971. **38**(3): p. 619-635.
18. Potts, W.T.W., *Excretion in the molluscs*, in *Biological Reviews*, C.P. Society, Editor. 1966. p. 1-41.
19. McHenery, T.H.B.a.J.G., *Degradation of bacteria by Mytilus edulis*. Marine Biology, 1982. **72**(1): p. 7-15.
20. Guillaume Juhel, J.D., John O'Halloran, Sarah Culloty, Ruth Ramsay, Kevin James, Ambrose Furey, Orla Allis, *Pseudodiarrhoea in zebra mussels Dreissena polymorpha (Pallas) exposed to microcystins*. The Journal of Experimental Biology, 2006. **209**: p. 810-816.
21. Alyakrinskaya, I.O., *The Dimensions, Characteristics and Functions of the Crystalline Style of Molluscs*. Biology Bulletin, 2001. **98**(5): p. 523-535.
22. Dodgson, R.W., *Shellfish and the public health*. Public Health, 1936. **50**(C): p. 279-284.
23. Tangen, K.A.S.a.K., *Dinoflagellates*, in *Identifying Marine Phytoplankton*, C.R. Tomas, Editor. 1997, Academic Press: San Diego. p. 387-584.
24. Taylor, F.J.R., *General group characteristics, special features of interest; and a short history of dinoflagellate study*, in *The biology of dinoflagellates*, F.J.R. Taylor, Editor. 1987, Bot. Monogr. . p. 1-23.
25. Taylor, F.J.R., *Dinoflagellate morphology*, in *The biology of dinoflagellates*, F.J.R. Taylor, Editor. 1987, Bot. Monogr. p. 24-91.

## BIBLIOGRAFIA

26. Taylor, F., *Harmful dinoflagellate species in space and time and the value of morphospecies.*, in *Harmful algae*, L.J. Steidinger KA, Tomas CR et al Editor. 2004, IOC UNESCO: St. Petersburg. p. 555-559.
27. Fensome, R.A., Taylor, F. J. R., Norris, G., Sarjeant, W. A. S., Wharton, D. I. & Williams, G.L., *A classification of fossil and living dinoflagellates*. Vol. 7. 1993: Micropaleontology Press Special Publication.
28. Levandowsky, M., Kaneta, P. J., *Behaviour in dinoflagellates*, in *The biology of dinoflagellates*, F.J.R. Taylor, Editor. 1987, Blackwell Scientific: Oxford. p. 360-397.
29. Trench, R.K., *Microalgal-invertebrate symbioses: a review*. Endocytobiosis and Cell Research, 1993. **9**: p. 135-175.
30. Trench, R.K. *Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal invertebrate symbioses*. in *Proceedings of the Eighth International Coral Reef Symposium*. 1997. Balboa, Panama: Smithsonian Tropical Research Institute.
31. Marshall, A., *Calcification in hermatypic and ahermatypic corals*. Science, 1996. **271**: p. 1788-1792.
32. Trench, R.K., *Dinoflagellates in non-parasitic symbioses*, in *The biology of dinoflagellates*, R.K. Trench, Editor. 1987, Bot. Monogr. p. 530-57.
33. Stanley, G.D., Swart, P. K., *Evolution of the coral-zooxanthella symbiosis during the Triassic: a geochemical approach*. Paleobiology, 1995. **21**: p. 179-199.
34. Rizzo, P.J., *Comparative aspects of basic chromatin proteins in dinoflagellates*. BioSystems, 1981. **14**: p. 433-443.
35. Spector, D.L., *Dinoflagellate nuclei*, in *Dinoflagellates*, D.L. Spector, Editor. 1984, Academic Press, Inc.: Orlando, Florida, USA. p. 107-147.
36. Beam, J., Himes, M. , *Dinoflagellate genetics*, in *Dinoflagellates*, S.D. L., Editor. 1984, Academic Press, Inc.: Orlando, Florida, USA. p. 263-298.
37. Oakley, B., Dodge, J. D., *Kinetochores associated with the nuclear envelope in the mitosis of a dinoflagellate*. Journal of Cell Biology, 1974. **63**: p. 322-325.
38. Loeblich, A.R., *Dinoflagellate evolution: speculation and evidence*. Journal of Protozoology 1976. **23**: p. 13-28.
39. Dodge, J.D., *The Dinophyceae*, in *The chromosomes of the algae*, M.B.E. Godward, Editor. 1966, St. Martin's Press: New York, USA. p. 96-115.
40. Rae, P.M.M., *Hydroxymethyluracil in eukaryote DNA: a natural feature of the Pyrrophyta (dinoflagellates)*. Science, 1976. **194**: p. 1062-1064.
41. Rae, P.M.M., Steele, R. E., *Modified bases in the DNAs of unicellular eukaryotes and examination of distribution and possible roles, with emphasis on hydroxymethyluracil in dinoflagellates*. BioSystems, 1978. **10**: p. 37-53.
42. Lee, D.H., M. Mittag, S. Sczekan, D. Morse, And J. W. Hastings, *Molecular cloning and genomic organization of a gene for luciferin-binding protein from the dinoflagellate Gonyaulax polyedra*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**: p. 8842-8850.
43. Le, Q.H., P. Markovic, J. W. Hastings, R. V. M. Jovine, D. Morse, *Structure and organization of the peridinin-chlorophyll a-binding protein gene in Gonyaulax polyedra*. Molecular and General Genetics, 1997. **255**: p. 595-604.
44. Li, L., J. W. Hastings, *The structure and organization of the luciferase gene in the photosynthetic dinoflagellate Gonyaulax polyedra*. Plant Molecular Biology, 1998. **36**: : p. 275-284.
45. Smayda, T.J., *Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic.*, in *Toxic marine phytoplankton*, S.m.B. Grane' li E, Edler L, Anderson DM, Editor. 1990, Elsevier: New York. p. 29-40.
46. Hallegraeff, G.M., *Harmful algal blooms: a global overview*, in *Manual on Harmful Marine Microalgae*, G.M. Hallegraeff, Editor. 1995, IOC Manuals and Guides No. 33 (UNESCO). p. 1-22.
47. Shumway, S.E., *Toxic algae: a serious threat to shellfish aquaculture*. World Aquaculture, 1989. **20**: p. 65-74.
48. Hold, G.L., E. A. Smith, M. S. Rappe, E. W. Maas, E. R. B. Moore, C. Stroempl, J. R. Stephen, J. I. Prosser, T. H. Birkbeck, S. Gallacher, *Characterisation of bacterial communities associated with toxic*

## BIBLIOGRAFIA

- and non-toxic dinoflagellates: Alexandrium spp. and Scrippsiella trochoidea*. FEMS Microbiology Ecology 2001. **37**: p. 161-173.
49. Gallacher, S., K. J. Flynn, J. M. Franco, E. E. Brueggemann, H. B. Hines, , *Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with Alexandrium spp. (Dinophyta) in culture*. Applied Environmental Microbiology, 1997. **63**: p. 239-245.
50. Oshima, Y., H. Itakura, K.-C. Lee, T. Yasumoto, S. Blackburn, G. Hallegraeff, *Toxin production by the dinoflagellate Gymnodinium catenatum*, in *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, T.J.S.a.Y. Shimizu, Editor. 1993, Elsevier: New York. p. 907-912.
51. Usup, G., D. M. Kulis, D. M. Anderson, *Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate Pyrodinium bahamense var. compressum in laboratory cultures*. . Natural Toxins, 1994. **2**: p. 254-262.
52. CRL, *State of the art NRLs on marine biotoxins*. 1995, European Community Reference Laboratory on Marine Biotoxins (CRL): Vigo, Spain.
53. Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti R., Viviani, R. *Tetrahedron, Isolation of Adriatoxin a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea*. Lett., 1998. **39**: p. 8897-8900.
54. EU-NRL. *Minutes of the 4th meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins*. in *4th meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins*. 2001. Vigo, Spain.
55. EU-NRL. *Minutes of 5th meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins*. in *5th meeting of EU National Reference Laboratories (EU-NRL) on marine biotoxins*. 2002. Brussels, Belgium.
56. Van Apeldoorn, M.E., *Neurotoxic shellfish poisoning: A review*, in *Marine Biotoxins*. 2001, FAO FOOD AND NUTRITION PAPER: Rome.
57. James, K.J., Furey, A., Satake, M., Yasumoto, T., *Azaspic acid Poisoning (AZP): A new shellfish toxic syndrome in Europe*, in *Abstract for the 9th International Conference on Algal Blooms*. 2000: Tasmania, Australia.
58. Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahon, T., Yasumoto, T., *Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspic acid, a new marine toxin isolated from mussels*. Toxicon, 2002. **40**(2): p. 193-203.
59. Flanagan, A.F., Callanan, K.R., Donlon, J., Palmer, R., Forde, A., Kane, M., *A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins*. Toxicon, 2001. **39**(7): p. 1021-1027.
60. Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. *New toxic event caused by Irish mussels*. in *Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*. 1998. Vigo, Spain: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
61. Faust, M.A.G., R.A., *Contributions from the United States National Herbarium*, in *Identifying harmful marine dinoflagellates*. 2004, FAO food and nutrition paper Marine biotoxins FAO. p. 1-144.
62. Legrand, A.M. *Ciguatera toxins: origin, transfer through the food chain and toxicity to humans*. in *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae*. 1999. Vigo, Spain: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.
63. De Fouw, J.C., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., *Ciguatera fish poisoning: a review*. 1999.
64. Lehane, L., Lewis, R.J., *Review Ciguatera: recent advances but the risk remains*. Int. J. Food Microbiol. , 2000. **61**: p. 91-125.
65. Sarno, D., Dahlmann, J., *Production of domoic acid in another species of Pseudonitzschia: P. multistriata in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea)*. Harmful Algae News, 2000. **21**(5).
66. Galluzzi, L., Penna, A, Bertozzini, E, Vila, M, Garcés, E, Magnani, M, *Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of Alexandrium minutum (a dinoflagellate)*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**: p. 1199-1206.
67. Di Giuseppe, D., *Identità dei dinoflagellati proliferanti in strutture sperimentali in situ nel Lago di Tovel (Nord Italia)*. Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol., 2004. **81**(2): p. 427-438.
68. Penna, B., Battocchi, Galluzzi, Giacobbe, Vila, Garcés, Lugliè, Magnani, *Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods*. Journal Plankton Research 2006.

## BIBLIOGRAFIA

69. Van Dolah, F.M., *Diversity of Marine and Freshwater Algal Toxins*, in *Seafood Toxicology: Pharmacology, Physiology and Detection*, L. Botana, Editor. 2000, Marcel Dekker: New York. p. 19.
70. Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G., Waldock, M., *Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation*. *J. Nat. Toxins* 1993. **2**: p. 41-83.
71. Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., Poletti, R., *First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe*. *Toxicon*, 1996. **34**(8): p. 923-935.
72. Yasumoto, T., Igarashi, T., Satake, M. *Chemistry of phycotoxins-Structural elucidation*. in *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*. 2001. Guarujá (Brazil): Ponsen & Looyen.
73. Van Apeldoorn, M.E., *Diarrhoeic shellfish poisoning: A review.*, R.C.R. 05722A00., Editor. 1998.
74. Quilliam, M.A., *General Referee reports. Committee on Natural Toxins. Phycotoxins*. *J. AOAC. Int.*, 1998. **81**(1): p. 142-151.
75. James, K.J., Bishop, A.G., Healy, B.M., Roden, C., Sherlock, I.R., Twohig, M., Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L., *Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton*. *Toxicon*, 1999. **37**: p. 343-357.
76. James, K.J., Carmody, E.P., Gillman, M., Kelly, S.S., Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., *Identification of a new diarrhetic toxin in shellfish using liquid chromatography with fluorimetric and mass spectrometric detection*. *Toxicon*, 1997. **35**(6): p. 973-978.
77. Wright, J.L.C., *Dealing with seafood toxins: present approaches and future options*. *Food Research International*, 1995. **28**(4): p. 347-358.
78. EU/SANCO, *Report of the meeting of the working group on toxicology of DSP and AZP*. 2001: Brussels.
79. Suzuki, T., Ota, H., Yamasaki, *Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis**. *Toxicon*, 1999. **37**: p. 187-198.
80. Draisci, R., Giannetti, L., Lucentini, L., Marchiafava, C., James, K.J., Bishop, A., Healy, B., Kelly, S.S., *Isolation of a new okadaic acid analogue from phytoplankton implicated in diarrhetic shellfish poisoning*. *J. Chromatogr. A*, 1998. **798**: p. 137-145.
81. EFSA, E.F.S.A., *Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain*. *The EFSA Journal*, 2008. **589**: p. 1-62.
82. Nations, F.-F.a.A.O.o.t.U., *Marine Biotoxins*, in *Food and Nutrition Paper*. 2004: Rome.
83. Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., *Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tokohu*. *District. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1978. **44**(11): p. 1249-1255.
84. Welfare, J.M.o.H.a., *Method of testing for diarrhetic shellfish toxin*. *Food Sanitation Research*, 1981. **7**(31): p. 60-65.
85. FAO, I., WHO, *Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs*. 2004: Oslo, Norway.
86. Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T., Yamasaki, M., *Interference of Free Fatty Acids from the Hepatopancreas of Mussels with the Mouse Bioassay for Shellfish Toxins*. *Lipids*, 1996. **31**(6): p. 641-645.
87. Botana, L.M., Rodriguez-Vieytes, M., Alfonso, A., Louzao, M.C., *Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning*, in *Handbook of food analysis - residues and other food component analysis*, L.M.L. Nollet, Editor. 1996. p. 1147-1169.
88. Vernoux, J.P., Le Baut, C., Masselin, P., Marais, C., Baron, B., Choumiloff, R., Proniewski, F., Nizard, G., Bohec, M., *The use of *Daphnia magna* for detection of okadaic acid in mussel extracts*. *Food Add. Contam.*, 1993. **10**(5): p. 603-608.
89. Tubaro, A., et al., *A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels*. *Toxicon*, 1996. **34**(7): p. 743-752.
90. Manfrin, C., *Analisi dell'alterazione dell'espressione genica in *Mytilus galloprovincialis* indotta dalla biotossina Acido okadaico.*, in *Facoltà MM.NN.FF, Dipartimento Scienze della Vita*. 2007, Università degli Studi di Trieste: Trieste. p. 1-99.

## BIBLIOGRAFIA

91. Hamadeh, H.K., Bushel P.R., Jayadev S., Martin K., DiSorbo O., Sieber S., *Gene expression analysis reveals chemical specific profiles*. Toxicol. Sci., 2002. **67**(219-231).
92. Waring, J.F., Ciurlionis, R., Jolly, R.A., Heindel, M., Ulrich, R.G., *Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity*. Toxicol. Lett., 2001. **120**(359-368).
93. Steiner, G., Suter, L., Boess, F., Gasser, R., de Vera, M.C., Alberini, S., Ruepp, S., *Discriminating different classes of toxicants by transcript profiling*. Environ. Health Perspect., 2004. **112**: p. 1236-1248.
94. Cook, K.L., Saylery, G.S., *Environmental application of array technology: promise, problems and practicalities*. Curr. Opin. Biotechnol., 2003. **14**: p. 311-318.
95. Hyun, J.K., Ishidou, E., Kitagawa, E., Momose, Y., Iwahashi, H., *A yeast DNA microarray for the evaluation of toxicity in environmental water containing burned ash*. Environ. Monit. Ass., 2004. **92**: p. 253-272.
96. Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., *Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes*. Mol. Biol. Cell., 2001. **12**: p. 323-337.
97. Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes*. Mol. Biol. Cell., 2000. **11**: p. 4241-4257.
98. Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., *Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray*. Plant J., 2002. **31**: p. 279-292.
99. Ye, R.W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., Li, L., *Global gene expression profiles of Bacillus subtilis grown under anaerobic conditions*. J. Bacteriol., 2000. **182**: p. 4458-4465.
100. Dondero, F.D., A.; Jonsson, H.; Capri, F.; Gastaldi, L.; Viarengo, A., *Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (Mytilus edulis) using a combined biomarker/gene expression approach*. Aquat. Toxicol, 2006. **78**: p. 13-24.
101. Dondero, F.P., L.; Marsano, F.; Rebelo, M.; Vergani, L.; Venier, P.; Viarengo, A., *Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (Mytilus spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray*. Gene, 2006. **376**: p. 24-36.
102. Koonin, E.V., *Big time for small genomes*. Genome Research., 1997. **7**: p. 418-421.
103. Clayton, R.A., White, O., Ketchum, K.A., Venter, J.C., *The first genome from the third domain of life*. Nature, 1997. **387**: p. 459-462.
104. Fraser, C.M., Gocayne, White, O., Adams, M.D., *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium*. Science, 1995. **270**: p. 397-403.
105. Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merrill, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., *Complementary DNA sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genomic Project*. Science, 1991. **252**: p. 1651-1656.
106. Schena, M., et al., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science, 1995. **270**(5235): p. 467-70.
107. Gibson, G., Muse, S.V., *A primer for genome science*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, 2002. **5**: p. 123-146.
108. Schulze, A., Downward, J., *Navigating gene expression using microarrays - a technology review*. Nature Cell Biol., 2001. **3**: p. 190-195.
109. DeRisi, J.L., V.R. Iyer, and P.O. Brown, *Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale*. Science, 1997. **278**(5338): p. 680-686.
110. Southern, E.M., Maskos, U., *Parallel synthesis and analysis of large numbers of related chemical compounds: applications to oligonucleotides*. J Biotechnol., 1994. **35**: p. 217-227.
111. Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M., *Expression profiling using cDNA microarrays*. Nature Genet., 1999. **21**: p. 10-14.
112. Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., *The transcriptional program in response of human fibroblastic-serum*. Science, 1999. **203**: p. 83-87.

## BIBLIOGRAFIA

113. Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., Futcher, *Comprehensive identification of cell-cycle regulated gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *B. Mol Cel.*, 1998. **2**: p. 65-73.
114. Lettieri, T., *Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology*. *Env. Health Perspec.*, 2006. **114**: p. 4-9.
115. Xiang, C.C., Chen, Y., *cDNA microarray technology and its applications*. *Biotechnology Advances*, 2000. **18**: p. 35-46.
116. Connon, R.E., et al., *Linking molecular biomarkers with higher level condition indicators to identify effects of copper exposures on the endangered delta smelt (*Hypomesus transpacificus*)*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011. **30**(2): p. 290-300.
117. Ezendam J., S.F., Pennings J., Vandebriel R.J., Pieters R., Harleman J.H., Vos J.G., *Toxicogenomics of subchronic hexachlorobenzene exposure in Brown Norway rats*. *Environ. Health Perspect.*, 2004. **112** (7): p. 782-791.
118. Jenny, M.J., et al., *Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica**. *Mar Biotechnol (NY)*, 2002. **4**(1): p. 81-93.
119. Jenny, M.J.C., R. W.; Mancina, A.; Chen, Y. A.; McKillen, D. J.; Trent, H.; Lang, P.; Escoubas, J.; Bachere, E.; Boulo, V.; Liu, Z. J.; Gross, P. S.; Cunningham, C.; Cupit, P. M.; Tanguy, A.; Guo, X.; Moraga, D.; Boutet, I.; Huvet, A.; De Guise, S.; Almeida, J. S. W.; Warr, G. W. , *A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas**. *Mar. Biotechnol.*, 2007. **9**(577-591).
120. Ton, C., Stamatiou, D, Liew, C.C., *Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development*. *Physiol. Genomics*, 2003. **13**(2): p. 97-106.
121. Ordas, A., et al., *Deep sequencing of the innate immune transcriptomic response of zebrafish embryos to *Salmonella* infection*. *Fish Shellfish Immunol*, 2010.
122. Duan, Z.H., et al., *[Application of zebrafish microarray on the toxicity mechanism study of bisphenol A]*. *Huan Jing Ke Xue*, 2010. **31**(3): p. 808-14.
123. Popesku, J.T., et al., *Dopamine D1 receptor blockage potentiates AMPA-stimulated LH release in the goldfish*. *J Neuroendocrinol*, 2011.
124. Logan, C.A. and G.N. Somero, *Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864)*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010. **299**(3): p. R843-52.
125. Lockwood, B.L., J.G. Sanders, and G.N. Somero, *Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success*. *J Exp Biol*, 2010. **213**(Pt 20): p. 3548-58.
126. Williams, T.D., Gensberg, K., Minchin, S.D., Chipman, J.K., *A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*)*. *Aquat. Toxicol.*, 2003. **65**: p. 141-157.
127. Dondero, F., et al., *Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray*. *Gene*, 2006. **376**(1): p. 24-36.
128. Venier, P., et al., *Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution?* *Mutat Res*, 2006. **602**(1-2): p. 121-34.
129. Dov Greenbaum, C.C., Kenneth Williams, Mark Gerstein, *Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale*. *Genome Biology*, 2003. **4**(9).
130. Venier, P.D.P., C.; Pallavicini, A.; Marsano, F.; Varotto, L.; Romualdi, C.; Dondero, F.; Viarengo, A.; Lanfranchi, G. , *Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution?* *Mutat. Res.*, 2006. **602**: p. 121–134.
131. Mullis, K.B., *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. *Scientific American*, 1990. **262**(4): p. 56-65.
132. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams *Real time quantitative PCR*. *Genome Res.*, 1996. **6**: p. 986-994.
133. Chiang, P.W., W.J. Song, K.Y. Wu, J.R. Korenberg, E.J. Fogel, M.L. Van Keuren, D. Lashkari, D.M. Kurnit. , *Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance*. *Genome Res.*, 1996. **6**: p. 1013-1026.

## BIBLIOGRAFIA

134. Gibson, U.E., C.A. Heid, P.M. Williams, *A novel method for real time quantitative RTPCR*. Genome Res., 1996. **6**: p. 995-1001.
135. Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson, *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology, 1993. **11**: p. 1026-1030.
136. Zipper, H., H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzthum, *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. Nucleic Acids Res., 2004. **32**: p. e103.
137. Wang, T., M.J. Brown, *mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection*. Anal. Biochem., 1999. **269**: p. 198-201.
138. Tyagi, S., F.R. Kramer *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. Nat. Biotechnol., 1996. **14**: p. 303-308.
139. Melton, D.A., P.A. Krieg, M.R. Rebagliati, T. Maniatis, K. Zinn, M.R. Green, *Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter*. Nucleic Acids Res., 1984. **12**: p. 7035-7056.
140. Afonina, I.A., Belousov, Y.S., Metcalf, M., Mills, A., Sanders, S., Walburger, D.K., Mahoney, W., Vermeulen, N.M.J., *Single nucleotide polymorphism detection with fluorescent MGB-Eclipse probe systems*, in *A-Z of Quantitative PCR*, S.A. Bustin, Editor. 2004. p. 265–270.
141. Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S., *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence*. Nat. Biotechnol., 1999. **17**: p. 804-807.
142. Nazarenko, I., *Homogeneous detection of nucleic acids using self-quenched polymerase chain reaction primers labeled with a single fluorophore (LUX primers)*. Methods Mol. Biol., 2006. **335**: p. 95-114.
143. Larsen, R., Scherer, B., Lamarca, L., Mello, C., Chang, C., Tan, M., Farmer, A., *BD™ Knockout RNAi System and BD QZyme™ qPCR Assays – A Complete System for Generating and Identifying Gene Knockdown Models*, in *Gene Amplification and Molecular Biology Applications Groups*, Clontech, Editor. 2004, BD Biosciences Clontech. p. 1-3.
144. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
145. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic acid res., 2001. **29**(9): p. e45.
146. Gerdol, M., et al., *The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis: A widespread and diverse family of immune-related molecules*. Dev Comp Immunol, 2011.
147. Venier, P.D., C.; Bernante, F.; Varotto, L.; DeNardi, B.; Bovo, G.; Roch, P.; Novoa, B.; Figueras, A.; Pallavicini, A.; Lanfranchi, G., *MytiBase: a knowledgebase of mussel (M. galloprovincialis) transcribed sequences*. BMC Genomics, 2009. **10**(72).
148. Auriemma, R., S. Battistella, *Biochemical and histological alterations of Mytilus galloprovincialis digestive gland after exposure to okadaic acid and derivatives*. ISJ, 2004. **1**: p. 66-71.
149. Kerr, M.K.M., M.; Churchill, G. A., *Analysis of variance for gene expression microarray data*. J. Comput. Biol., 2001. **7**(6): p. 819–837.
150. Gentleman, R.C.C., V. J.; Bates, D. M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S.; Ellis, B.; Gautier, L.; Ge, Y.; Gentry, J.; Hornik, K.; Hothorn, T.; Huber, W.; Iacus, S.; Irizarry, R.; Leisch, F.; Li, C.; Maechler, M.; Rossini, A. J.; Sawitzki, G.; Smith, C.; Smyth, G.; Tierney, L.; Yang, J. Y.; Zhang, J., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol., 2004. **5**(10): p. 80.
151. Smyth, G. *The limma Package*. 2004 [cited 2009 September 9]; Available from: <http://www.pasteur-lille.fr/fr/recherche/biopuces/Genomique-Transcriptomique/Download/limma.pdf>
152. Smyth, G.K., *Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat. Appl. Genet. Molec. Biol., 2004. **3**(1).

## BIBLIOGRAFIA

153. Suzuki, T., *Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin profiles and short-term detoxification kinetics in mussels Mytilus galloprovincialis fed with the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense*. Harmful Algae, 2003. **2**(3): p. 201-206.
154. Ichimi, K., Suzuki, T., Yamasaki, M., *Non-selective retention of PSP toxins by the mussel Mytilus galloprovincialis fed with the toxic dinoflagellate Alexandrium tamarense*. Toxicon official journal of the International Society on Toxinology, 2001. **39**(12): p. 1917-1921.
155. Agatha, S., Struder-Kypke, M.C., Beran, A., *Morphologic and Genetic Variability in the Marine Planktonic Ciliate Laboea strobila Lohmann, 1908 (Ciliophora, Oligotrichia), with Notes on its Ontogenesis*. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 2004. **51**(3): p. 267-281.
156. Ruijter, J.M.R., C.; Hoogaars, W. M. H.; Karlen, Y.; Bakker, O.; van den Hoff, M. J. B.; Moorman, A. F. M., *Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*. . Nucleic Acids Res. , 2009. **37**(6): p. e45.
157. Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Renault, T., *Identification of genes from flat oyster Ostrea edulis as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR*. Fish and Shellfish Immunology, 2010. **29**(6): p. 937-945.
158. Peña, A.A., N.C. Bols, and S.H. Marshall, *An evaluation of potential reference genes for stability of expression in two salmonid cell lines after infection with either Piscirickettsia salmonis or IPNV*. BMC Research Notes, 2010. **3**.
159. McCurley, A.T. and G.V. Callard, *Characterization of housekeeping genes in zebrafish: Male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment*. BMC Molecular Biology, 2008. **9**.
160. Curtis, K.M., et al., *EF1 $\alpha$  and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells*. BMC Molecular Biology, 2010. **11**.
161. Siah, A., Dohoo, C., McKenna, P., Delaporte, M., Berthe, F. C. J., *Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, Mya arenaria*. Fish and Shellfish Immunology, 2008. **25**(3): p. 202-207.
162. Kouadjo, K.E., Nishida, Y., Cadrin-Girard, J. F., Yoshioka, M., St-Amand, J., *Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues*. BMC Genomics, 2007. **8**.
163. Silano, M., De Vincenzi, M., *Bioactive antinutritional peptides derived from cereal prolamins: a review*. Nahrung, 1999. **43**(3): p. 175-184.
164. Waddell, W.J., *A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein*. J Lab Clin Med., 1956. **48**(2): p. 311-314.
165. Dizer, H.F., B.; Harabawy, A.S.; Hennion, M.C.; Hansen, P.D., *Toxicity of domoic acid in the marine mussel Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol., 2001. **55**: p. 149-156.
166. Schmid, R.B., M.L., *annot8r: GO, EC and KEGG annotation of EST datasets*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 180-186.
167. Svensson, S.F., L., *Intracellular Effects of Okadaic Acid in the Blue Mussel Mytilus edulis, and Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss*. Mar. Environ. Res., 1998. **49**: p. 449-452.
168. Tar, K.B., A.A.; Csontos, C.; Bakò, É.; Garcia, J.G.N.; Verin, A.D., *Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodelling and barrier regulation*. J. of Cell. Bio., 2004. **92**: p. 534-546.
169. Thompson, B.E., *The main roles of c-Myc in apoptosis*. Annu. Rev. Physiol., 1998. **60**: p. 575-600.
170. Hoffman, B.L., D.A., *The proto-oncogene c-myc and apoptosis*. Oncogene, 1998. **17**: p. 3351-3357.
171. Goldbaum, O.O., M.; Handschuh, M.; Dabir, D.; Zhang, B.; Forman, M.S.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.Y.; Richter-Landsberg, C., *Proteasome Inhibition Stabilizes Tau Inclusions in Oligodendroglial Cells that Occur after Treatment with Okadaic Acid*. J. Neurosci., 2003. **23**(26): p. 8872-8880.
172. Poppek, D.K., S.; Ermak, G.; Jung, T.; Stolzing, A.; Ullrich, O.; Davies, K.J.A.; Grune, T., *Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: Influence of RCAN1 and oxidative stress*. Biochem J., 2006. **400**: p. 511-520.
173. Petrucelli, L.D., D.; Kehoe, K.; Taylor, J.; Snyder, H.; Grover, A.; De Lucia, M.; McGowan, E.; Lewis, J.; Prihar, G., *CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation*. Human Mol. Genet., 2004. **13**: p. 703-714.

## BIBLIOGRAFIA

174. Panesar, N.S.C., K.W., *Chloride efflux in unstimulated Leydig cells causes autonomous cAMP production and stimulatory/inhibitory steroidogenesis with an efflux inhibitor*. Steroids, 2005. **70**(9): p. 652-659.
175. Brown, M.D., I.M.; Moffat, C.F.; Craft, J.A., *Application of SSH and a macroarray to investigate altered gene expression in Mytilus edulis in response to exposure to benzo(a)pyrene*. Mar. Environ. Res., 2006. **62**: p. 128-135.
176. Hines, A.O., G.S.; Bignell, J.P.; Stentiford, G.D.; Viant, M.R., *Direct sampling of organisms from the field and knowledge of their phenotype: Key recommendations for environmental metabolomics*. Environ. Sci. Technol., 2007. **41**: p. 3375-3381.
177. Ioannou, S.A., A.; Poirtner, H. O.; Michaelidis, B. J., *Seasonal patterns of metabolism and the heat shock response (HSR) in farmed mussels Mytilus galloprovincialis*. . Exp. Mar. Biol. Ecol., 2009. **381**: p. 136-144.
178. Anestis, A.P.r., H. O.; Michaelidis, B., *Anaerobic metabolic patterns related to stress responses in hypoxia exposed mussels Mytilus galloprovincialis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 2010. **394**(1-2): p. 123-133.
179. Truebano, M.B., G.; Thorne, M. A. S.; Hillyard, G.; Peck, L. S.; Skibinski, D. O. F.; Clark, M. S. T., *ranscriptional response to heat stress in the Antarctic bivalve Laternula elliptica*. J. Exp.Mar. Biol. Ecol., 2010. **391**: p. 65-72.
180. Oberbeck, D.L.M., S.; Houpt, T. A., *Intra-amygdalar okadaic acid enhances conditioned taste aversion learning and CREB phosphorylation in rats*. . Brain Res., 2010. **1348**: p. 84-94.
181. Jenny, M.J.C., R. W.; Mancía, A.; Chen, Y. A.; McKillen, D. J.; Trent, H.; Lang, P.; Escoubas, J.; Bachere, E.; Boulo, V.; Liu, Z. J.; Gross, P. S.; Cunningham, C.; Cupit, P. M.; Tanguy, A.; Guo, X.; Moraga, D.; Boutet, I.; Huvet, A.; De Guise, S.; Almeida, J. S. W.; Warr, G. W., *A cDNAMicroarray for Crassostrea virginica and C. gigas*. Mar. Biotechnol., 2007. **9**: p. 577-591.
182. Fleury, E.M., J.; Boulo, V.; Daniel, J. Y.; Mazurais, D.; Hé'naut, A.; Corporeau, C.; Boudry, P.; Favrel, P.; Huvet, A., *Microarraybased identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality*. Mar. Biotechnol., 2010. **12**(3): p. 326-339.
183. Manfrin, C., Dreos, Renè, Battistella, Silvia, Beran, Alfred, Gerdol, Marco, Varotto, Laura, Lanfranchi, Gerolamo, Venier, Paola, Pallavicini, Alberto, *Mediterranean Mussel Gene Expression Profile Induced by Okadaic Acid Exposure*. Environmental Science and Technology, 2010. **44**(21): p. 8276-8283.
184. Manfrin, C., Gerdol, M., Zanolin, B., Franceschini, F., De Moro, G., Venier, P., Pallavicini, A., *Gene expression analysis of Mediterranean mussel (Mytilus galloprovincialis L.) from diarrheic shellfish poisoning (DSP) outbreaks*. Aquatic Toxicology, 2011. **under submission**.
185. Yang, Z., Wu, H., Li, Y., *Toxic effect on tissues and differentially expressed genes in hepatopancreas identified by suppression subtractive hybridization of freshwater pearl mussel (Hyriopsis cumingii) following microcystin-LR challenge*. Environmental toxicology, 2010.
186. Araki, T., *Purification and characterization of an endo-β-mannanase from Aeromonas sp. F-25*. J. Fac. Agr. Kyushu Univ, 1983. **27**: p. 89-98.
187. Talbot, G., Sygusch, J., *Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from Bacillus stearothermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 1990. **56**: p. 3505-3510.
188. Li, W., Dong, Z., Cui, F., *Purification and characterization of an endo-beta-1,4-mannanase from Bacillus subtilis BM9602*. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2000. **40**: p. 420-424.
189. Li, Y.N., Meng, K., Wang, Y.R., Yao, B., *A beta-mannanase from Bacillus subtilis B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in Escherichia coli*. Z Naturforsch C. , 2006. **61**: p. 840-846.
190. Johnson, K.G., Ross, N.W., *Enzymatic properties of β-mannanase from Polyporus versicolor*. Enzyme Microb. Technol., 1990. **12**: p. 960-964.



Grazie

A dimostrazione del mio impegno, della mia dedizione alla ricerca e alla biologia e a ricordo che una fatica tenace supera tutte le difficoltà.

Grazie ai miei genitori che mi sostengono e mi insegnano a dare valore alle cose importanti della vita.

Grazie ad Alberto che mi ha dato la possibilità di vivere tre anni nella ricerca, grazie a Marco che mi ha sempre stimolata a non impigrire la mente e che ha sopportato stoicamente i miei cedimenti. Grazie ad Elisa, Martina, Monica e a Gianluca, che in modi diversi tra loro, mi hanno dato rapporti di qualità, di amicizia e momenti di confronto.

Grazie a tutti gli altri membri del Lab perché hanno contribuito a creare un'atmosfera piacevole e costruttiva.

Per tutto il resto, per le cose davvero importanti, grazie a Luca, ad Anna, a Marianne, a Sara, ai miei fratelli, a Giovi e Linda e a tutti i miei amici.

## Mediterranean Mussel Gene Expression Profile Induced by Okadaic Acid Exposure

CHIARA MANFRIN, RENE' DREOS,<sup>†</sup>  
SILVIA BATTISTELLA, ALFRED BERAN,<sup>‡</sup>  
MARCO GERDOL, LAURA VAROTTO,<sup>‡</sup>  
GEROLAMO LANFRANCHI,<sup>§</sup>  
PAOLA VENIER,<sup>¶</sup> AND  
ALBERTO PALLAVICINI\*

Department of Life Sciences, Università di Trieste,  
P.le Valmaura, 9, Trieste, Italy 34148

Received November 19, 2009. Revised manuscript received  
September 15, 2010. Accepted September 15, 2010.

Seasonal seawater temperature increases define optimal growth conditions for Dinoflagellate species which can reach high concentrations in water column and also in filter-feeding organisms like *Mytilus galloprovincialis*. Commonly produced by *Dinophysis* and *Prorocentrum* spp., okadaic acid (OA) and its analogues are responsible for the Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP) syndrome in humans. Closure of shellfishing grounds is therefore recommended by the EU when DSP toxin levels in shellfish exceed 16 µg OA 100 g<sup>-1</sup> flesh. Despite not being responsible for casualties either in humans or mussels, DSP outbreaks are considered natural events causing health and economic issues due to the frequency of their occurrence. Since gene expression studies offer a wide range of different solutions, we used a mussel cDNA microarray to evaluate gene expression changes in the digestive gland of mussels fed for five weeks with OA-contaminated nutrient. Among the differentially expressed genes we observed a general up-regulation of transcripts coding for stress proteins, proteins involved in cellular synthesis, and a few not annotated proteins. Overall, at the first time point analyzed we identified 58 candidate transcripts for OA-induced stress in mussels, half of which have unknown function. In this paper we present the first gene expression analysis performed on Mediterranean mussels exposed to okadaic acid. The characterization of these transcripts could be useful for the identification of an early physiological response to OA exposure.

### Introduction

The *Diarrheic Shellfish Poisoning* (DSP) syndrome is a serious health issue caused in humans by the ingestion of molluscs contaminated with lipophilic toxins such as okadaic acid (OA) and the structurally related dinophysitoxins 1, 2, and

3 (DTX-1, -2, -3). OA production is commonly associated with *Dinophysis* and *Prorocentrum* spp. During *Dinophysis* spp. blooms, usually characterized by population densities of <10<sup>4</sup> cells L<sup>-1</sup>, and abundance <10<sup>3</sup> cells L<sup>-1</sup>, the typical filter-feeding behavior of mussels causes their toxification. The "toxic season" usually occurs in summer (June to September), and the breeders adapt their marketing strategies to face it. In 1994, in Scotland, toxicity caused by DTX-2 persisted until February even though toxic *Dinophysis* species had not been recorded since September. When DSP toxin (DST) levels in shellfish exceed 16 µg OA 100 g<sup>-1</sup> mussel meat, closure of shellfishing grounds is recommended by the EU (1, 2). However, vectoring of DSTs through the food chain and their effect on marine organisms are poorly understood (3, 4). McMahon et al. (5) suggest the pairing of bioassays and chemical tests for the confirmation of the toxin presence in the monitoring of *Dinophysis* spp.

Okadaic acid is known to inhibit the phosphatase activity of protein serine/threonine phosphatases in mammals, yeasts, and higher plants; hence, it blocks the dephosphorylation of proteins that serve as substrates for several protein kinases with consequences on many basic processes ranging from cytoskeleton dynamics and cell adhesion to cell-cycle control, and the overall regulation of gene expression, even in *M. edulis* (4, 6, 7). On the other hand, the glycogen synthase is not affected by the OA levels that naturally occur in blue mussels *in vivo*. Although little is known about the direct effects of OA on mussel physiology, it is likely that some molecular pathways are affected by the presence of the toxin and involved in its metabolism. Suggestive of protective mechanisms against the harmful effects of OA, digestive cells of molluscan hepatopancreas are particularly rich in lysosomes (8), which can accumulate and seize foreign compounds such as lipophilic xenobiotics by increasing autophagic activity (9). However, the DSP toxins are accumulated mainly in the digestive gland of bivalves where their transformation of the ingested DSP toxins, for example from DTX-1 to DTX-3, might also occur (3). For the reasons mentioned above the digestive gland represents the optimal target tissue to analyze possible changes at a molecular level induced by the presence of biotoxins, such as okadaic acid.

The detection of biomarkers sensitive to stress at a molecular and a cellular level represents an integrated tool able to contribute in determining the toxicity of pollutants, assuming that their activation should give early warning signals of toxic chemical effects on the animals (10, 11). Microarray platforms and experimental functional genomics tools could greatly enhance the molecular understanding of toxicity mechanisms in sentinel organisms. In 1999, Nuwaysir et al. (12) described how microarray technologies could transform toxicology, leading to the creation of a new scientific field called toxicogenomics (13); subsequently, gene expression profiling has been used to identify and confirm mechanisms of action of different toxicants (14, 15), discerning the effects of chemical mixtures and identifying novel biomarkers of exposure. In the past few years, we have supported the development of mussel functional genomics through the production of ESTs and DNA microarrays (16, 17). Using MytArray 1.0, the first mussel cDNA microarray resulting from nonredundant ESTs, we analyzed the transcriptional signatures of Mediterranean mussels exposed to OA toxin in the laboratory. Following the preparation of new cDNA libraries, 7112 unique expressed sequences from about 25,000 ESTs have been organized in MytiBase, the first EST's catalogue of *M. galloprovincialis*, annotated and publicly available (17).

\* Corresponding author phone: +39040812237; e-mail: pallavic@units.it.

<sup>†</sup> Current address: John Innes Centre Norwich Research Park, Colney, Norwich, UK NR47UH.

<sup>‡</sup> Current address: Biological Oceanography, National Institute of Oceanography and Experimental Geophysics - OGS, Via A. Piccard 54, Trieste, IT 34010.

<sup>§</sup> Current address: Department of Biology, University of Padova, Via U. Bassi 58/B, Padova, IT 35121.

<sup>¶</sup> Current address: CRIBI Biotechnology Centre, University of Padova, Via U. Bassi 58/B, Padova, IT 35121.

\*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

**The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: a widespread and diverse family of immune-related molecules**

Marco Gerdol<sup>a</sup>, Chiara Manfrin<sup>a</sup>, Gianluca De Moro<sup>a</sup>, Antonio Figueras<sup>b</sup>, Beatriz Novoa<sup>b</sup>, Paola Venier<sup>c</sup> and Alberto Pallavicini<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Life Sciences, University of Trieste, Trieste, Italy

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain

<sup>c</sup> Department of Biology, CRIBI Biotechnology Center, University of Padova, Padova, Italy

**Corresponding authors:** Paola Venier, Tel +39 0498276284, Fax +39 0498276280, [paola.venier@unipd.it](mailto:paola.venier@unipd.it) and Alberto Pallavicini, Tel. +39 040812237, Fax +39 040810860, [pallavic@units.it](mailto:pallavic@units.it)

**ABSTRACT**

The key component of the classical complement pathway C1q is regarded as a major connecting link between innate and acquired immunity due to the highly adaptive binding properties of its trimeric globular domain gC1q. The gC1q domain also characterizes many non-complement proteins involved in a broad range of biological processes including apoptosis, inflammation, cell adhesion and cell differentiation. In molluscs and many other invertebrates lacking of adaptive immunity, C1q domain containing (C1qDC) proteins are abundant, they most probably emerged as lectins and subsequently evolved in a specialized class of pattern recognition molecules through the expanding interaction properties of gC1q.

Here we report the identification of 168 C1qDC transcript sequences of *Mytilus galloprovincialis*. The remarkable abundance of C1qDC transcripts in the Mediterranean mussel suggests an evolutionary strategy of gene duplication, functional diversification and selection of many specific C1qDC variants.

A comprehensive transcript sequence survey in Protostomia also revealed that the C1qDC family expansion observed in mussel could have occurred in some specific taxa independently from the events leading to the establishment of a large complement of C1qDC genes in the Chordates lineage.

**Keywords:** *M. galloprovincialis*; C1qDC proteins; Genomics and transcriptomics analysis; Bacterial infection; Invertebrate immunity

**Abbreviations:** C1qDC, C1q domain containing; PRPs, pattern recognition proteins; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; ghC1q, globular head C1q; sghC1q, secreted globular head C1q.

## Manuscript

[Click here to view linked References](#)

### **Gene expression analysis of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) from diarrheic shellfish poisoning (DSP) outbreaks.**

Manfrin Chiara<sup>1</sup>, Gerdol Marco<sup>1</sup>, Zanolin Bruno<sup>2</sup>, Franceschini Fabio<sup>2</sup>, De Moro Gianluca<sup>1</sup>, Venier Paola<sup>3</sup>, and Pallavicini Alberto<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Via Giorgieri, 5, Trieste, 34127, IT.

<sup>2</sup> Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente del Friuli Venezia Giulia (ARPA-FVG), Dipartimento Provinciale di Gorizia, Sezione Biotossine, Via III Armata, 69, Gorizia, 34170, IT.

<sup>3</sup> Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via U. Bassi 58/B, Padova, 35121, IT.

#### **Abstract**

Based on cDNA microarray analysis of digestive gland samples, we have recently reported the gene expression profiles of Mediterranean mussels experimentally exposed to the okadaic acid (OA). Complementary to the previous data, we now present the gene expression changes detected in mussels naturally contaminated with the biotoxin, collected from different sites in the Gulf of Trieste during two diarrheic shellfish poisoning outbreaks. The genes found up-regulated in the DNA microarray analysis were validated by quantitative real time-PCR. The resulting data support and confirm the gene expression trends previously described in experimentally contaminated mussels, and additionally support the microarray-based identification of molecular markers for OA contamination. In fact, gene expression changes rapidly adjusting the biochemical cell machinery to react against stress factors, such as biotoxin accumulation in mussels, and the gene transcripts significantly modulated in response to OA represent good candidate molecules for the development of effective and practical diagnostic methods for the sanitary control of marketable mussel stocks.

**Keywords:** Okadaic acid; DSP outbreak; Mediterranean mussel; Gene expression analysis; qRT-PCR.

\* Corresponding author phone +39 040 812237, email: [pallavic@units.it](mailto:pallavic@units.it)

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

TABELLA S1: EST differenzialmente espresse a 3, 7, 21 e 35 giorni dall'inizio del trattamento (sono riportate sequenzialmente), a: coordinate degli spot sul MytArray 1.0, b: identificativo del trascritto su MytArray 1.0, c: identificativo nel MytiBase, d: identificativo del cluster nel MytiBase, e: Log Fold change, f: media dell'espressione, g: t-value, h: p-value, i: p-value aggiustato con False discovery rate per l'analisi statistica, l: background.

## Transcripts differentially expressed after 3<sup>rd</sup> day of treatment

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
16	3	10	Myt01-007F07	Mg_MxT03_05C20	MGC00081	4,67E+00	1,05E+01	8,78E+00	4,33E-07	2,04E-04	6,79E+00
16	3	3	Myt01-007F07	Mg_MxT03_05C20	MGC00081	4,43E+00	1,04E+01	1,28E+01	9,24E-09	1,95E-05	1,03E+01
4	15	1	Myt01-004F08	Mg_MxT02_01P17	MGC01690	3,18E+00	1,13E+01	6,39E+00	1,18E-05	9,09E-04	3,55E+00
7	15	3	Myt01-009F02	Mg_MxT03_08M12	MGC01663	2,60E+00	1,28E+01	6,35E+00	1,27E-05	9,09E-04	3,48E+00
7	3	12	Myt01-013F02	Mg_MxT03_13C04	MGC02764	2,51E+00	1,12E+01	6,11E+00	1,95E-05	1,11E-03	3,05E+00
3	15	10	Myt01-010F02	Mg_MxT03_09O17	MGC02335	2,47E+00	1,16E+01	6,97E+00	4,36E-06	5,38E-04	4,52E+00
3	15	3	Myt01-010F02	Mg_MxT03_09O17	MGC02335	2,40E+00	1,15E+01	6,55E+00	9,00E-06	8,02E-04	3,81E+00
7	3	5	Myt01-013F02	Mg_MxT03_13C04	MGC02764	2,35E+00	1,11E+01	6,59E+00	8,34E-06	7,77E-04	3,89E+00
7	15	10	Myt01-009F02	Mg_MxT03_08M12	MGC01663	2,25E+00	1,27E+01	4,87E+00	2,01E-04	5,44E-03	7,57E-01
13	7	5	Myt01-013E03	Mg_MxT03_13A08	MGC02749	2,06E+00	1,10E+01	7,25E+00	4,08E-06	5,38E-04	4,63E+00
13	9	12	Myt01-013A05	Mg_MxT03_12I07	MGC02685	2,05E+00	1,08E+01	4,64E+00	4,51E-04	9,24E-03	3,92E-02
15	1	1	Myt01-001B01	Mg_MxT01_04C05	MGC01337	1,74E+00	1,09E+01	4,64E+00	3,18E-04	7,40E-03	3,03E-01
14	14	12	Myt01-015C07	Mg_MxT03_14O06	no cluster	1,71E+00	1,34E+01	5,20E+00	1,06E-04	3,45E-03	1,38E+00
6	6	6	Myt01-015G12	Mg_MxT03_15M24	MGC02989	1,67E+00	1,16E+01	8,23E+00	9,41E-07	2,72E-04	6,05E+00
13	7	12	Myt01-013E03	Mg_MxT03_13A08	MGC02749	1,67E+00	1,11E+01	7,52E+00	1,76E-06	3,40E-04	5,40E+00
13	13	10	Myt01-009A01	Mg_MxT03_07E12	MGC02118	1,66E+00	1,29E+01	4,92E+00	1,82E-04	5,03E-03	8,56E-01
6	6	13	Myt01-015G12	Mg_MxT03_15M24	MGC02989	1,65E+00	1,17E+01	6,25E+00	2,08E-05	1,13E-03	3,03E+00
5	12	7	Myt01-017G12	Mg_MxT03_19E09	MGC03302	1,64E+00	1,00E+01	5,27E+00	9,18E-05	3,13E-03	1,53E+00
5	12	14	Myt01-017G12	Mg_MxT03_19E09	MGC03302	1,61E+00	1,01E+01	9,03E+00	1,80E-07	1,56E-04	7,59E+00
14	14	5	Myt01-015C07	Mg_MxT03_14O06	no cluster	1,60E+00	1,37E+01	5,03E+00	1,46E-04	4,40E-03	1,07E+00
11	8	3	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	1,59E+00	1,27E+01	8,72E+00	4,70E-07	2,04E-04	6,71E+00
15	1	8	Myt01-001B01	Mg_MxT01_04C05	MGC01337	1,55E+00	1,09E+01	4,52E+00	4,01E-04	8,51E-03	7,55E-02
7	16	2	Myt01-005D06	Mg_MxT02_03G12	MGC01684	1,55E+00	1,12E+01	6,58E+00	8,50E-06	7,77E-04	3,87E+00
11	8	10	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	1,53E+00	1,28E+01	7,77E+00	2,95E-06	5,13E-04	4,98E+00
14	2	12	Myt01-015C01	Mg_MxT03_14M20	MGC02987	1,49E+00	1,36E+01	4,74E+00	2,58E-04	6,51E-03	5,08E-01
14	8	5	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	1,49E+00	1,18E+01	6,72E+00	9,52E-06	8,27E-04	3,80E+00
1	13	12	Myt01-014A08	Mg_MxT03_13J10	MGC02822	1,46E+00	1,26E+01	5,65E+00	4,53E-05	1,85E-03	2,22E+00
3	12	12	Myt01-014H06	Mg_MxT03_14H02	MGC02938	1,45E+00	1,19E+01	5,86E+00	3,08E-05	1,49E-03	2,60E+00
14	8	12	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	1,43E+00	1,16E+01	5,35E+00	1,01E-04	3,35E-03	1,48E+00
9	8	5	Myt01-014G03	Mg_MxT03_14E20	MGC02918	1,43E+00	1,23E+01	5,13E+00	1,51E-04	4,40E-03	1,09E+00
1	13	5	Myt01-014A08	Mg_MxT03_13J10	MGC02822	1,41E+00	1,27E+01	6,36E+00	1,25E-05	9,09E-04	3,49E+00
16	1	12	Myt01-015B01	Mg_MxT03_14L01	MGC01913	1,38E+00	1,38E+01	4,64E+00	3,15E-04	7,40E-03	3,12E-01

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
9	8	12	Myt01-014G03	Mg_MxT03_14E20	MGC02918	1,36E+00	1,23E+01	6,41E+00	1,14E-05	8,98E-04	3,58E+00
13	10	2	Myt01-005G01	Mg_MxT03_01E02	no cluster	1,34E+00	9,69E+00	4,47E+00	5,17E-04	1,00E-02	-1,24E-01
14	2	5	Myt01-015C01	Mg_MxT03_14M20	MGC02987	1,34E+00	1,37E+01	4,69E+00	2,88E-04	6,99E-03	4,02E-01
16	18	11	Myt01-011H11	Mg_MxT03_11G16	MGC02526	1,29E+00	1,24E+01	6,30E+00	1,39E-05	9,09E-04	3,39E+00
16	2	12	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	1,29E+00	1,34E+01	7,87E+00	1,02E-06	2,73E-04	5,93E+00
11	7	13	Myt01-018B01	Mg_MxT03_20A06	MGC03358	1,28E+00	9,84E+00	7,14E+00	4,84E-06	5,38E-04	4,46E+00
3	16	2	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	1,26E+00	1,17E+01	5,29E+00	1,42E-04	4,33E-03	1,19E+00
13	3	13	Myt01-013A11	Mg_MxT03_12J03	MGC02692	1,25E+00	1,07E+01	5,34E+00	8,10E-05	2,87E-03	1,65E+00
14	17	11	Myt01-011E11	Mg_MxT03_11B03	MGC00081	1,22E+00	9,54E+00	5,72E+00	3,95E-05	1,72E-03	2,36E+00
4	16	9	Myt01-008D06	Mg_MxT03_06F21	MGC02042	1,22E+00	1,19E+01	4,81E+00	3,36E-04	7,68E-03	3,46E-01
3	2	10	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	1,22E+00	1,31E+01	5,78E+00	3,55E-05	1,62E-03	2,47E+00
7	5	11	Myt01-009F06	Mg_MxT03_08O07	MGC01653	1,20E+00	1,22E+01	6,28E+00	1,97E-05	1,11E-03	3,09E+00
7	5	4	Myt01-009F06	Mg_MxT03_08O07	MGC01653	1,19E+00	1,23E+01	5,91E+00	2,79E-05	1,42E-03	2,70E+00
1	4	11	Myt01-010C06	Mg_MxT03_09J23	MGC02286	1,18E+00	1,29E+01	5,33E+00	8,27E-05	2,90E-03	1,63E+00
1	4	4	Myt01-010C06	Mg_MxT03_09J23	MGC02286	1,18E+00	1,28E+01	5,67E+00	4,37E-05	1,83E-03	2,26E+00
2	2	1	Myt01-004C02	Mg_MxT02_01A16	no cluster	1,17E+00	1,08E+01	4,41E+00	4,95E-04	9,78E-03	-1,32E-01
3	12	5	Myt01-014H06	Mg_MxT03_14H02	MGC02938	1,15E+00	1,17E+01	6,76E+00	6,23E-06	6,37E-04	4,17E+00
16	2	5	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	1,14E+00	1,37E+01	6,59E+00	8,28E-06	7,77E-04	3,89E+00
13	4	5	Myt01-013G01	Mg_MxT03_13D19	no cluster	1,12E+00	1,34E+01	4,60E+00	4,92E-04	9,76E-03	-3,34E-02
1	1	12	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	1,11E+00	1,11E+01	5,51E+00	5,86E-05	2,21E-03	1,97E+00
4	16	2	Myt01-008D06	Mg_MxT03_06F21	MGC02042	1,10E+00	1,17E+01	5,43E+00	6,80E-05	2,44E-03	1,82E+00
16	18	4	Myt01-011H11	Mg_MxT03_11G16	MGC02526	1,09E+00	1,26E+01	4,92E+00	2,20E-04	5,68E-03	7,06E-01
2	15	4	Myt01-012A12	Mg_MxT03_11J04	MGC02546	1,08E+00	1,04E+01	5,20E+00	1,32E-04	4,08E-03	1,22E+00
11	1	5	Myt01-014B01	Mg_MxT03_13J22	MGC02827	1,08E+00	1,20E+01	5,60E+00	4,97E-05	1,96E-03	2,13E+00
3	16	9	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	1,07E+00	1,20E+01	5,05E+00	2,18E-04	5,68E-03	7,71E-01
3	2	3	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	1,05E+00	1,29E+01	5,12E+00	1,23E-04	3,86E-03	1,24E+00
8	11	4	Myt01-011B10	Mg_MxT03_10J10	MGC02427	1,03E+00	1,34E+01	4,53E+00	4,67E-04	9,38E-03	-3,66E-02
1	1	5	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	-9,92E-01	1,12E+01	6,76E+00	6,20E-06	6,37E-04	4,18E+00
8	17	5	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	-9,73E-01	1,20E+01	5,27E+00	1,49E-04	4,40E-03	1,15E+00
4	7	4	Myt01-012B08	Mg_MxT03_11K12	MGC02496	-9,52E-01	1,31E+01	5,97E+00	2,53E-05	1,35E-03	2,80E+00
11	7	6	Myt01-018B01	Mg_MxT03_20A06	MGC03358	-9,46E-01	9,87E+00	4,86E+00	2,04E-04	5,44E-03	7,43E-01
15	8	5	Myt01-013H03	Mg_MxT03_13G21	MGC02803	-9,20E-01	9,27E+00	4,75E+00	3,04E-04	7,28E-03	3,93E-01
8	11	11	Myt01-011B10	Mg_MxT03_10J10	MGC02427	-9,16E-01	1,33E+01	4,88E+00	2,39E-04	6,10E-03	6,26E-01
7	1	1	Myt01-001B02	Mg_MxT01_04D10	MGC01342	-9,12E-01	1,04E+01	4,51E+00	4,08E-04	8,60E-03	5,73E-02
8	17	12	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	-8,88E-01	1,20E+01	4,66E+00	4,35E-04	8,99E-03	8,85E-02
5	8	5	Myt01-013G04	Mg_MxT03_13E13	MGC02675	-8,84E-01	9,92E+00	4,52E+00	4,02E-04	8,51E-03	7,30E-02
5	17	13	Myt01-017E06	Mg_MxT03_18C02	MGC10025	-8,74E-01	1,36E+01	5,66E+00	4,46E-05	1,85E-03	2,24E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>j</sup>
2	15	11	Myt01-012A12	Mg_MxT03_11J04	MGC02546	-8,71E-01	1,04E+01	4,42E+00	4,91E-04	9,76E-03	-1,25E-01
11	3	3	Myt01-006F07	Mg_MxT03_03F13	MGC01822	-8,66E-01	1,30E+01	5,22E+00	1,03E-04	3,37E-03	1,42E+00
4	7	11	Myt01-012B08	Mg_MxT03_11K12	MGC02496	-8,63E-01	1,33E+01	5,31E+00	8,62E-05	2,98E-03	1,59E+00
5	17	10	Myt01-009A04	Mg_MxT03_07F11	MGC01578	-8,42E-01	1,19E+01	4,92E+00	1,81E-04	5,03E-03	8,57E-01
11	3	10	Myt01-006F07	Mg_MxT03_03F13	MGC01822	-8,41E-01	1,32E+01	4,48E+00	5,12E-04	1,00E-02	-1,27E-01
5	17	6	Myt01-017E06	Mg_MxT03_18C02	MGC10025	-8,31E-01	1,36E+01	5,16E+00	1,14E-04	3,61E-03	1,31E+00
10	10	4	Myt01-012G07	Mg_MxT03_12F02	MGC02656	-7,82E-01	1,28E+01	5,62E+00	4,77E-05	1,91E-03	2,17E+00
1	8	6	Myt01-018C02	Mg_MxT03_20B22	MGC03228	-7,58E-01	1,34E+01	4,83E+00	2,17E-04	5,68E-03	6,81E-01
10	10	11	Myt01-012G07	Mg_MxT03_12F02	MGC02656	-7,31E-01	1,28E+01	4,59E+00	3,48E-04	7,80E-03	2,15E-01
1	13	8	Myt01-002A08	Mg_MxT01_06D09	MGC01436	7,01E-01	9,72E+00	4,48E+00	4,31E-04	8,98E-03	3,02E-03
15	14	6	Myt01-017H03	Mg_MxT03_19F16	no cluster	7,01E-01	1,28E+01	4,52E+00	3,97E-04	8,51E-03	8,38E-02
10	9	4	Myt01-012E07	Mg_MxT03_12B06	MGC02624	7,08E-01	9,60E+00	4,54E+00	4,54E-04	9,24E-03	3,53E-03
7	16	10	Myt01-009H02	Mg_MxT03_09C20	MGC02229	7,10E-01	1,12E+01	4,65E+00	3,12E-04	7,40E-03	3,21E-01
15	18	6	Myt01-017H05	Mg_MxT03_19G17	MGC03253	7,53E-01	1,10E+01	4,71E+00	2,74E-04	6,75E-03	4,51E-01
11	9	10	Myt01-006B11	Mg_MxT03_01N04	MGC00665	7,62E-01	1,37E+01	5,05E+00	1,42E-04	4,33E-03	1,10E+00
12	7	4	Myt01-012B07	Mg_MxT03_11K10	MGC02558	7,91E-01	1,16E+01	4,76E+00	2,99E-04	7,21E-03	4,05E-01
7	16	3	Myt01-009H02	Mg_MxT03_09C20	MGC02229	8,27E-01	1,12E+01	4,56E+00	3,74E-04	8,21E-03	1,44E-01
7	4	7	Myt01-017H08	Mg_MxT03_19H17	MGC02558	8,35E-01	1,12E+01	5,55E+00	5,47E-05	2,14E-03	2,04E+00
10	17	9	Myt01-008E05	Mg_MxT03_06J08	MGC02065	8,45E-01	1,29E+01	4,46E+00	4,56E-04	9,24E-03	-5,13E-02
11	9	3	Myt01-006B11	Mg_MxT03_01N04	MGC00665	8,62E-01	1,37E+01	5,62E+00	4,78E-05	1,91E-03	2,17E+00
11	3	13	Myt01-014B11	Mg_MxT03_13L17	MGC01310	8,67E-01	1,24E+01	4,88E+00	1,96E-04	5,37E-03	7,80E-01
11	3	6	Myt01-014B11	Mg_MxT03_13L17	MGC01310	8,75E-01	1,24E+01	4,55E+00	3,79E-04	8,23E-03	1,31E-01
10	2	10	Myt01-008C07	Mg_MxT03_06D16	MGC01455	8,95E-01	1,28E+01	4,82E+00	2,21E-04	5,68E-03	6,63E-01
7	5	7	Myt01-017B10	Mg_MxT03_17K24	MGC00464	8,97E-01	1,43E+01	5,00E+00	1,56E-04	4,47E-03	1,01E+00
15	7	4	Myt01-009B07	Mg_MxT03_07M07	MGC00038	9,12E-01	1,37E+01	5,53E+00	5,65E-05	2,16E-03	2,01E+00
7	5	14	Myt01-017B10	Mg_MxT03_17K24	MGC00464	9,13E-01	1,42E+01	5,49E+00	6,15E-05	2,25E-03	1,92E+00
2	14	4	Myt01-012G10	Mg_MxT03_12F12	MGC02661	9,15E-01	1,12E+01	4,93E+00	1,78E-04	5,03E-03	8,74E-01
15	7	11	Myt01-009B07	Mg_MxT03_07M07	MGC00038	9,22E-01	1,36E+01	6,31E+00	1,37E-05	9,09E-04	3,40E+00
11	6	9	Myt01-002H11	Mg_MxT01_08D06	MGC01523	9,25E-01	1,20E+01	6,49E+00	9,84E-06	8,34E-04	3,73E+00
7	4	14	Myt01-017H08	Mg_MxT03_19H17	MGC02558	9,32E-01	1,12E+01	4,57E+00	3,65E-04	8,08E-03	1,67E-01
14	18	5	Myt01-015C09	Mg_MxT03_14O12	MGC03002	9,33E-01	1,15E+01	4,73E+00	3,20E-04	7,40E-03	3,57E-01
9	5	3	Myt01-006A09	Mg_MxT03_01K03	MGC01789	9,38E-01	1,05E+01	5,02E+00	1,82E-04	5,03E-03	8,95E-01
16	4	12	Myt01-015H01	Mg_MxT03_15N23	MGC02998	9,48E-01	1,33E+01	5,30E+00	8,66E-05	2,98E-03	1,59E+00
9	8	14	Myt01-018G09	Mg_MxT03_20M20	MGC03464	9,53E-01	1,04E+01	5,35E+00	1,00E-04	3,35E-03	1,48E+00
1	8	3	Myt01-006G10	Mg_MxT03_03J17	MGC10001	9,56E-01	1,36E+01	5,76E+00	3,69E-05	1,65E-03	2,43E+00
12	10	2	Myt01-008H01	Mg_MxT03_07A06	MGC02106	9,58E-01	1,35E+01	6,04E+00	2,96E-05	1,47E-03	2,69E+00
5	10	4	Myt01-009G08	Mg_MxT03_09C01	MGC02223	9,63E-01	9,40E+00	5,09E+00	2,02E-04	5,44E-03	8,38E-01

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
4	10	4	Myt01-012H08	Mg_MxT03_12G21	MGC02672	9,78E-01	1,21E+01	4,94E+00	2,13E-04	5,65E-03	7,39E-01
11	14	11	Myt01-010H09	Mg_MxT03_10E22	MGC02386	9,90E-01	1,09E+01	5,24E+00	9,87E-05	3,33E-03	1,46E+00
12	12	8	Myt01-004H05	Mg_MxT02_02G17	MGC01710	1,03E+00	1,43E+01	4,84E+00	2,57E-04	6,51E-03	5,72E-01
1	8	10	Myt01-006G10	Mg_MxT03_03J17	MGC10001	1,05E+00	1,37E+01	5,87E+00	3,03E-05	1,48E-03	2,62E+00
12	17	11	Myt01-012F11	Mg_MxT03_12E01	MGC01731	1,05E+00	1,20E+01	5,13E+00	1,50E-04	4,40E-03	1,10E+00
13	14	4	Myt01-009G09	Mg_MxT03_09C03	MGC02225	1,05E+00	9,27E+00	4,81E+00	2,74E-04	6,75E-03	4,92E-01
3	12	13	Myt01-018D04	Mg_MxT03_20E02	MGC03388	1,06E+00	9,87E+00	4,68E+00	3,50E-04	7,81E-03	2,47E-01
14	1	4	Myt01-011E03	Mg_MxT03_10P16	MGC02470	1,09E+00	1,04E+01	5,02E+00	1,51E-04	4,40E-03	1,04E+00
16	14	2	Myt01-007H03	Mg_MxT03_05J16	MGC01960	1,10E+00	1,06E+01	4,95E+00	3,30E-04	7,60E-03	4,13E-01
2	12	4	Myt01-012C10	Mg_MxT03_11N12	MGC02591	1,11E+00	9,20E+00	6,18E+00	3,22E-05	1,53E-03	2,66E+00
4	10	11	Myt01-012H08	Mg_MxT03_12G21	MGC02672	1,11E+00	1,22E+01	5,11E+00	1,55E-04	4,47E-03	1,05E+00
2	14	11	Myt01-012G10	Mg_MxT03_12F12	MGC02661	1,12E+00	1,12E+01	4,63E+00	3,19E-04	7,40E-03	2,99E-01
16	4	5	Myt01-015H01	Mg_MxT03_15N23	MGC02998	1,12E+00	1,36E+01	5,92E+00	2,76E-05	1,42E-03	2,71E+00
11	17	10	Myt01-010B03	Mg_MxT03_09H14	MGC02267	1,12E+00	1,15E+01	5,53E+00	5,67E-05	2,16E-03	2,00E+00
3	3	11	Myt01-010B06	Mg_MxT03_09I07	MGC02033	1,14E+00	1,32E+01	6,96E+00	4,44E-06	5,38E-04	4,50E+00
9	10	4	Myt01-010G07	Mg_MxT03_10C24	MGC02369	1,15E+00	1,13E+01	6,51E+00	1,34E-05	9,09E-04	3,47E+00
12	10	9	Myt01-008H01	Mg_MxT03_07A06	MGC02106	1,19E+00	1,34E+01	5,82E+00	4,34E-05	1,83E-03	2,31E+00
14	4	5	Myt01-015G01	Mg_MxT03_15G07	MGC03065	1,19E+00	1,38E+01	6,07E+00	2,83E-05	1,42E-03	2,74E+00
13	7	4	Myt01-009A07	Mg_MxT03_07H06	MGC02124	1,22E+00	8,48E+00	5,38E+00	4,30E-04	8,98E-03	3,89E-01
13	6	3	Myt01-005C09	Mg_MxT02_03E11	no cluster	1,24E+00	1,02E+01	5,18E+00	1,09E-04	3,51E-03	1,36E+00
1	1	14	Myt01-018A08	Mg_MxT03_19N06	MGC03342	1,26E+00	1,07E+01	4,45E+00	4,57E-04	9,24E-03	-5,39E-02
10	10	1	Myt01-004C05	Mg_MxT02_01B12	no cluster	1,27E+00	1,36E+01	6,25E+00	1,51E-05	9,70E-04	3,31E+00
3	17	9	Myt01-006F06	Mg_MxT03_03F02	no cluster	1,28E+00	1,07E+01	5,69E+00	4,16E-05	1,79E-03	2,31E+00
14	4	12	Myt01-015G01	Mg_MxT03_15G07	MGC03065	1,29E+00	1,35E+01	6,10E+00	1,98E-05	1,11E-03	3,04E+00
7	9	10	Myt01-005B12	Mg_MxT02_03B20	MGC01624	1,29E+00	1,33E+01	4,55E+00	3,76E-04	8,21E-03	1,39E-01
16	12	2	Myt01-007D03	Mg_MxT03_04K15	MGC01886	1,30E+00	1,11E+01	4,94E+00	2,63E-04	6,57E-03	5,86E-01
14	5	10	Myt01-007A09	Mg_MxT03_04B18	MGC01856	1,31E+00	9,43E+00	7,13E+00	3,32E-06	5,38E-04	4,79E+00
4	18	3	Myt01-012D04	Mg_MxT03_11O16	MGC00206	1,32E+00	1,10E+01	6,20E+00	1,66E-05	1,05E-03	3,21E+00
2	12	10	Myt01-008G12	Mg_MxT03_06P23	MGC02104	1,34E+00	1,11E+01	5,48E+00	6,22E-05	2,25E-03	1,91E+00
16	6	1	Myt01-003D03	Mg_MxT01_09C06	MGC01566	1,34E+00	1,16E+01	5,48E+00	6,20E-05	2,25E-03	1,91E+00
10	10	8	Myt01-004C05	Mg_MxT02_01B12	no cluster	1,35E+00	1,35E+01	6,96E+00	4,42E-06	5,38E-04	4,51E+00
9	10	11	Myt01-010G07	Mg_MxT03_10C24	MGC02369	1,41E+00	1,11E+01	4,61E+00	4,01E-04	8,51E-03	1,26E-01
13	10	11	Myt01-009G07	Mg_MxT03_09B23	MGC02221	1,52E+00	1,04E+01	4,91E+00	2,78E-04	6,80E-03	5,31E-01
13	9	9	Myt01-005E01	Mg_MxT02_03L17	MGC01750	1,52E+00	1,11E+01	4,80E+00	3,39E-04	7,70E-03	3,23E-01
16	7	10	Myt01-007F09	Mg_MxT03_05C22	MGC01920	1,53E+00	1,12E+01	7,98E+00	1,35E-06	2,92E-04	5,70E+00
13	13	4	Myt01-009E09	Mg_MxT03_08L11	MGC02188	1,54E+00	9,08E+00	5,19E+00	1,69E-04	4,82E-03	1,10E+00
4	2	2	Myt01-004H10	Mg_MxT02_02J10	MGC01714	1,55E+00	1,04E+01	7,17E+00	4,65E-06	5,38E-04	4,50E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
9	17	6	Myt01-018E05	Mg_MxT03_20G23	MGC03415	1,55E+00	1,20E+01	6,54E+00	1,82E-05	1,09E-03	3,22E+00
4	2	10	Myt01-008D08	Mg_MxT03_06G06	MGC02047	1,57E+00	1,18E+01	6,90E+00	4,87E-06	5,38E-04	4,41E+00
4	2	3	Myt01-008D08	Mg_MxT03_06G06	MGC02047	1,58E+00	1,15E+01	6,36E+00	1,25E-05	9,09E-04	3,49E+00
9	8	7	Myt01-018G09	Mg_MxT03_20M20	MGC03464	1,60E+00	1,03E+01	6,38E+00	3,41E-05	1,60E-03	2,65E+00
10	2	6	Myt01-016G09	Mg_MxT03_17F01	MGC00670	1,61E+00	1,34E+01	6,66E+00	1,05E-05	8,50E-04	3,70E+00
9	17	13	Myt01-018E05	Mg_MxT03_20G23	MGC03415	1,62E+00	1,18E+01	5,94E+00	3,54E-05	1,62E-03	2,52E+00
5	14	9	Myt01-005G04	Mg_MxT03_01E23	no cluster	1,66E+00	1,13E+01	5,49E+00	6,07E-05	2,25E-03	1,94E+00
7	8	13	Myt01-017D02	Mg_MxT03_17O09	MGC03210	1,68E+00	1,26E+01	6,63E+00	7,81E-06	7,76E-04	3,95E+00
13	4	4	Myt01-009C05	Mg_MxT03_07P08	MGC01624	1,69E+00	1,22E+01	7,94E+00	9,12E-07	2,72E-04	6,04E+00
10	2	13	Myt01-016G09	Mg_MxT03_17F01	MGC00670	1,70E+00	1,34E+01	7,57E+00	1,62E-06	3,31E-04	5,49E+00
1	7	7	Myt01-018E10	Mg_MxT03_20I09	MGC03427	1,74E+00	1,22E+01	6,89E+00	4,96E-06	5,38E-04	4,40E+00
5	1	3	Myt01-005A08	Mg_MxT02_02M17	no cluster	1,74E+00	1,11E+01	6,31E+00	1,35E-05	9,09E-04	3,42E+00
15	2	8	Myt01-001D01	Mg_MxT01_05A06	MGC01366	1,76E+00	1,21E+01	6,97E+00	4,32E-06	5,38E-04	4,53E+00
5	13	1	Myt01-001A08	Mg_MxT01_04B05	MGC01332	1,79E+00	1,14E+01	5,75E+00	3,73E-05	1,65E-03	2,42E+00
5	1	10	Myt01-005A08	Mg_MxT02_02M17	no cluster	1,80E+00	1,13E+01	6,28E+00	1,97E-05	1,11E-03	3,09E+00
15	2	1	Myt01-001D01	Mg_MxT01_05A06	MGC01366	1,81E+00	1,24E+01	7,77E+00	1,19E-06	2,92E-04	5,78E+00
1	7	14	Myt01-018E10	Mg_MxT03_20I09	MGC03427	1,81E+00	1,22E+01	6,96E+00	4,47E-06	5,38E-04	4,50E+00
5	14	2	Myt01-005G04	Mg_MxT03_01E23	no cluster	1,83E+00	1,13E+01	5,29E+00	1,12E-04	3,57E-03	1,45E+00
5	18	5	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	1,88E+00	1,20E+01	8,54E+00	3,66E-07	2,04E-04	6,92E+00
10	2	9	Myt01-004G09	Mg_MxT02_02F16	MGC01624	1,88E+00	1,29E+01	6,17E+00	1,74E-05	1,07E-03	3,17E+00
13	10	4	Myt01-009G07	Mg_MxT03_09B23	MGC02221	1,90E+00	1,02E+01	5,94E+00	2,66E-05	1,40E-03	2,75E+00
7	8	6	Myt01-017D02	Mg_MxT03_17O09	MGC03210	1,91E+00	1,27E+01	5,75E+00	3,75E-05	1,65E-03	2,41E+00
6	4	2	Myt01-003C12	Mg_MxT01_09C03	MGC01563	1,95E+00	1,20E+01	8,34E+00	8,04E-07	2,72E-04	6,19E+00
12	1	2	Myt01-004F09	Mg_MxT02_02B18	MGC01692	1,95E+00	1,19E+01	6,17E+00	1,75E-05	1,07E-03	3,16E+00
12	13	4	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	2,01E+00	1,11E+01	1,11E+01	1,13E-08	1,95E-05	1,02E+01
5	4	4	Myt01-009C06	Mg_MxT03_08A02	MGC02152	2,01E+00	1,19E+01	8,83E+00	2,38E-07	1,65E-04	7,33E+00
5	13	8	Myt01-001A08	Mg_MxT01_04B05	MGC01332	2,02E+00	1,12E+01	4,60E+00	3,44E-04	7,76E-03	2,27E-01
16	6	2	Myt01-003H11	Mg_MxT01_10D08	MGC01622	2,08E+00	1,28E+01	7,02E+00	3,99E-06	5,38E-04	4,61E+00
4	2	9	Myt01-004H10	Mg_MxT02_02J10	MGC01714	2,14E+00	1,05E+01	6,07E+00	2,09E-05	1,13E-03	2,99E+00
12	13	11	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	2,14E+00	1,11E+01	8,47E+00	6,68E-07	2,58E-04	6,36E+00
6	4	9	Myt01-003C12	Mg_MxT01_09C03	MGC01563	2,18E+00	1,20E+01	6,46E+00	1,04E-05	8,50E-04	3,67E+00
16	6	9	Myt01-003H11	Mg_MxT01_10D08	MGC01622	2,18E+00	1,27E+01	7,70E+00	1,32E-06	2,92E-04	5,68E+00
5	18	12	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	2,21E+00	1,18E+01	9,72E+00	6,85E-08	7,93E-05	8,50E+00
5	4	11	Myt01-009C06	Mg_MxT03_08A02	MGC02152	2,38E+00	1,18E+01	7,41E+00	2,10E-06	3,83E-04	5,23E+00
12	1	9	Myt01-004F09	Mg_MxT02_02B18	MGC01692	2,51E+00	1,17E+01	6,31E+00	1,37E-05	9,09E-04	3,40E+00

INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Transcripts differentially expressed after 7<sup>th</sup> day of treatment

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
16	3	3	Myt01-007F07	Mg_MxT03_05C20	MGC00081	2,87E+00	1,04E+01	8,62E+00	9,36E-07	7,16E-04	5,98E+00
4	15	1	Myt01-004F08	Mg_MxT02_01P17	MGC01690	2,40E+00	1,13E+01	5,16E+00	1,15E-04	8,11E-03	1,38E+00
13	10	2	Myt01-005G01	Mg_MxT03_01E02	no cluster	1,56E+00	9,69E+00	5,44E+00	8,59E-05	7,19E-03	1,71E+00
3	16	2	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	1,45E+00	1,17E+01	6,39E+00	2,29E-05	3,32E-03	3,01E+00
14	8	5	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	1,43E+00	1,18E+01	6,90E+00	7,09E-06	2,31E-03	4,09E+00
14	8	12	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	1,39E+00	1,16E+01	5,61E+00	6,26E-05	5,88E-03	2,00E+00
1	13	5	Myt01-014A08	Mg_MxT03_13J10	MGC02822	1,38E+00	1,27E+01	6,69E+00	7,02E-06	2,31E-03	4,07E+00
13	7	5	Myt01-013E03	Mg_MxT03_13A08	MGC02749	1,34E+00	1,10E+01	5,03E+00	1,79E-04	9,73E-03	9,84E-01
3	16	9	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	1,31E+00	1,20E+01	6,41E+00	2,24E-05	3,32E-03	3,03E+00
9	8	12	Myt01-014G03	Mg_MxT03_14E20	MGC02918	1,28E+00	1,23E+01	6,43E+00	1,11E-05	2,31E-03	3,63E+00
14	17	4	Myt01-011E11	Mg_MxT03_11B03	MGC00081	1,26E+00	9,66E+00	5,81E+00	4,45E-05	4,46E-03	2,34E+00
14	17	11	Myt01-011E11	Mg_MxT03_11B03	MGC00081	1,26E+00	9,54E+00	6,30E+00	1,39E-05	2,42E-03	3,41E+00
1	15	5	Myt01-014E08	Mg_MxT03_14A15	MGC02891	1,23E+00	1,09E+01	5,86E+00	4,03E-05	4,46E-03	2,43E+00
7	8	4	Myt01-009D08	Mg_MxT03_08F11	MGC02169	1,20E+00	1,37E+01	5,65E+00	4,49E-05	4,46E-03	2,29E+00
5	13	3	Myt01-009A02	Mg_MxT03_07E14	MGC02119	1,19E+00	1,20E+01	6,38E+00	1,19E-05	2,31E-03	3,56E+00
3	2	3	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	1,19E+00	1,29E+01	6,16E+00	1,78E-05	2,83E-03	3,18E+00
7	8	11	Myt01-009D08	Mg_MxT03_08F11	MGC02169	1,17E+00	1,36E+01	7,86E+00	1,03E-06	7,16E-04	5,89E+00
11	8	3	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	1,16E+00	1,27E+01	6,64E+00	1,07E-05	2,31E-03	3,70E+00
6	6	6	Myt01-015G12	Mg_MxT03_15M24	MGC02989	1,14E+00	1,16E+01	5,97E+00	3,33E-05	4,17E-03	2,61E+00
1	4	4	Myt01-010C06	Mg_MxT03_09J23	MGC02286	1,13E+00	1,28E+01	5,85E+00	3,12E-05	4,17E-03	2,64E+00
3	2	10	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	1,13E+00	1,31E+01	5,75E+00	3,77E-05	4,36E-03	2,46E+00
11	8	10	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	1,09E+00	1,28E+01	5,65E+00	7,76E-05	6,74E-03	1,84E+00
5	13	10	Myt01-009A02	Mg_MxT03_07E14	MGC02119	1,09E+00	1,21E+01	5,95E+00	2,60E-05	3,61E-03	2,81E+00
5	12	14	Myt01-017G12	Mg_MxT03_19E09	MGC03302	1,09E+00	1,01E+01	6,51E+00	9,62E-06	2,31E-03	3,77E+00
13	8	12	Myt01-013G03	Mg_MxT03_13E11	MGC02784	1,06E+00	1,40E+01	6,78E+00	8,56E-06	2,31E-03	3,91E+00
8	17	12	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	1,05E+00	1,20E+01	6,02E+00	4,21E-05	4,46E-03	2,43E+00
3	12	5	Myt01-014H06	Mg_MxT03_14H02	MGC02938	1,05E+00	1,17E+01	6,56E+00	8,79E-06	2,31E-03	3,86E+00
8	17	5	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	1,04E+00	1,20E+01	6,14E+00	3,42E-05	4,17E-03	2,63E+00
5	8	5	Myt01-013G04	Mg_MxT03_13E13	MGC02675	1,04E+00	9,92E+00	5,68E+00	4,25E-05	4,46E-03	2,34E+00
1	1	5	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	1,02E+00	1,12E+01	7,47E+00	1,93E-06	1,07E-03	5,30E+00
1	1	12	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	1,02E+00	1,11E+01	5,42E+00	6,90E-05	6,15E-03	1,87E+00
9	8	13	Myt01-018C01	Mg_MxT03_20B19	no cluster	1,01E+00	1,03E+01	4,98E+00	1,63E-04	9,33E-03	1,04E+00
9	11	7	Myt01-018E11	Mg_MxT03_20I11	MGC03429	1,01E+00	1,17E+01	7,11E+00	7,65E-06	2,31E-03	4,05E+00
16	2	12	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	-9,40E-01	1,34E+01	6,16E+00	1,79E-05	2,83E-03	3,17E+00
5	17	10	Myt01-009A04	Mg_MxT03_07F11	MGC01578	-9,25E-01	1,19E+01	5,79E+00	3,48E-05	4,17E-03	2,53E+00
9	11	14	Myt01-018E11	Mg_MxT03_20I11	MGC03429	-9,12E-01	1,18E+01	5,28E+00	9,01E-05	7,28E-03	1,61E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>j</sup>
2	17	2	Myt01-008E06	Mg_MxT03_06J09	MGC00482	-8,93E-01	1,28E+01	6,39E+00	1,19E-05	2,31E-03	3,56E+00
16	2	5	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	-8,12E-01	1,37E+01	5,02E+00	1,49E-04	9,10E-03	1,12E+00
11	3	3	Myt01-006F07	Mg_MxT03_03F13	MGC01822	-7,76E-01	1,30E+01	5,00E+00	1,54E-04	9,10E-03	1,09E+00
7	17	11	Myt01-009F12	Mg_MxT03_09A07	MGC02206	-7,69E-01	1,10E+01	5,30E+00	8,70E-05	7,19E-03	1,65E+00
9	13	9	Myt01-006E03	Mg_MxT03_02N22	no cluster	-7,43E-01	1,27E+01	5,54E+00	5,55E-05	5,36E-03	2,08E+00
15	7	11	Myt01-009B07	Mg_MxT03_07M07	MGC00038	7,02E-01	1,36E+01	5,14E+00	1,18E-04	8,11E-03	1,35E+00
7	16	10	Myt01-009H02	Mg_MxT03_09C20	MGC02229	7,33E-01	1,12E+01	5,14E+00	1,19E-04	8,11E-03	1,34E+00
1	18	2	Myt01-006G06	Mg_MxT03_03J06	no cluster	7,67E-01	9,68E+00	5,07E+00	1,66E-04	9,33E-03	1,05E+00
1	8	3	Myt01-006G10	Mg_MxT03_03J17	MGC10001	7,77E-01	1,36E+01	5,01E+00	1,52E-04	9,10E-03	1,11E+00
5	7	2	Myt01-005A02	Mg_MxT02_02L08	MGC01717	7,97E-01	9,33E+00	5,02E+00	1,49E-04	9,10E-03	1,12E+00
3	13	13	Myt01-018F04	Mg_MxT03_20K02	MGC03442	7,99E-01	1,28E+01	5,07E+00	1,36E-04	8,89E-03	1,22E+00
5	5	3	Myt01-005A10	Mg_MxT02_02N06	no cluster	8,27E-01	1,31E+01	5,35E+00	1,01E-04	7,62E-03	1,55E+00
5	5	10	Myt01-005A10	Mg_MxT02_02N06	no cluster	8,63E-01	1,32E+01	4,96E+00	1,70E-04	9,37E-03	9,97E-01
13	3	4	Myt01-009A05	Mg_MxT03_07F12	no cluster	8,70E-01	1,22E+01	5,12E+00	1,24E-04	8,31E-03	1,30E+00
7	16	3	Myt01-009H02	Mg_MxT03_09C20	MGC02229	8,84E-01	1,12E+01	5,21E+00	1,03E-04	7,62E-03	1,48E+00
14	18	5	Myt01-015C09	Mg_MxT03_14O12	MGC03002	9,46E-01	1,15E+01	5,17E+00	1,39E-04	8,92E-03	1,24E+00
4	2	10	Myt01-008D08	Mg_MxT03_06G06	MGC02047	1,06E+00	1,18E+01	4,97E+00	1,66E-04	9,33E-03	1,02E+00
5	4	4	Myt01-009C06	Mg_MxT03_08A02	MGC02152	1,07E+00	1,19E+01	5,03E+00	1,46E-04	9,10E-03	1,14E+00
15	2	8	Myt01-001D01	Mg_MxT01_05A06	MGC01366	1,23E+00	1,21E+01	5,23E+00	1,00E-04	7,62E-03	1,51E+00
6	4	2	Myt01-003C12	Mg_MxT01_09C03	MGC01563	1,33E+00	1,20E+01	5,57E+00	6,72E-05	6,15E-03	1,95E+00
8	7	9	Myt01-007B02	Mg_MxT03_04C11	MGC00318	1,39E+00	1,22E+01	5,22E+00	1,01E-04	7,62E-03	1,50E+00
8	5	10	Myt01-007B10	Mg_MxT03_04E10	MGC00473	1,42E+00	1,24E+01	7,16E+00	3,17E-06	1,38E-03	4,83E+00
5	18	12	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	1,57E+00	1,18E+01	7,40E+00	2,15E-06	1,07E-03	5,19E+00
6	4	9	Myt01-003C12	Mg_MxT01_09C03	MGC01563	1,64E+00	1,20E+01	5,20E+00	1,06E-04	7,67E-03	1,45E+00
5	18	5	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	1,67E+00	1,20E+01	8,11E+00	7,01E-07	7,16E-04	6,25E+00
8	5	3	Myt01-007B10	Mg_MxT03_04E10	MGC00473	2,09E+00	1,22E+01	6,30E+00	1,38E-05	2,42E-03	3,42E+00
12	13	11	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	2,22E+00	1,11E+01	8,58E+00	5,70E-07	7,16E-04	6,35E+00
12	13	4	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	2,34E+00	1,11E+01	1,39E+01	5,22E-10	1,81E-06	1,25E+01

INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Transcripts differentially expressed after 21<sup>st</sup> day of treatment

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>j</sup>
3	2	10	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	4,46E+00	1,31E+01	1,90E+01	5,85E-12	6,77E-09	1,77E+01
6	7	9	Myt01-007A02	Mg_MxT03_03P14	MGC01853	4,46E+00	1,30E+01	7,92E+00	9,32E-07	3,90E-05	5,84E+00
13	4	12	Myt01-013G01	Mg_MxT03_13D19	no cluster	4,39E+00	1,29E+01	1,28E+01	1,58E-09	3,05E-07	1,23E+01
6	7	2	Myt01-007A02	Mg_MxT03_03P14	MGC01853	4,38E+00	1,32E+01	1,31E+01	1,20E-09	3,05E-07	1,25E+01
3	2	3	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	4,38E+00	1,29E+01	1,91E+01	5,73E-12	6,77E-09	1,77E+01
16	3	3	Myt01-007F07	Mg_MxT03_05C20	MGC00081	4,29E+00	1,04E+01	1,04E+01	1,07E-07	5,91E-06	8,21E+00
13	4	5	Myt01-013G01	Mg_MxT03_13D19	no cluster	4,28E+00	1,34E+01	1,47E+01	1,56E-09	3,05E-07	1,24E+01
13	8	5	Myt01-013G03	Mg_MxT03_13E11	MGC02784	4,20E+00	1,38E+01	1,66E+01	4,19E-11	3,09E-08	1,58E+01
1	13	12	Myt01-014A08	Mg_MxT03_13J10	MGC02822	4,17E+00	1,26E+01	1,45E+01	2,96E-10	1,28E-07	1,39E+01
13	8	12	Myt01-013G03	Mg_MxT03_13E11	MGC02784	4,15E+00	1,40E+01	2,30E+01	1,40E-12	4,86E-09	1,89E+01
14	14	5	Myt01-015C07	Mg_MxT03_14O06	no cluster	4,04E+00	1,37E+01	1,14E+01	7,91E-09	8,27E-07	1,07E+01
3	16	2	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	4,04E+00	1,17E+01	1,44E+01	2,18E-09	3,99E-07	1,20E+01
1	13	5	Myt01-014A08	Mg_MxT03_13J10	MGC02822	4,01E+00	1,27E+01	1,63E+01	5,67E-11	3,28E-08	1,55E+01
10	2	11	Myt01-012G03	Mg_MxT03_12E20	MGC02513	3,95E+00	1,44E+01	1,51E+01	1,63E-10	8,09E-08	1,45E+01
14	14	12	Myt01-015C07	Mg_MxT03_14O06	no cluster	3,94E+00	1,34E+01	1,08E+01	1,77E-08	1,54E-06	9,86E+00
9	8	12	Myt01-014G03	Mg_MxT03_14E20	MGC02918	3,92E+00	1,23E+01	1,65E+01	4,45E-11	3,09E-08	1,58E+01
1	16	2	Myt01-006C06	Mg_MxT03_01O10	no cluster	3,92E+00	1,34E+01	1,01E+01	7,50E-08	4,35E-06	8,49E+00
16	1	5	Myt01-015B01	Mg_MxT03_14L01	MGC01913	3,90E+00	1,41E+01	1,09E+01	6,02E-08	3,80E-06	8,78E+00
16	3	10	Myt01-007F07	Mg_MxT03_05C20	MGC00081	3,88E+00	1,05E+01	6,23E+00	2,13E-05	6,78E-04	2,74E+00
5	14	13	Myt01-017G04	Mg_MxT03_19A03	MGC03286	3,87E+00	1,35E+01	1,41E+01	4,37E-10	1,52E-07	1,35E+01
6	2	13	Myt01-015G10	Mg_MxT03_15J18	MGC03087	3,86E+00	1,37E+01	1,06E+01	2,30E-08	1,75E-06	9,60E+00
16	1	12	Myt01-015B01	Mg_MxT03_14L01	MGC01913	3,85E+00	1,38E+01	1,16E+01	6,23E-09	7,73E-07	1,09E+01
5	14	6	Myt01-017G04	Mg_MxT03_19A03	MGC03286	3,83E+00	1,35E+01	1,34E+01	8,91E-10	2,67E-07	1,28E+01
6	2	6	Myt01-015G10	Mg_MxT03_15J18	MGC03087	3,82E+00	1,36E+01	1,28E+01	3,64E-09	4,99E-07	1,15E+01
14	2	12	Myt01-015C01	Mg_MxT03_14M20	MGC02987	3,75E+00	1,36E+01	1,07E+01	1,90E-08	1,57E-06	9,79E+00
3	16	9	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	3,74E+00	1,20E+01	1,48E+01	1,47E-09	3,05E-07	1,24E+01
14	2	5	Myt01-015C01	Mg_MxT03_14M20	MGC02987	3,67E+00	1,37E+01	1,15E+01	6,90E-09	7,99E-07	1,08E+01
9	8	5	Myt01-014G03	Mg_MxT03_14E20	MGC02918	3,66E+00	1,23E+01	1,14E+01	1,73E-08	1,54E-06	9,96E+00
1	16	9	Myt01-006C06	Mg_MxT03_01O10	no cluster	3,66E+00	1,37E+01	8,83E+00	4,06E-07	1,96E-05	6,75E+00
4	15	1	Myt01-004F08	Mg_MxT02_01P17	MGC01690	3,62E+00	1,13E+01	6,52E+00	9,33E-06	3,28E-04	3,48E+00
10	2	4	Myt01-012G03	Mg_MxT03_12E20	MGC02513	3,59E+00	1,45E+01	1,16E+01	6,71E-09	7,99E-07	1,08E+01
15	12	12	Myt01-013H05	Mg_MxT03_13H01	no cluster	3,55E+00	1,44E+01	1,08E+01	1,76E-08	1,54E-06	9,87E+00
8	11	3	Myt01-007F12	Mg_MxT03_05D07	MGC00060	3,45E+00	1,36E+01	1,19E+01	4,49E-09	5,77E-07	1,12E+01
13	7	5	Myt01-013E03	Mg_MxT03_13A08	MGC02749	3,45E+00	1,10E+01	1,04E+01	5,46E-08	3,52E-06	8,81E+00
8	11	10	Myt01-007F12	Mg_MxT03_05D07	MGC00060	3,42E+00	1,34E+01	9,71E+00	6,97E-08	4,25E-06	8,48E+00
10	15	11	Myt01-012A11	Mg_MxT03_11J03	MGC00007	3,42E+00	1,46E+01	1,30E+01	1,41E-09	3,05E-07	1,24E+01

h

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
3	14	2	Myt01-006H04	Mg_MxT03_03M05	MGC01841	3,40E+00	1,23E+01	9,92E+00	9,74E-08	5,46E-06	8,23E+00
10	7	8	Myt01-004E03	Mg_MxT02_01J12	no cluster	3,39E+00	1,40E+01	1,22E+01	3,11E-09	4,71E-07	1,16E+01
10	7	1	Myt01-004E03	Mg_MxT02_01J12	no cluster	3,38E+00	1,41E+01	1,15E+01	7,57E-09	8,22E-07	1,07E+01
15	12	5	Myt01-013H05	Mg_MxT03_13H01	no cluster	3,34E+00	1,45E+01	1,03E+01	3,06E-08	2,26E-06	9,31E+00
10	15	4	Myt01-012A11	Mg_MxT03_11J03	MGC00007	3,32E+00	1,45E+01	1,25E+01	2,31E-09	4,01E-07	1,19E+01
5	10	2	Myt01-005G02	Mg_MxT03_01E06	MGC00007	3,28E+00	1,42E+01	8,82E+00	2,41E-07	1,27E-05	7,22E+00
3	14	9	Myt01-006H04	Mg_MxT03_03M05	MGC01841	3,24E+00	1,25E+01	1,15E+01	7,27E-09	8,15E-07	1,08E+01
7	2	5	Myt01-013D02	Mg_MxT03_12O05	MGC02738	3,24E+00	1,38E+01	1,29E+01	1,47E-09	3,05E-07	1,24E+01
8	8	3	Myt01-007H10	Mg_MxT03_05L17	MGC01969	3,22E+00	1,42E+01	8,79E+00	4,27E-07	1,98E-05	6,74E+00
5	10	9	Myt01-005G02	Mg_MxT03_01E06	MGC00007	3,21E+00	1,42E+01	8,46E+00	4,11E-07	1,96E-05	6,68E+00
7	2	12	Myt01-013D02	Mg_MxT03_12O05	MGC02738	3,19E+00	1,37E+01	1,07E+01	1,85E-08	1,57E-06	9,82E+00
16	12	12	Myt01-015H05	Mg_MxT03_15P04	MGC00035	3,18E+00	1,43E+01	1,02E+01	3,84E-08	2,67E-06	9,08E+00
5	15	12	Myt01-013E08	Mg_MxT03_13A14	MGC01853	3,17E+00	1,42E+01	9,90E+00	5,38E-08	3,52E-06	8,74E+00
13	10	2	Myt01-005G01	Mg_MxT03_01E02	no cluster	3,14E+00	9,69E+00	9,11E+00	2,77E-07	1,40E-05	7,17E+00
1	4	4	Myt01-010C06	Mg_MxT03_09J23	MGC02286	3,09E+00	1,28E+01	1,34E+01	9,21E-10	2,67E-07	1,28E+01
4	14	3	Myt01-012D02	Mg_MxT03_11O12	MGC00060	3,08E+00	1,34E+01	9,66E+00	7,52E-08	4,35E-06	8,40E+00
7	11	10	Myt01-005F12	Mg_MxT03_01D17	no cluster	3,08E+00	1,26E+01	1,23E+01	2,81E-09	4,44E-07	1,17E+01
1	4	11	Myt01-010C06	Mg_MxT03_09J23	MGC02286	3,07E+00	1,29E+01	1,24E+01	2,50E-09	4,14E-07	1,18E+01
7	11	3	Myt01-005F12	Mg_MxT03_01D17	no cluster	3,05E+00	1,25E+01	1,21E+01	3,74E-09	4,99E-07	1,14E+01
4	14	10	Myt01-012D02	Mg_MxT03_11O12	MGC00060	3,01E+00	1,33E+01	1,02E+01	3,46E-08	2,46E-06	9,19E+00
3	12	12	Myt01-014H06	Mg_MxT03_14H02	MGC02938	3,00E+00	1,19E+01	1,09E+01	1,53E-08	1,44E-06	1,00E+01
8	8	10	Myt01-007H10	Mg_MxT03_05L17	MGC01969	2,91E+00	1,39E+01	6,54E+00	1,27E-05	4,34E-04	3,28E+00
3	2	12	Myt01-014D02	Mg_MxT03_13O01	no cluster	2,79E+00	1,27E+01	1,14E+01	8,09E-09	8,27E-07	1,07E+01
14	8	12	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	2,79E+00	1,16E+01	8,80E+00	4,23E-07	1,98E-05	6,75E+00
13	7	12	Myt01-013E03	Mg_MxT03_13A08	MGC02749	2,77E+00	1,11E+01	1,12E+01	1,02E-08	1,02E-06	1,04E+01
11	8	10	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	2,75E+00	1,28E+01	1,19E+01	2,21E-08	1,75E-06	9,78E+00
3	12	5	Myt01-014H06	Mg_MxT03_14H02	MGC02938	2,71E+00	1,17E+01	1,42E+01	3,82E-10	1,48E-07	1,37E+01
14	8	5	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	2,66E+00	1,18E+01	1,03E+01	6,16E-08	3,82E-06	8,69E+00
16	12	5	Myt01-015H05	Mg_MxT03_15P04	MGC00035	2,65E+00	1,41E+01	6,35E+00	1,75E-05	5,74E-04	2,90E+00
13	3	13	Myt01-013A11	Mg_MxT03_12J03	MGC02692	2,60E+00	1,07E+01	9,93E+00	5,22E-08	3,49E-06	8,77E+00
11	8	3	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	2,60E+00	1,27E+01	1,28E+01	3,61E-09	4,99E-07	1,15E+01
3	2	5	Myt01-014D02	Mg_MxT03_13O01	no cluster	2,55E+00	1,25E+01	7,95E+00	8,89E-07	3,77E-05	5,89E+00
1	14	10	Myt01-010C02	Mg_MxT03_09J11	MGC00060	2,46E+00	1,42E+01	8,88E+00	3,81E-07	1,86E-05	6,82E+00
16	13	11	Myt01-011F09	Mg_MxT03_11C10	no cluster	2,41E+00	1,25E+01	7,89E+00	9,78E-07	4,05E-05	5,79E+00
9	18	11	Myt01-010G11	Mg_MxT03_10D07	MGC01991	2,36E+00	1,10E+01	5,94E+00	2,65E-05	8,31E-04	2,42E+00
7	15	3	Myt01-009F02	Mg_MxT03_08M12	MGC01663	2,35E+00	1,28E+01	5,16E+00	1,14E-04	2,70E-03	9,34E-01
1	14	3	Myt01-010C02	Mg_MxT03_09J11	MGC00060	2,30E+00	1,39E+01	9,28E+00	1,27E-07	6,87E-06	7,87E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>j</sup>
14	12	3	Myt01-007G11	Mg_MxT03_05H11	no cluster	2,29E+00	1,39E+01	6,27E+00	1,45E-05	4,80E-04	3,03E+00
5	3	12	Myt01-013E02	Mg_MxT03_13A07	MGC02445	2,26E+00	1,15E+01	6,31E+00	1,36E-05	4,55E-04	3,10E+00
9	18	4	Myt01-010G11	Mg_MxT03_10D07	MGC01991	2,26E+00	1,10E+01	4,73E+00	3,18E-04	6,33E-03	-1,80E-02
6	6	13	Myt01-015G12	Mg_MxT03_15M24	MGC02989	2,26E+00	1,17E+01	7,32E+00	3,66E-06	1,37E-04	4,54E+00
11	7	13	Myt01-018B01	Mg_MxT03_20A06	MGC03358	2,20E+00	9,84E+00	1,05E+01	4,58E-08	3,12E-06	8,99E+00
9	11	14	Myt01-018E11	Mg_MxT03_20I11	MGC03429	2,18E+00	1,18E+01	1,06E+01	2,24E-08	1,75E-06	9,63E+00
13	3	6	Myt01-013A11	Mg_MxT03_12J03	MGC02692	2,15E+00	1,08E+01	7,45E+00	1,98E-06	7,99E-05	5,07E+00
6	6	6	Myt01-015G12	Mg_MxT03_15M24	MGC02989	2,15E+00	1,16E+01	9,04E+00	3,06E-07	1,52E-05	7,07E+00
16	13	4	Myt01-011F09	Mg_MxT03_11C10	no cluster	2,12E+00	1,29E+01	6,46E+00	3,02E-05	8,91E-04	2,61E+00
14	12	10	Myt01-007G11	Mg_MxT03_05H11	no cluster	2,11E+00	1,39E+01	5,83E+00	3,24E-05	9,37E-04	2,21E+00
9	11	7	Myt01-018E11	Mg_MxT03_20I11	MGC03429	2,02E+00	1,17E+01	1,15E+01	3,28E-08	2,37E-06	9,39E+00
2	15	3	Myt01-012E02	Mg_MxT03_12A21	MGC02619	1,99E+00	1,03E+01	6,90E+00	7,06E-06	2,53E-04	3,83E+00
2	15	4	Myt01-012A12	Mg_MxT03_11J04	MGC02546	1,98E+00	1,04E+01	8,58E+00	5,77E-07	2,57E-05	6,39E+00
11	12	12	Myt01-014H05	Mg_MxT03_14G23	MGC02937	1,97E+00	1,06E+01	9,22E+00	2,40E-07	1,27E-05	7,29E+00
5	12	14	Myt01-017G12	Mg_MxT03_19E09	MGC03302	1,93E+00	1,01E+01	9,68E+00	7,31E-08	4,35E-06	8,43E+00
16	2	12	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	1,93E+00	1,34E+01	1,06E+01	2,31E-08	1,75E-06	9,59E+00
6	8	3	Myt01-007G10	Mg_MxT03_05H10	no cluster	1,91E+00	1,42E+01	7,06E+00	3,72E-06	1,38E-04	4,43E+00
6	8	10	Myt01-007G10	Mg_MxT03_05H10	no cluster	1,91E+00	1,41E+01	6,98E+00	4,26E-06	1,56E-04	4,29E+00
3	5	14	Myt01-018B10	Mg_MxT03_20B06	MGC03356	1,90E+00	1,05E+01	5,76E+00	3,70E-05	1,04E-03	2,08E+00
7	17	4	Myt01-009F12	Mg_MxT03_09A07	MGC02206	1,89E+00	1,12E+01	5,53E+00	5,62E-05	1,47E-03	1,65E+00
7	3	5	Myt01-013F02	Mg_MxT03_13C04	MGC02764	1,89E+00	1,11E+01	4,75E+00	2,53E-04	5,26E-03	1,22E-01
1	15	5	Myt01-014E08	Mg_MxT03_14A15	MGC02891	1,87E+00	1,09E+01	7,72E+00	2,00E-06	7,99E-05	5,12E+00
3	15	3	Myt01-010F02	Mg_MxT03_09O17	MGC02335	1,87E+00	1,15E+01	4,56E+00	3,73E-04	7,12E-03	-2,71E-01
13	4	13	Myt01-013C11	Mg_MxT03_12N16	MGC02732	1,86E+00	1,39E+01	5,83E+00	3,26E-05	9,37E-04	2,21E+00
16	2	5	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	1,84E+00	1,37E+01	9,51E+00	9,14E-08	5,21E-06	8,20E+00
1	1	12	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	1,82E+00	1,11E+01	8,12E+00	6,86E-07	2,98E-05	6,15E+00
7	9	13	Myt01-017F02	Mg_MxT03_18F22	MGC01802	1,82E+00	1,36E+01	5,71E+00	4,00E-05	1,11E-03	2,00E+00
2	15	11	Myt01-012A12	Mg_MxT03_11J04	MGC02546	1,82E+00	1,04E+01	8,29E+00	5,35E-07	2,42E-05	6,41E+00
3	15	10	Myt01-010F02	Mg_MxT03_09O17	MGC02335	1,80E+00	1,16E+01	4,57E+00	3,67E-04	7,05E-03	-2,54E-01
1	1	5	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	1,79E+00	1,12E+01	1,09E+01	1,41E-08	1,36E-06	1,01E+01
11	12	5	Myt01-014H05	Mg_MxT03_14G23	MGC02937	1,78E+00	1,06E+01	4,96E+00	2,04E-04	4,46E-03	4,33E-01
3	5	7	Myt01-018B10	Mg_MxT03_20B06	MGC03356	1,76E+00	1,04E+01	4,89E+00	1,92E-04	4,25E-03	4,00E-01
11	7	6	Myt01-018B01	Mg_MxT03_20A06	MGC03358	1,75E+00	9,87E+00	8,06E+00	7,53E-07	3,23E-05	6,06E+00
7	9	6	Myt01-017F02	Mg_MxT03_18F22	MGC01802	1,70E+00	1,36E+01	5,66E+00	4,41E-05	1,18E-03	1,90E+00
13	4	6	Myt01-013C11	Mg_MxT03_12N16	MGC02732	1,67E+00	1,41E+01	5,68E+00	4,24E-05	1,15E-03	1,94E+00
15	9	9	Myt01-005F01	Mg_MxT02_03O19	no cluster	1,61E+00	9,76E+00	5,55E+00	6,98E-05	1,77E-03	1,53E+00
9	8	13	Myt01-018C01	Mg_MxT03_20B19	no cluster	1,60E+00	1,03E+01	6,58E+00	8,42E-06	2,99E-04	3,59E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
8	17	12	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	1,58E+00	1,20E+01	6,21E+00	3,08E-05	9,00E-04	2,52E+00
8	17	5	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	1,54E+00	1,20E+01	6,26E+00	2,85E-05	8,70E-04	2,60E+00
13	11	7	Myt01-017E11	Mg_MxT03_18E24	MGC03246	1,54E+00	1,11E+01	6,10E+00	2,68E-05	8,31E-04	2,50E+00
7	17	11	Myt01-009F12	Mg_MxT03_09A07	MGC02206	1,51E+00	1,10E+01	8,73E+00	2,77E-07	1,40E-05	7,08E+00
8	1	4	Myt01-011F04	Mg_MxT03_11C01	MGC02487	1,48E+00	1,28E+01	4,83E+00	2,64E-04	5,45E-03	1,81E-01
4	3	5	Myt01-016F02	Mg_MxT03_17C16	MGC03146	1,48E+00	1,51E+01	5,25E+00	9,61E-05	2,37E-03	1,10E+00
4	3	12	Myt01-016F02	Mg_MxT03_17C16	MGC03146	1,44E+00	1,52E+01	5,50E+00	5,93E-05	1,54E-03	1,60E+00
1	15	12	Myt01-014E08	Mg_MxT03_14A15	MGC02891	1,44E+00	1,09E+01	5,16E+00	1,13E-04	2,70E-03	9,35E-01
10	5	13	Myt01-016E11	Mg_MxT03_17B20	MGC03142	1,43E+00	1,03E+01	4,95E+00	2,10E-04	4,56E-03	4,03E-01
1	8	6	Myt01-018C02	Mg_MxT03_20B22	MGC03228	1,43E+00	1,34E+01	8,17E+00	6,41E-07	2,82E-05	6,22E+00
8	1	11	Myt01-011F04	Mg_MxT03_11C01	MGC02487	1,41E+00	1,26E+01	5,02E+00	1,49E-04	3,45E-03	6,59E-01
1	11	14	Myt01-018E12	Mg_MxT03_20I15	MGC03432	1,40E+00	1,12E+01	4,64E+00	3,19E-04	6,33E-03	-1,13E-01
11	3	10	Myt01-006F07	Mg_MxT03_03F13	MGC01822	1,39E+00	1,32E+01	6,34E+00	1,79E-05	5,81E-04	2,91E+00
10	16	11	Myt01-012C11	Mg_MxT03_11N23	MGC02595	1,38E+00	1,51E+01	6,03E+00	2,99E-05	8,88E-04	2,40E+00
16	2	13	Myt01-015H09	Mg_MxT03_16B12	MGC00123	1,37E+00	1,23E+01	4,47E+00	4,45E-04	8,32E-03	-4,51E-01
11	17	6	Myt01-018F05	Mg_MxT03_20K07	MGC01790	1,34E+00	9,66E+00	6,36E+00	1,25E-05	4,34E-04	3,19E+00
11	3	3	Myt01-006F07	Mg_MxT03_03F13	MGC01822	1,33E+00	1,30E+01	7,15E+00	3,20E-06	1,22E-04	4,58E+00
5	17	13	Myt01-017E06	Mg_MxT03_18C02	MGC10025	1,29E+00	1,36E+01	7,50E+00	1,83E-06	7,48E-05	5,15E+00
15	8	12	Myt01-013H03	Mg_MxT03_13G21	MGC02803	1,24E+00	9,22E+00	6,02E+00	4,20E-05	1,15E-03	2,13E+00
13	18	11	Myt01-009G11	Mg_MxT03_09C16	MGC00135	1,24E+00	9,76E+00	5,01E+00	1,53E-04	3,51E-03	6,34E-01
1	8	13	Myt01-018C02	Mg_MxT03_20B22	MGC03228	1,23E+00	1,32E+01	5,43E+00	6,80E-05	1,74E-03	1,46E+00
15	8	7	Myt01-017H09	Mg_MxT03_19I19	MGC00177	1,21E+00	1,51E+01	4,76E+00	2,51E-04	5,26E-03	1,29E-01
14	17	11	Myt01-011E11	Mg_MxT03_11B03	MGC00081	1,20E+00	9,54E+00	5,06E+00	1,39E-04	3,27E-03	7,27E-01
15	8	14	Myt01-017H09	Mg_MxT03_19I19	MGC00177	1,20E+00	1,50E+01	4,71E+00	2,73E-04	5,61E-03	4,54E-02
15	8	5	Myt01-013H03	Mg_MxT03_13G21	MGC02803	1,15E+00	9,27E+00	5,02E+00	1,84E-04	4,13E-03	5,45E-01
5	17	6	Myt01-017E06	Mg_MxT03_18C02	MGC10025	1,14E+00	1,36E+01	6,35E+00	1,27E-05	4,34E-04	3,17E+00
11	17	13	Myt01-018F05	Mg_MxT03_20K07	MGC01790	1,09E+00	9,61E+00	5,94E+00	2,67E-05	8,31E-04	2,41E+00
7	10	2	Myt01-005H02	Mg_MxT03_01G04	no cluster	1,06E+00	9,16E+00	5,44E+00	6,75E-05	1,74E-03	1,46E+00
2	11	4	Myt01-012A10	Mg_MxT03_11I23	MGC02543	1,01E+00	9,95E+00	4,52E+00	5,64E-04	1,00E-02	-5,28E-01
12	12	10	Myt01-008H11	Mg_MxT03_07D22	MGC02117	-9,82E-01	1,04E+01	5,06E+00	2,16E-04	4,65E-03	4,65E-01
7	4	4	Myt01-009D06	Mg_MxT03_08E16	MGC00234	-9,61E-01	1,49E+01	4,41E+00	5,01E-04	9,12E-03	-5,71E-01
7	10	9	Myt01-005H02	Mg_MxT03_01G04	no cluster	-9,39E-01	9,42E+00	5,00E+00	1,54E-04	3,53E-03	6,22E-01
4	7	4	Myt01-012B08	Mg_MxT03_11K12	MGC02496	-7,91E-01	1,31E+01	4,44E+00	4,70E-04	8,69E-03	-5,06E-01
16	3	5	Myt01-015F01	Mg_MxT03_15D22	no cluster	-7,85E-01	1,26E+01	4,38E+00	5,30E-04	9,45E-03	-6,28E-01
15	6	7	Myt01-017D09	Mg_MxT03_17P23	MGC03213	-6,38E-01	1,13E+01	4,48E+00	4,35E-04	8,21E-03	-4,26E-01
10	14	5	Myt01-016C07	Mg_MxT03_16K21	MGC03125	7,06E-01	1,45E+01	4,40E+00	5,12E-04	9,26E-03	-5,91E-01
10	13	3	Myt01-012A01	Mg_MxT03_11G21	no cluster	7,59E-01	9,67E+00	4,49E+00	4,27E-04	8,12E-03	-4,10E-01

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
14	14	8	Myt01-003C07	Mg_MxT01_09B04	MGC01560	7,72E-01	1,46E+01	4,69E+00	2,84E-04	5,81E-03	3,22E-03
14	18	2	Myt01-007G05	Mg_MxT03_05F13	MGC01939	7,97E-01	1,23E+01	4,98E+00	1,61E-04	3,66E-03	5,79E-01
12	10	2	Myt01-008H01	Mg_MxT03_07A06	MGC02106	8,31E-01	1,35E+01	4,47E+00	5,17E-04	9,31E-03	-5,16E-01
11	17	2	Myt01-006F05	Mg_MxT03_03E23	no cluster	8,76E-01	1,13E+01	5,04E+00	1,44E-04	3,35E-03	6,96E-01
14	18	9	Myt01-007G05	Mg_MxT03_05F13	MGC01939	8,92E-01	1,22E+01	4,77E+00	2,46E-04	5,19E-03	1,48E-01
11	3	13	Myt01-014B11	Mg_MxT03_13L17	MGC01310	9,11E-01	1,24E+01	4,59E+00	3,46E-04	6,80E-03	-1,97E-01
14	18	5	Myt01-015C09	Mg_MxT03_14O12	MGC03002	9,56E-01	1,15E+01	4,51E+00	4,87E-04	8,95E-03	-5,00E-01
8	13	5	Myt01-015B08	Mg_MxT03_14M02	MGC02980	9,62E-01	1,10E+01	5,32E+00	1,06E-04	2,56E-03	1,10E+00
7	16	10	Myt01-009H02	Mg_MxT03_09C20	MGC02229	9,66E-01	1,12E+01	5,66E+00	4,39E-05	1,18E-03	1,90E+00
16	10	8	Myt01-003D05	Mg_MxT01_09C10	MGC01568	9,74E-01	1,43E+01	4,94E+00	1,75E-04	3,94E-03	4,97E-01
11	3	6	Myt01-014B11	Mg_MxT03_13L17	MGC01310	1,00E+00	1,24E+01	4,67E+00	2,99E-04	6,05E-03	-4,92E-02
11	17	9	Myt01-006F05	Mg_MxT03_03E23	no cluster	1,00E+00	1,13E+01	5,24E+00	9,70E-05	2,37E-03	1,09E+00
8	12	5	Myt01-015H06	Mg_MxT03_15P08	MGC03112	1,01E+00	1,29E+01	4,60E+00	3,40E-04	6,71E-03	-1,78E-01
8	13	1	Myt01-003B08	Mg_MxT01_08H02	MGC01546	1,05E+00	1,45E+01	4,80E+00	2,29E-04	4,90E-03	2,24E-01
16	7	10	Myt01-007F09	Mg_MxT03_05C22	MGC01920	1,06E+00	1,12E+01	4,98E+00	2,00E-04	4,39E-03	4,07E-01
10	10	8	Myt01-004C05	Mg_MxT02_01B12	no cluster	1,06E+00	1,35E+01	4,89E+00	1,92E-04	4,25E-03	4,02E-01
3	6	10	Myt01-006D10	Mg_MxT03_02J16	no cluster	1,07E+00	1,22E+01	4,45E+00	4,64E-04	8,62E-03	-4,92E-01
9	8	14	Myt01-018G09	Mg_MxT03_20M20	MGC03464	1,09E+00	1,04E+01	5,51E+00	7,53E-05	1,87E-03	1,40E+00
14	16	4	Myt01-011C11	Mg_MxT03_10K18	MGC02439	1,11E+00	1,28E+01	4,77E+00	2,44E-04	5,16E-03	1,59E-01
9	12	14	Myt01-018G11	Mg_MxT03_20N08	MGC00860	1,11E+00	1,02E+01	5,79E+00	3,51E-05	9,92E-04	2,13E+00
3	11	9	Myt01-006B04	Mg_MxT03_01L23	no cluster	1,16E+00	1,44E+01	4,42E+00	4,91E-04	8,99E-03	-5,50E-01
10	2	13	Myt01-016G09	Mg_MxT03_17F01	MGC00670	1,16E+00	1,34E+01	4,64E+00	3,18E-04	6,33E-03	-1,12E-01
10	10	1	Myt01-004C05	Mg_MxT02_01B12	no cluster	1,18E+00	1,36E+01	5,21E+00	1,03E-04	2,51E-03	1,03E+00
11	14	11	Myt01-010H09	Mg_MxT03_10E22	MGC02386	1,18E+00	1,09E+01	5,61E+00	4,82E-05	1,28E-03	1,81E+00
4	18	9	Myt01-008H06	Mg_MxT03_07B24	MGC00054	1,19E+00	1,28E+01	7,36E+00	2,27E-06	8,97E-05	4,93E+00
7	9	3	Myt01-005B12	Mg_MxT02_03B20	MGC01624	1,19E+00	1,34E+01	5,82E+00	3,30E-05	9,41E-04	2,19E+00
4	10	11	Myt01-012H08	Mg_MxT03_12G21	MGC02672	1,34E+00	1,22E+01	5,24E+00	1,22E-04	2,88E-03	9,54E-01
3	17	9	Myt01-006F06	Mg_MxT03_03F02	no cluster	1,35E+00	1,07E+01	5,41E+00	7,10E-05	1,79E-03	1,41E+00
9	12	7	Myt01-018G11	Mg_MxT03_20N08	MGC00860	1,36E+00	1,03E+01	5,01E+00	2,36E-04	5,03E-03	3,35E-01
4	10	4	Myt01-012H08	Mg_MxT03_12G21	MGC02672	1,40E+00	1,21E+01	6,05E+00	2,92E-05	8,74E-04	2,41E+00
16	6	9	Myt01-003H11	Mg_MxT01_10D08	MGC01622	1,44E+00	1,27E+01	4,56E+00	3,67E-04	7,05E-03	-2,56E-01
9	9	9	Myt01-006E01	Mg_MxT03_02M20	no cluster	1,46E+00	1,46E+01	4,77E+00	2,91E-04	5,92E-03	6,55E-02
14	10	8	Myt01-003C05	Mg_MxT01_09A10	MGC01558	1,49E+00	1,13E+01	4,58E+00	3,58E-04	6,99E-03	-2,31E-01
5	4	4	Myt01-009C06	Mg_MxT03_08A02	MGC02152	1,50E+00	1,19E+01	5,89E+00	2,88E-05	8,71E-04	2,33E+00
7	8	13	Myt01-017D02	Mg_MxT03_17O09	MGC03210	1,58E+00	1,26E+01	5,59E+00	5,08E-05	1,34E-03	1,75E+00
12	13	11	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	1,67E+00	1,11E+01	5,84E+00	4,21E-05	1,15E-03	2,04E+00
7	8	6	Myt01-017D02	Mg_MxT03_17O09	MGC03210	1,69E+00	1,27E+01	4,57E+00	3,63E-04	7,05E-03	-2,44E-01

INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>j</sup>
6	9	3	Myt01-007A12	Mg_MxT03_04C03	MGC01858	1,71E+00	8,97E+00	4,77E+00	4,45E-04	8,32E-03	-7,08E-02
15	13	8	Myt01-001B07	Mg_MxT01_04F06	MGC00694	1,73E+00	1,03E+01	4,39E+00	5,21E-04	9,34E-03	-6,10E-01
5	18	5	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	1,74E+00	1,20E+01	7,08E+00	3,63E-06	1,37E-04	4,45E+00
12	13	4	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	1,75E+00	1,11E+01	8,73E+00	2,78E-07	1,40E-05	7,07E+00
5	18	12	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	1,81E+00	1,18E+01	7,16E+00	3,16E-06	1,22E-04	4,59E+00
8	7	11	Myt01-011B08	Mg_MxT03_10J02	MGC01829	1,96E+00	1,10E+01	5,53E+00	7,31E-05	1,83E-03	1,47E+00
9	8	7	Myt01-018G09	Mg_MxT03_20M20	MGC03464	1,97E+00	1,03E+01	6,50E+00	2,85E-05	8,70E-04	2,61E+00
8	13	10	Myt01-011B02	Mg_MxT03_10H20	MGC02414	2,03E+00	1,04E+01	7,02E+00	1,34E-05	4,53E-04	3,44E+00
12	9	2	Myt01-008F01	Mg_MxT03_06K13	MGC02074	2,29E+00	1,02E+01	7,75E+00	3,04E-06	1,19E-04	4,88E+00
12	5	3	Myt01-008B09	Mg_MxT03_06B21	MGC02014	2,56E+00	9,67E+00	9,09E+00	5,13E-07	2,34E-05	6,67E+00
16	8	3	Myt01-007H09	Mg_MxT03_05L12	no cluster	2,69E+00	8,87E+00	7,52E+00	6,76E-06	2,45E-04	4,15E+00
13	10	10	Myt01-005C11	Mg_MxT02_03E23	no cluster	3,01E+00	1,07E+01	6,52E+00	1,88E-05	6,03E-04	3,03E+00

**Transcripts differentially expressed after 35<sup>th</sup> day of treatment**

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>j</sup>
16	3	3	Myt01-007F07	Mg_MxT03_05C20	MGC00081	4,09E+00	1,04E+01	9,24E+00	4,23E-07	5,25E-05	6,80E+00
4	15	1	Myt01-004F08	Mg_MxT02_01P17	MGC01690	3,49E+00	1,13E+01	7,01E+00	4,05E-06	2,71E-04	4,54E+00
4	15	8	Myt01-004F08	Mg_MxT02_01P17	MGC01690	3,35E+00	1,14E+01	4,79E+00	2,33E-04	5,41E-03	4,83E-01
16	3	10	Myt01-007F07	Mg_MxT03_05C20	MGC00081	2,97E+00	1,05E+01	5,58E+00	6,61E-05	2,05E-03	1,79E+00
1	16	9	Myt01-006C06	Mg_MxT03_01O10	no cluster	2,75E+00	1,37E+01	7,13E+00	4,92E-06	2,94E-04	4,41E+00
15	16	4	Myt01-009D11	Mg_MxT03_08G11	MGC02173	2,69E+00	1,10E+01	4,69E+00	2,84E-04	6,20E-03	2,84E-01
1	16	2	Myt01-006C06	Mg_MxT03_01O10	no cluster	2,68E+00	1,34E+01	7,95E+00	1,42E-06	1,18E-04	5,64E+00
14	14	5	Myt01-015C07	Mg_MxT03_14O06	no cluster	2,66E+00	1,37E+01	8,37E+00	4,72E-07	5,47E-05	6,67E+00
1	4	4	Myt01-010C06	Mg_MxT03_09J23	MGC02286	2,64E+00	1,28E+01	1,27E+01	1,78E-09	6,20E-06	1,20E+01
14	14	12	Myt01-015C07	Mg_MxT03_14O06	no cluster	2,63E+00	1,34E+01	8,00E+00	8,29E-07	8,72E-05	6,12E+00
13	4	5	Myt01-013G01	Mg_MxT03_13D19	no cluster	2,58E+00	1,34E+01	7,58E+00	3,84E-06	2,67E-04	4,71E+00
1	4	11	Myt01-010C06	Mg_MxT03_09J23	MGC02286	2,58E+00	1,29E+01	1,16E+01	6,10E-09	8,49E-06	1,09E+01
7	15	3	Myt01-009F02	Mg_MxT03_08M12	MGC01663	2,54E+00	1,28E+01	6,22E+00	1,59E-05	7,11E-04	3,17E+00
7	15	10	Myt01-009F02	Mg_MxT03_08M12	MGC01663	2,53E+00	1,27E+01	5,50E+00	6,00E-05	1,91E-03	1,84E+00
14	2	5	Myt01-015C01	Mg_MxT03_14M20	MGC02987	2,48E+00	1,37E+01	8,69E+00	2,91E-07	4,40E-05	7,15E+00
13	7	5	Myt01-013E03	Mg_MxT03_13A08	MGC02749	2,48E+00	1,10E+01	8,74E+00	4,61E-07	5,47E-05	6,74E+00
14	2	12	Myt01-015C01	Mg_MxT03_14M20	MGC02987	2,43E+00	1,36E+01	7,73E+00	1,27E-06	1,11E-04	5,69E+00
8	11	3	Myt01-007F12	Mg_MxT03_05D07	MGC00060	2,37E+00	1,36E+01	9,14E+00	1,53E-07	3,55E-05	7,78E+00
13	8	5	Myt01-013G03	Mg_MxT03_13E11	MGC02784	2,35E+00	1,38E+01	1,04E+01	2,93E-08	1,53E-05	9,39E+00
6	7	9	Myt01-007A02	Mg_MxT03_03P14	MGC01853	2,35E+00	1,30E+01	4,65E+00	3,11E-04	6,71E-03	1,93E-01
6	7	2	Myt01-007A02	Mg_MxT03_03P14	MGC01853	2,32E+00	1,32E+01	7,72E+00	1,28E-06	1,11E-04	5,68E+00
1	13	12	Myt01-014A08	Mg_MxT03_13J10	MGC02822	2,31E+00	1,26E+01	8,96E+00	1,99E-07	3,64E-05	7,52E+00
8	11	10	Myt01-007F12	Mg_MxT03_05D07	MGC00060	2,29E+00	1,34E+01	7,23E+00	2,82E-06	2,09E-04	4,90E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
9	8	5	Myt01-014G03	Mg_MxT03_14E20	MGC02918	2,27E+00	1,23E+01	7,11E+00	5,09E-06	2,94E-04	4,41E+00
8	8	3	Myt01-007H10	Mg_MxT03_05L17	MGC01969	2,26E+00	1,42E+01	7,09E+00	5,25E-06	2,94E-04	4,34E+00
11	8	10	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	2,24E+00	1,28E+01	1,08E+01	6,88E-08	2,39E-05	8,62E+00
9	8	12	Myt01-014G03	Mg_MxT03_14E20	MGC02918	2,20E+00	1,23E+01	1,03E+01	3,08E-08	1,53E-05	9,34E+00
11	8	3	Myt01-006H09	Mg_MxT03_03N20	no cluster	2,19E+00	1,27E+01	1,16E+01	1,29E-08	8,97E-06	1,02E+01
1	13	5	Myt01-014A08	Mg_MxT03_13J10	MGC02822	2,18E+00	1,27E+01	9,87E+00	5,66E-08	2,39E-05	8,75E+00
3	16	2	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	2,17E+00	1,17E+01	7,19E+00	6,76E-06	3,51E-04	4,18E+00
10	7	8	Myt01-004E03	Mg_MxT02_01J12	no cluster	2,17E+00	1,40E+01	8,74E+00	2,74E-07	4,33E-05	7,21E+00
8	8	10	Myt01-007H10	Mg_MxT03_05L17	MGC01969	2,17E+00	1,39E+01	5,57E+00	6,69E-05	2,06E-03	1,80E+00
16	12	5	Myt01-015H05	Mg_MxT03_15P04	MGC00035	2,16E+00	1,41E+01	5,56E+00	6,91E-05	2,08E-03	1,77E+00
6	6	13	Myt01-015G12	Mg_MxT03_15M24	MGC02989	2,15E+00	1,17E+01	8,14E+00	1,08E-06	1,04E-04	5,91E+00
9	18	4	Myt01-010G11	Mg_MxT03_10D07	MGC01991	2,12E+00	1,10E+01	4,48E+00	5,12E-04	9,46E-03	-1,55E-01
5	3	5	Myt01-013E02	Mg_MxT03_13A07	MGC02445	2,11E+00	1,16E+01	5,10E+00	1,58E-04	4,01E-03	9,37E-01
7	17	4	Myt01-009F12	Mg_MxT03_09A07	MGC02206	2,11E+00	1,12E+01	6,86E+00	5,21E-06	2,94E-04	4,29E+00
4	14	10	Myt01-012D02	Mg_MxT03_11O12	MGC00060	2,11E+00	1,33E+01	7,98E+00	8,54E-07	8,72E-05	6,09E+00
9	18	11	Myt01-010G11	Mg_MxT03_10D07	MGC01991	2,09E+00	1,10E+01	5,86E+00	3,04E-05	1,22E-03	2,52E+00
16	1	5	Myt01-015B01	Mg_MxT03_14L01	MGC01913	2,09E+00	1,41E+01	6,20E+00	3,13E-05	1,23E-03	2,66E+00
6	6	6	Myt01-015G12	Mg_MxT03_15M24	MGC02989	2,08E+00	1,16E+01	1,02E+01	6,50E-08	2,39E-05	8,65E+00
13	7	12	Myt01-013E03	Mg_MxT03_13A08	MGC02749	2,06E+00	1,11E+01	9,31E+00	1,21E-07	3,26E-05	8,01E+00
16	1	12	Myt01-015B01	Mg_MxT03_14L01	MGC01913	2,04E+00	1,38E+01	6,86E+00	5,25E-06	2,94E-04	4,28E+00
13	4	12	Myt01-013G01	Mg_MxT03_13D19	no cluster	2,03E+00	1,29E+01	6,64E+00	7,70E-06	3,82E-04	3,90E+00
1	14	3	Myt01-010C02	Mg_MxT03_09J11	MGC00060	2,02E+00	1,39E+01	9,05E+00	1,74E-07	3,57E-05	7,66E+00
13	8	12	Myt01-013G03	Mg_MxT03_13E11	MGC02784	2,00E+00	1,40E+01	1,19E+01	9,78E-09	8,49E-06	1,04E+01
14	8	12	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	1,99E+00	1,16E+01	7,22E+00	4,25E-06	2,73E-04	4,56E+00
14	8	5	Myt01-015G03	Mg_MxT03_15G22	MGC03069	1,96E+00	1,18E+01	8,87E+00	3,87E-07	5,18E-05	6,92E+00
3	2	10	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	1,94E+00	1,31E+01	9,22E+00	1,37E-07	3,40E-05	7,89E+00
1	14	10	Myt01-010C02	Mg_MxT03_09J11	MGC00060	1,93E+00	1,42E+01	7,50E+00	2,77E-06	2,09E-04	4,98E+00
3	15	10	Myt01-010F02	Mg_MxT03_09O17	MGC02335	1,93E+00	1,16E+01	5,46E+00	6,48E-05	2,03E-03	1,76E+00
7	2	5	Myt01-013D02	Mg_MxT03_12O05	MGC02738	1,93E+00	1,38E+01	8,58E+00	3,43E-07	4,97E-05	6,99E+00
7	11	3	Myt01-005F12	Mg_MxT03_01D17	no cluster	1,92E+00	1,25E+01	8,49E+00	3,92E-07	5,18E-05	6,85E+00
4	14	3	Myt01-012D02	Mg_MxT03_11O12	MGC00060	1,91E+00	1,34E+01	6,67E+00	7,24E-06	3,65E-04	3,96E+00
16	12	12	Myt01-015H05	Mg_MxT03_15P04	MGC00035	1,90E+00	1,43E+01	6,77E+00	6,16E-06	3,24E-04	4,12E+00
7	2	12	Myt01-013D02	Mg_MxT03_12O05	MGC02738	1,89E+00	1,37E+01	7,10E+00	3,53E-06	2,50E-04	4,67E+00
7	3	5	Myt01-013F02	Mg_MxT03_13C04	MGC02764	1,89E+00	1,11E+01	5,28E+00	9,05E-05	2,54E-03	1,43E+00
6	2	13	Myt01-015G10	Mg_MxT03_15J18	MGC03087	1,85E+00	1,37E+01	5,65E+00	4,50E-05	1,63E-03	2,13E+00
7	11	10	Myt01-005F12	Mg_MxT03_01D17	no cluster	1,82E+00	1,26E+01	8,14E+00	6,64E-07	7,21E-05	6,34E+00
3	2	3	Myt01-006D08	Mg_MxT03_02I05	MGC01785	1,82E+00	1,29E+01	8,84E+00	2,35E-07	3,89E-05	7,36E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
10	7	1	Myt01-004E03	Mg_MxT02_01J12	no cluster	1,80E+00	1,41E+01	6,82E+00	5,62E-06	3,05E-04	4,21E+00
6	2	6	Myt01-015G10	Mg_MxT03_15J18	MGC03087	1,79E+00	1,36E+01	6,07E+00	2,79E-05	1,17E-03	2,73E+00
5	14	6	Myt01-017G04	Mg_MxT03_19A03	MGC03286	1,79E+00	1,35E+01	6,96E+00	4,42E-06	2,73E-04	4,45E+00
3	16	9	Myt01-006D06	Mg_MxT03_02H09	MGC01781	1,78E+00	1,20E+01	7,48E+00	4,48E-06	2,73E-04	4,58E+00
5	3	12	Myt01-013E02	Mg_MxT03_13A07	MGC02445	1,75E+00	1,15E+01	5,44E+00	6,75E-05	2,06E-03	1,72E+00
11	7	13	Myt01-018B01	Mg_MxT03_20A06	MGC03358	1,74E+00	9,84E+00	9,74E+00	1,22E-07	3,26E-05	8,04E+00
5	14	13	Myt01-017G04	Mg_MxT03_19A03	MGC03286	1,73E+00	1,35E+01	7,03E+00	3,93E-06	2,67E-04	4,57E+00
9	11	7	Myt01-018E11	Mg_MxT03_20I11	MGC03429	1,72E+00	1,17E+01	8,33E+00	1,36E-06	1,15E-04	5,67E+00
10	2	11	Myt01-012G03	Mg_MxT03_12E20	MGC02513	1,72E+00	1,44E+01	7,32E+00	2,45E-06	1,89E-04	5,04E+00
9	8	13	Myt01-018C01	Mg_MxT03_20B19	no cluster	1,70E+00	1,03E+01	7,81E+00	1,11E-06	1,05E-04	5,82E+00
9	4	6	Myt01-014C11	Mg_MxT03_13N10	MGC02481	1,69E+00	9,81E+00	5,23E+00	1,24E-04	3,35E-03	1,18E+00
5	12	14	Myt01-017G12	Mg_MxT03_19E09	MGC03302	1,67E+00	1,01E+01	9,38E+00	1,10E-07	3,26E-05	8,10E+00
3	14	9	Myt01-006H04	Mg_MxT03_03M05	MGC01841	1,67E+00	1,25E+01	6,60E+00	8,16E-06	4,00E-04	3,84E+00
3	15	3	Myt01-010F02	Mg_MxT03_09O17	MGC02335	1,66E+00	1,15E+01	4,54E+00	3,88E-04	7,88E-03	-2,72E-02
1	1	5	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	1,66E+00	1,12E+01	1,13E+01	9,33E-09	8,49E-06	1,05E+01
13	3	13	Myt01-013A11	Mg_MxT03_12J03	MGC02692	1,63E+00	1,07E+01	6,96E+00	4,45E-06	2,73E-04	4,44E+00
15	12	12	Myt01-013H05	Mg_MxT03_13H01	no cluster	1,63E+00	1,44E+01	5,52E+00	5,71E-05	1,90E-03	1,89E+00
5	15	12	Myt01-013E08	Mg_MxT03_13A14	MGC01853	1,63E+00	1,42E+01	5,67E+00	4,32E-05	1,58E-03	2,17E+00
15	12	5	Myt01-013H05	Mg_MxT03_13H01	no cluster	1,63E+00	1,45E+01	5,62E+00	4,77E-05	1,70E-03	2,07E+00
3	2	5	Myt01-014D02	Mg_MxT03_13O01	no cluster	1,59E+00	1,25E+01	5,51E+00	5,86E-05	1,91E-03	1,86E+00
13	18	11	Myt01-009G11	Mg_MxT03_09C16	MGC00135	1,58E+00	9,76E+00	7,15E+00	3,24E-06	2,34E-04	4,76E+00
15	1	8	Myt01-001B01	Mg_MxT01_04C05	MGC01337	1,58E+00	1,09E+01	4,60E+00	3,44E-04	7,16E-03	9,15E-02
1	15	5	Myt01-014E08	Mg_MxT03_14A15	MGC02891	1,58E+00	1,09E+01	6,99E+00	6,12E-06	3,24E-04	4,19E+00
11	3	1	Myt01-002F01	Mg_MxT01_07G03	MGC00590	1,57E+00	1,03E+01	4,97E+00	2,02E-04	4,82E-03	6,67E-01
9	11	14	Myt01-018E11	Mg_MxT03_20I11	MGC03429	1,57E+00	1,18E+01	8,47E+00	4,03E-07	5,18E-05	6,83E+00
13	10	2	Myt01-005G01	Mg_MxT03_01E02	no cluster	1,57E+00	9,69E+00	4,58E+00	4,23E-04	8,30E-03	3,53E-02
14	12	3	Myt01-007G11	Mg_MxT03_05H11	no cluster	1,55E+00	1,39E+01	4,73E+00	2,65E-04	5,86E-03	3,55E-01
3	12	12	Myt01-014H06	Mg_MxT03_14H02	MGC02938	1,54E+00	1,19E+01	6,22E+00	1,59E-05	7,11E-04	3,17E+00
3	2	12	Myt01-014D02	Mg_MxT03_13O01	no cluster	1,53E+00	1,27E+01	7,00E+00	4,13E-06	2,71E-04	4,52E+00
3	12	5	Myt01-014H06	Mg_MxT03_14H02	MGC02938	1,51E+00	1,17E+01	8,84E+00	2,34E-07	3,89E-05	7,36E+00
16	2	12	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	1,48E+00	1,34E+01	9,05E+00	1,75E-07	3,57E-05	7,65E+00
1	1	12	Myt01-014A02	Mg_MxT03_13H22	MGC02814	1,48E+00	1,11E+01	7,34E+00	2,35E-06	1,85E-04	5,08E+00
10	15	11	Myt01-012A11	Mg_MxT03_11J03	MGC00007	1,47E+00	1,46E+01	6,23E+00	1,56E-05	7,11E-04	3,19E+00
2	15	3	Myt01-012E02	Mg_MxT03_12A21	MGC02619	1,47E+00	1,03E+01	5,45E+00	8,35E-05	2,44E-03	1,58E+00
2	15	4	Myt01-012A12	Mg_MxT03_11J04	MGC02546	1,46E+00	1,04E+01	6,76E+00	8,81E-06	4,14E-04	3,83E+00
16	3	12	Myt01-015F01	Mg_MxT03_15D22	no cluster	1,45E+00	1,23E+01	5,90E+00	2,86E-05	1,18E-03	2,58E+00
13	3	6	Myt01-013A11	Mg_MxT03_12J03	MGC02692	1,44E+00	1,08E+01	5,58E+00	5,19E-05	1,80E-03	1,98E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
15	8	12	Myt01-013H03	Mg_MxT03_13G21	MGC02803	1,43E+00	9,22E+00	7,32E+00	5,58E-06	3,05E-04	4,36E+00
10	15	4	Myt01-012A11	Mg_MxT03_11J03	MGC00007	1,42E+00	1,45E+01	5,95E+00	2,60E-05	1,11E-03	2,68E+00
16	13	4	Myt01-011F09	Mg_MxT03_11C10	no cluster	1,41E+00	1,29E+01	5,15E+00	2,36E-04	5,41E-03	6,98E-01
7	17	11	Myt01-009F12	Mg_MxT03_09A07	MGC02206	1,40E+00	1,10E+01	8,98E+00	1,92E-07	3,64E-05	7,56E+00
7	9	13	Myt01-017F02	Mg_MxT03_18F22	MGC01802	1,37E+00	1,36E+01	4,78E+00	2,38E-04	5,41E-03	4,59E-01
7	16	2	Myt01-005D06	Mg_MxT02_03G12	MGC01684	1,36E+00	1,12E+01	5,76E+00	3,71E-05	1,42E-03	2,32E+00
16	13	11	Myt01-011F09	Mg_MxT03_11C10	no cluster	1,34E+00	1,25E+01	4,91E+00	1,87E-04	4,48E-03	7,01E-01
7	9	6	Myt01-017F02	Mg_MxT03_18F22	MGC01802	1,34E+00	1,36E+01	4,97E+00	1,65E-04	4,11E-03	8,25E-01
16	2	5	Myt01-015D01	Mg_MxT03_14P01	MGC00464	1,34E+00	1,37E+01	7,73E+00	1,26E-06	1,11E-04	5,70E+00
15	7	10	Myt01-005F09	Mg_MxT03_01C04	MGC10006	1,32E+00	1,45E+01	5,01E+00	1,51E-04	3,90E-03	9,13E-01
1	11	7	Myt01-018E12	Mg_MxT03_20I15	MGC03432	1,31E+00	1,12E+01	4,88E+00	2,38E-04	5,41E-03	5,05E-01
4	4	4	Myt01-012D06	Mg_MxT03_11O21	MGC02604	1,31E+00	1,18E+01	4,50E+00	4,20E-04	8,29E-03	-1,06E-01
8	17	5	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	1,30E+00	1,20E+01	6,92E+00	1,01E-05	4,70E-04	3,74E+00
13	18	4	Myt01-009G11	Mg_MxT03_09C16	MGC00135	1,29E+00	1,00E+01	5,87E+00	3,03E-05	1,22E-03	2,52E+00
8	4	10	Myt01-007H08	Mg_MxT03_05K17	MGC01966	1,29E+00	1,04E+01	6,33E+00	3,63E-05	1,40E-03	2,56E+00
1	15	12	Myt01-014E08	Mg_MxT03_14A15	MGC02891	1,25E+00	1,09E+01	5,01E+00	1,51E-04	3,90E-03	9,14E-01
1	8	6	Myt01-018C02	Mg_MxT03_20B22	MGC03228	1,24E+00	1,34E+01	7,89E+00	9,75E-07	9,68E-05	5,95E+00
15	7	3	Myt01-005F09	Mg_MxT03_01C04	MGC10006	1,23E+00	1,46E+01	4,64E+00	3,15E-04	6,76E-03	1,79E-01
13	11	7	Myt01-017E11	Mg_MxT03_18E24	MGC03246	1,21E+00	1,11E+01	5,64E+00	5,92E-05	1,91E-03	1,90E+00
10	5	13	Myt01-016E11	Mg_MxT03_17B20	MGC03142	1,20E+00	1,03E+01	4,83E+00	2,62E-04	5,85E-03	4,13E-01
1	8	13	Myt01-018C02	Mg_MxT03_20B22	MGC03228	1,20E+00	1,32E+01	5,87E+00	2,99E-05	1,22E-03	2,54E+00
14	17	11	Myt01-011E11	Mg_MxT03_11B03	MGC00081	1,18E+00	9,54E+00	5,54E+00	5,55E-05	1,89E-03	1,92E+00
4	15	3	Myt01-012F02	Mg_MxT03_12C13	MGC02637	1,18E+00	9,85E+00	4,70E+00	2,79E-04	6,13E-03	3,03E-01
11	7	6	Myt01-018B01	Mg_MxT03_20A06	MGC03358	1,17E+00	9,87E+00	6,02E+00	2,29E-05	1,01E-03	2,80E+00
11	12	12	Myt01-014H05	Mg_MxT03_14G23	MGC02937	1,15E+00	1,06E+01	5,95E+00	3,43E-05	1,34E-03	2,45E+00
8	17	12	Myt01-015B10	Mg_MxT03_14M10	MGC02984	1,12E+00	1,20E+01	5,80E+00	6,04E-05	1,91E-03	1,96E+00
2	15	11	Myt01-012A12	Mg_MxT03_11J04	MGC02546	1,12E+00	1,04E+01	5,68E+00	4,28E-05	1,58E-03	2,18E+00
11	3	3	Myt01-006F07	Mg_MxT03_03F13	MGC01822	1,11E+00	1,30E+01	6,69E+00	6,99E-06	3,57E-04	3,99E+00
10	11	8	Myt01-004E05	Mg_MxT02_01K15	MGC01675	1,10E+00	1,09E+01	4,63E+00	3,22E-04	6,86E-03	1,60E-01
13	18	6	Myt01-017G05	Mg_MxT03_19A06	MGC03288	1,09E+00	1,03E+01	5,05E+00	2,17E-04	5,13E-03	6,78E-01
13	18	13	Myt01-017G05	Mg_MxT03_19A06	MGC03288	1,06E+00	1,04E+01	5,57E+00	8,83E-05	2,49E-03	1,58E+00
11	3	10	Myt01-006F07	Mg_MxT03_03F13	MGC01822	1,04E+00	1,32E+01	5,55E+00	7,02E-05	2,08E-03	1,73E+00
8	4	11	Myt01-011D06	Mg_MxT03_10N20	MGC02457	1,04E+00	1,17E+01	4,38E+00	5,30E-04	9,68E-03	-3,38E-01
7	1	1	Myt01-001B02	Mg_MxT01_04D10	MGC01342	1,04E+00	1,04E+01	5,14E+00	1,18E-04	3,22E-03	1,16E+00
16	18	11	Myt01-011H11	Mg_MxT03_11G16	MGC02526	1,04E+00	1,24E+01	5,07E+00	1,36E-04	3,64E-03	1,02E+00
15	8	5	Myt01-013H03	Mg_MxT03_13G21	MGC02803	1,02E+00	9,27E+00	5,13E+00	1,50E-04	3,90E-03	9,90E-01
3	5	4	Myt01-010F06	Mg_MxT03_10A15	MGC02348	-9,46E-01	1,03E+01	5,40E+00	7,28E-05	2,14E-03	1,65E+00

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
7	5	4	Myt01-009F06	Mg_MxT03_08O07	MGC01653	-9,39E-01	1,23E+01	4,68E+00	2,91E-04	6,32E-03	2,59E-01
7	2	10	Myt01-005D08	Mg_MxT02_03H09	MGC01741	-9,31E-01	1,21E+01	4,48E+00	4,38E-04	8,46E-03	-1,49E-01
10	11	1	Myt01-004E05	Mg_MxT02_01K15	MGC01675	-9,15E-01	1,14E+01	5,30E+00	8,73E-05	2,49E-03	1,46E+00
5	17	10	Myt01-009A04	Mg_MxT03_07F11	MGC01578	-9,08E-01	1,19E+01	5,31E+00	8,60E-05	2,47E-03	1,48E+00
16	3	5	Myt01-015F01	Mg_MxT03_15D22	no cluster	-9,03E-01	1,26E+01	5,62E+00	4,79E-05	1,70E-03	2,07E+00
7	2	3	Myt01-005D08	Mg_MxT02_03H09	MGC01741	-8,84E-01	1,20E+01	5,00E+00	1,57E-04	4,01E-03	8,77E-01
5	17	13	Myt01-017E06	Mg_MxT03_18C02	MGC10025	-8,83E-01	1,36E+01	5,72E+00	4,00E-05	1,51E-03	2,25E+00
8	3	13	Myt01-015B12	Mg_MxT03_14M18	MGC02986	-8,64E-01	1,05E+01	4,71E+00	4,98E-04	9,30E-03	-1,01E-01
12	12	10	Myt01-008H11	Mg_MxT03_07D22	MGC02117	-8,01E-01	1,04E+01	5,02E+00	2,30E-04	5,40E-03	5,96E-01
7	10	2	Myt01-005H02	Mg_MxT03_01G04	no cluster	-7,93E-01	9,16E+00	4,55E+00	3,80E-04	7,76E-03	-6,00E-03
10	17	1	Myt01-004A09	Mg_MxT01_10F10	MGC01632	-7,82E-01	1,33E+01	4,93E+00	1,77E-04	4,34E-03	7,54E-01
7	10	9	Myt01-005H02	Mg_MxT03_01G04	no cluster	-7,76E-01	9,42E+00	4,61E+00	3,34E-04	6,99E-03	1,22E-01
5	17	6	Myt01-017E06	Mg_MxT03_18C02	MGC10025	-7,71E-01	1,36E+01	4,78E+00	2,37E-04	5,41E-03	4,64E-01
6	13	12	Myt01-015A08	Mg_MxT03_14J15	no cluster	-6,35E-01	1,18E+01	4,41E+00	5,02E-04	9,34E-03	-2,85E-01
10	10	4	Myt01-012G07	Mg_MxT03_12F02	MGC02656	-6,15E-01	1,28E+01	4,42E+00	4,94E-04	9,29E-03	-2,69E-01
15	7	11	Myt01-009B07	Mg_MxT03_07M07	MGC00038	6,58E-01	1,36E+01	4,50E+00	4,16E-04	8,25E-03	-9,64E-02
16	3	9	Myt01-003B11	Mg_MxT01_08H07	MGC00160	7,19E-01	1,21E+01	4,42E+00	4,86E-04	9,17E-03	-2,52E-01
11	17	2	Myt01-006F05	Mg_MxT03_03E23	no cluster	7,44E-01	1,13E+01	4,78E+00	2,40E-04	5,41E-03	4,53E-01
11	17	9	Myt01-006F05	Mg_MxT03_03E23	no cluster	7,60E-01	1,13E+01	4,44E+00	4,72E-04	9,01E-03	-2,22E-01
14	15	10	Myt01-011E01	Mg_MxT03_10P11	MGC02468	8,01E-01	1,22E+01	4,55E+00	3,75E-04	7,71E-03	6,60E-03
12	10	2	Myt01-008H01	Mg_MxT03_07A06	MGC02106	8,38E-01	1,35E+01	5,29E+00	1,13E-04	3,11E-03	1,25E+00
16	2	1	Myt01-003D01	Mg_MxT01_09C04	MGC01564	8,49E-01	9,88E+00	4,49E+00	4,26E-04	8,32E-03	-1,21E-01
15	14	6	Myt01-017H03	Mg_MxT03_19F16	no cluster	8,63E-01	1,28E+01	5,57E+00	5,25E-05	1,81E-03	1,97E+00
9	11	11	Myt01-010A09	Mg_MxT03_09G02	MGC02256	8,66E-01	1,23E+01	5,16E+00	1,43E-04	3,77E-03	1,11E+00
7	16	10	Myt01-009H02	Mg_MxT03_09C20	MGC02229	9,13E-01	1,12E+01	5,98E+00	2,47E-05	1,07E-03	2,73E+00
14	4	5	Myt01-015G01	Mg_MxT03_15G07	MGC03065	9,14E-01	1,38E+01	4,65E+00	3,71E-04	7,68E-03	8,28E-02
14	4	12	Myt01-015G01	Mg_MxT03_15G07	MGC03065	9,52E-01	1,35E+01	4,52E+00	4,04E-04	8,07E-03	-6,81E-02
4	10	4	Myt01-012H08	Mg_MxT03_12G21	MGC02672	9,57E-01	1,21E+01	4,84E+00	2,59E-04	5,80E-03	4,20E-01
7	10	3	Myt01-005D12	Mg_MxT02_03L15	MGC10018	1,01E+00	1,16E+01	4,53E+00	3,96E-04	8,00E-03	-4,81E-02
10	10	1	Myt01-004C05	Mg_MxT02_01B12	no cluster	1,01E+00	1,36E+01	4,97E+00	1,65E-04	4,11E-03	8,24E-01
10	2	13	Myt01-016G09	Mg_MxT03_17F01	MGC00670	1,02E+00	1,34E+01	4,52E+00	4,04E-04	8,07E-03	-6,77E-02
14	16	4	Myt01-011C11	Mg_MxT03_10K18	MGC02439	1,02E+00	1,28E+01	4,92E+00	1,81E-04	4,39E-03	7,35E-01
11	14	11	Myt01-010H09	Mg_MxT03_10E22	MGC02386	1,02E+00	1,09E+01	5,42E+00	6,97E-05	2,08E-03	1,69E+00
4	10	11	Myt01-012H08	Mg_MxT03_12G21	MGC02672	1,03E+00	1,22E+01	4,72E+00	3,24E-04	6,87E-03	1,94E-01
10	10	8	Myt01-004C05	Mg_MxT02_01B12	no cluster	1,03E+00	1,35E+01	5,31E+00	8,58E-05	2,47E-03	1,48E+00
7	16	3	Myt01-009H02	Mg_MxT03_09C20	MGC02229	1,03E+00	1,12E+01	5,69E+00	4,20E-05	1,57E-03	2,20E+00
3	11	9	Myt01-006B04	Mg_MxT03_01L23	no cluster	1,04E+00	1,44E+01	4,43E+00	4,85E-04	9,17E-03	-2,50E-01

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Block <sup>a</sup>	Column <sup>a</sup>	Row <sup>a</sup>	MytArray 1.0 ID <sup>b</sup>	MytiBase ID <sup>c</sup>	Cluster ID <sup>d</sup>	logFC <sup>e</sup>	AveExpr <sup>f</sup>	t-value <sup>g</sup>	p-value <sup>h</sup>	adj. p-value <sup>i</sup>	Bk <sup>l</sup>
3	6	3	Myt01-006D10	Mg_MxT03_02J16	no cluster	1,05E+00	1,20E+01	5,50E+00	6,01E-05	1,91E-03	1,84E+00
14	16	11	Myt01-011C11	Mg_MxT03_10K18	MGC02439	1,07E+00	1,27E+01	4,47E+00	5,19E-04	9,54E-03	-2,69E-01
4	18	3	Myt01-012D04	Mg_MxT03_11O16	MGC00206	1,07E+00	1,10E+01	5,04E+00	1,43E-04	3,77E-03	9,68E-01
3	17	9	Myt01-006F06	Mg_MxT03_03F02	no cluster	1,12E+00	1,07E+01	4,97E+00	1,64E-04	4,11E-03	8,31E-01
3	11	2	Myt01-006B04	Mg_MxT03_01L23	no cluster	1,13E+00	1,44E+01	5,92E+00	2,75E-05	1,16E-03	2,62E+00
15	10	14	Myt01-017D11	Mg_MxT03_18A13	MGC02682	1,14E+00	1,22E+01	4,95E+00	1,70E-04	4,20E-03	7,95E-01
7	8	13	Myt01-017D02	Mg_MxT03_17O09	MGC03210	1,17E+00	1,26E+01	4,61E+00	3,34E-04	6,99E-03	1,22E-01
3	6	10	Myt01-006D10	Mg_MxT03_02J16	no cluster	1,19E+00	1,22E+01	5,52E+00	5,75E-05	1,90E-03	1,88E+00
4	18	9	Myt01-008H06	Mg_MxT03_07B24	MGC00054	1,21E+00	1,28E+01	8,33E+00	4,97E-07	5,57E-05	6,62E+00
5	18	5	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	1,23E+00	1,20E+01	5,59E+00	5,03E-05	1,76E-03	2,02E+00
5	18	12	Myt01-013C10	Mg_MxT03_12N12	MGC01399	1,26E+00	1,18E+01	5,53E+00	5,60E-05	1,89E-03	1,91E+00
16	6	9	Myt01-003H11	Mg_MxT01_10D08	MGC01622	1,26E+00	1,27E+01	4,45E+00	4,58E-04	8,80E-03	-1,94E-01
15	10	7	Myt01-017D11	Mg_MxT03_18A13	MGC02682	1,30E+00	1,24E+01	6,59E+00	8,34E-06	4,02E-04	3,82E+00
12	13	11	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	1,35E+00	1,11E+01	5,33E+00	1,05E-04	2,91E-03	1,35E+00
12	13	4	Myt01-012F09	Mg_MxT03_12D15	MGC01399	1,37E+00	1,11E+01	7,58E+00	1,60E-06	1,29E-04	5,46E+00
8	3	11	Myt01-011B06	Mg_MxT03_10I17	MGC02420	1,39E+00	1,19E+01	4,57E+00	4,32E-04	8,38E-03	-9,26E-02
5	13	1	Myt01-001A08	Mg_MxT01_04B05	MGC01332	1,53E+00	1,14E+01	4,92E+00	1,83E-04	4,42E-03	7,22E-01
5	5	2	Myt01-001E12	Mg_MxT01_05D06	MGC01389	1,57E+00	1,05E+01	5,14E+00	1,20E-04	3,25E-03	1,15E+00
9	8	4	Myt01-010C07	Mg_MxT03_09K04	MGC02287	1,95E+00	9,61E+00	7,71E+00	8,82E-06	4,14E-04	4,01E+00

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

Tabella S2 Lista complete dei trascritti differenzialmente regolati in *Mytilus galloprovincialis* a seguito del trattamento con OA. In colonna a: MytiBase transcript identification number, b: EMBL EST's identification number, c: annotazioni ricavate dalle ricerche di similarità nel MytiBase, d: domini funzionali ottenuti dalle ricerche in InterProScan database (EBI), e: punto sperimentale di appartenenza. Dot, days of treatment, Wot, weeks of treatment.

UP REGULATED				
MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>	Phase <sup>e</sup>
MGC00038	AJ624419	Vdg3	/	3 dot
MGC00206	AJ625054	Without similarity	/	3 dot
MGC00464	AJ625974	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	3 dot
MGC00665	AJ623726	Ubiquitin C variant (Fragment)	Ubiquitin	3 dot
MGC00670	AJ625915	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	3 dot
MGC01310	AJ625403	<i>Mytilus galloprovincialis</i> heat shock protein 70 mRNA, complete cds	Heat shock protein Hsp70, Heat shock protein 70	3 dot
MGC01332	AJ516362	<i>Mytilus edulis</i> gene for endo-1,4-mannanase, exons 1-6	/	3 dot
MGC01366	AJ516421	<i>Mytilus galloprovincialis</i> partial hsc70 gene for heat shock cognate 70, exons 4-5	/	3 dot
MGC01399	AJ625117	Without similarity	/	3 dot
MGC01436	AJ516533	Without similarity	/	3 dot
MGC01455	AJ624248	Elongation factor 2	Protein synthesis factor, GTP-binding	3 dot
MGC01523	AJ516688	Without similarity	/	3 dot
MGC01563	AJ516757	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone Mg18 microsatellite sequence	/	3 dot
MGC01566	AJ516760	Without similarity	/	3 dot
MGC01622	AJ516858	<i>Mytilus galloprovincialis</i> gene for twitchin, partial cds.	/	3 dot
MGC01624	AJ623451	C-myc proto-oncogene homolog (Fragment)	von Willebrand factor, type C; Metridin-like ShK toxin	3 dot
MGC01692	AJ623424	C-myc proto-oncogene homolog protein, (Fragment)	von Willebrand factor, type C	3 dot
MGC01710	AJ623462	Without similarity	/	3 dot
MGC01714	AJ623482	Without similarity	/	3 dot
MGC01731	AJ625123	Elongation factor-1 gamma (Fragment)	Translation elongation factor EF1B gamma chain, conserved	3 dot
MGC01750	AJ623586	Without similarity	/	3 dot
MGC01789	AJ623701	Without similarity	/	3 dot
MGC01856	AJ623958	Without similarity	/	3 dot
MGC01886	AJ624023	Without similarity	/	3 dot
MGC01920	AJ624089	DEAD-box RNA-dependent helicase p68	ATP-dependent helicase, DEAD-box; DEAD/DEAH box helicase, N-terminal; DEAD-like helicases, N-terminal; DEAD-box RNA helicase Q motif; Helicase superfamily 1 and 2 ATP-binding	3 dot
MGC01960	AJ624147	Without similarity	/	3 dot
MGC02033	AJ624622	CG17838-PD, isoform D	RNA-binding region RNP-1; HnRNP R and Q splicing factor; Nucleotide-binding, alpha-beta plait	3 dot
MGC02047	AJ624274	<i>Mytilus galloprovincialis</i> hsc71 gene for heat shock cognate 71, exons 1-6	/	3 dot
MGC02065	AJ624300	40S ribosomal protein S4 (Fragment)	Ribosomal protein S4E; KOW; Ribosomal protein S4E, central	3 dot
MGC02104	AJ624351	Without similarity	/	3 dot
MGC02106	AJ624353	Without similarity	von Willebrand factor, type A	3 dot
MGC02124	AJ624391	Without similarity	/	3 dot
MGC02152	AJ624440	Without similarity	/	3 dot

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MGC02188	AJ624494	CAMP responsive element binding protein-like (Fragment)	/	3 dot
MGC02221	AJ624541	Without similarity	/	3 dot
MGC02223	AJ624543	<i>Mytilus edulis</i> gene for endo-1,4-mannanase, exons 1-6	/	3 dot
MGC02225	AJ624544	Reductase-relate protein	NAD-dependent epimerase/dehydratase	3 dot
MGC02229	AJ624552	Without similarity	/	3 dot
MGC02267	AJ624615	heat shock cognate 71	Heat shock protein Hsp70; Heat shock protein 70	3 dot
MGC02369	AJ624748	Without similarity	C2 calcium-dependent membrane targeting; C2 calcium/lipid-binding region, CaLB	3 dot
MGC02386	AJ624775	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	Aldehyde dehydrogenase	3 dot
MGC02470	AJ624889	Without similarity	Fumarate lyase	3 dot
MGC02558	AJ625004	Without similarity	/	3 dot
MGC02591	AJ625039	Without similarity	/	3 dot
MGC02624	AJ625082	Without similarity	/	3 dot
MGC02661	AJ625141	Without similarity	/	3 dot
MGC02672	AJ625159	Without similarity	/	3 dot
MGC02998	AJ625768	Without similarity	/	3 dot
MGC03002	AJ625614	Without similarity	/	3 dot
MGC03065	AJ625700	Partial ubiquitin gene	Ubiquitin	3 dot
MGC03210	AJ626006	C-myc proto-oncogene homolog protein (Fragment)	von Willebrand factor, type C; Metridin-like ShK toxin	3 dot
MGC03253	AJ626184	Int-6 protein	Proteasome component region PCI	3 dot
MGC03342	AJ626232	Without similarity	/	3 dot
MGC03388	AJ626305	Without similarity	/	3 dot
MGC03415	AJ626346	<i>Mytilus galloprovincialis</i> gene for twitchin, partial cds, clone: TOPOXL_tw_D1_11f-3_12r	/	3 dot
MGC03427	AJ626361	<i>Mytilus galloprovincialis</i> hsc71 gene for heat shock cognate 71, exons 1-6	/	3 dot
MGC03464	AJ626416	Without similarity	/	3 dot
MGC10001	AJ623880	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mitochondrion, complete genome	/	3 dot
MGC00038	AJ624419	Vdg3	/	1 wot
MGC00318	AJ623967	<i>Crassostrea gigas</i> actin (GIA) mRNA, complete cds	Actin/ actin-like; Actin	1 wot
MGC00473	AJ623981	Without similarity	/	1 wot
MGC01366	AJ516421	<i>Mytilus galloprovincialis</i> partial hsc70 gene for heat shock cognate 70, exons 4-5	/	1 wot
MGC01399	AJ625117	Without similarity	/	1 wot
MGC01563	AJ516757	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone Mg18 microsatellite sequence	/	1 wot
MGC01717	AJ623490	Without similarity	/	1 wot
MGC02047	AJ624274	<i>Mytilus galloprovincialis</i> hsc71 gene for heat shock cognate 71, exons 1-6	/	1 wot
MGC02152	AJ624440	Without similarity	/	1 wot
MGC02229	AJ624552	Without similarity	/	1 wot
MGC03002	AJ625614	Without similarity	/	1 wot
MGC03442	AJ626386	Formin Homology 2 Domain containing protein G3	/	1 wot
MGC10001	AJ623880	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mitochondrion, complete genome	/	1 wot
MGC00054	AJ624363	Myosinase-I (Fragment)	MAM; Peptidase M12A, astacin; Galactose-binding like	3 wot
MGC00670	AJ625915	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	3 wot

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MGC00694	AJ516390	Hemolectin	Gonadotropin, beta chain; Cystine knot, C-terminal	3 wot
MGC00860	AJ626420	Integumentary mucin C.1 (Fragment)	P-type trefoil	3 wot
MGC01310	AJ625403	<i>Mytilus galloprovincialis</i> heat shock protein 70 mRNA, complete cds	Heat shock protein Hsp70, Heat shock protein 70	3 wot
MGC01399	AJ625117	Without similarity	/	3 wot
MGC01546	AJ516723	LYR motif-containing protein 4	Complex 1 LYR protein	3 wot
MGC01558	AJ516741	C-myc proto-oncogene homolog protein (Fragment)	Metridin-like ShK toxin	3 wot
MGC01560	AJ516747	Peptidylglycine alpha-hydroxylating monoxygenase	Copper type II, ascorbate-dependent monoxygenase, N-terminal; Copper type II, ascorbate-dependent monoxygenase, C-terminal; Copper type II, ascorbate-dependent monoxygenase-like, C-terminal; Peptidylglycine alpha-amidating monoxygenase; Dopamine-beta-monoxygenase; PHM/PNGase F Fold	3 wot
MGC01568	AJ516764	Without similarity	/	3 wot
MGC01622	AJ516858	<i>Mytilus galloprovincialis</i> gene for twitchin, partial cds.	/	3 wot
MGC01624	AJ623451	C-myc proto-oncogene homolog (Fragment)	von Willebrand factor, type C; Metridin-like ShK toxin	3 wot
MGC01829	AJ624823	Paramyosin	Myosin tail	3 wot
MGC01858	AJ623963	Without similarity	/	3 wot
MGC01920	AJ624089	DEAD-box RNA-dependent helicase p68	ATP-dependent helicase, DEAD-box; DEAD/DEAH box helicase, N-terminal; DEAD-like helicases, N-terminal; DEAD-box RNA helicase Q motif; Helicase superfamily 1 and 2 ATP-binding	3 wot
MGC01939	AJ624116	Without similarity	/	3 wot
MGC02014	AJ624225	Without similarity	/	3 wot
MGC02074	AJ624311	Calponin-like protein	Calponin repeat	3 wot
MGC02106	AJ624353	Without similarity	von Willebrand factor, type A	3 wot
MGC02152	AJ624440	Without similarity	/	3 wot
MGC02229	AJ624552	Without similarity	/	3 wot
MGC02386	AJ624775	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	Aldehyde dehydrogenase	3 wot
MGC02414	AJ624809	Without similarity	Ankyrin	3 wot
MGC02439	AJ624846	Without similarity	/	3 wot
MGC02672	AJ625159	Without similarity	/	3 wot
MGC02980	AJ625583	Nudix (Nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2	/	3 wot
MGC03002	AJ625614	Without similarity	/	3 wot
MGC03112	AJ625780	Without similarity	/	3 wot
MGC03125	AJ625845	Without similarity	/	3 wot
MGC03210	AJ626006	C-myc proto-oncogene homolog protein (Fragment)	von Willebrand factor, type C; Metridin-like ShK toxin	3 wot
MGC03464	AJ626416	Without similarity	/	3 wot
MGC00038	AJ624419	Vdg3	/	5 wot
MGC00054	AJ624363	Myosinase-I (Fragment)	MAM; Peptidase M12A, astacin; Galactose-binding like	5 wot
MGC00160	AJ516728	Without similarity	/	5 wot
MGC00206	AJ625054	Without similarity	/	5 wot
MGC00670	AJ625915	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	5 wot
MGC01332	AJ516362	<i>Mytilus edulis</i> gene for endo-1,4-mannanase, exons 1-6	/	5 wot
MGC01389	AJ516452	Without similarity	/	5 wot
MGC01399	AJ625117	Without similarity	/	5 wot

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MGC01564	AJ516758	Without similarity	/	5 wot
MGC01622	AJ516858	<i>Mytilus galloprovincialis</i> gene for twitchin, partial cds.	/	5 wot
MGC02106	AJ624353	Without similarity	von Willebrand factor, type A	5 wot
MGC02229	AJ624552	Without similarity	/	5 wot
MGC02256	AJ624597	Without similarity	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)	5 wot
MGC02287	AJ624645	Prohibitin	Prohibitin; Band 7 protein	5 wot
MGC02386	AJ624775	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	Aldehyde dehydrogenase	5 wot
MGC02420	AJ624818	<i>Mytilus galloprovincialis</i> precollagen-P mRNA, complete cds	/	5 wot
MGC02439	AJ624846	Without similarity	/	5 wot
MGC02468	AJ624887	Without similarity	/	5 wot
MGC02672	AJ625159	Without similarity	/	5 wot
MGC02682	AJ626023	Without similarity	/	5 wot
MGC03065	AJ625700	Partial ubiquitin gene	Ubiquitin	5 wot
MGC03210	AJ626006	C-myc proto-oncogene homolog protein (Fragment)	von Willebrand factor, type C; Metridin-like ShK toxin	5 wot
MGC10018	AJ623584	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mitochondrion, complete genome	/	5 wot

### DOWN REGULATED

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>	Phase <sup>e</sup>
MGC00081	AJ624087	without similarity	/	3 dot
MGC00464	AJ625621	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	3 dot
MGC01337	AJ516372	Heavy metal binding protein precursor	Complement C1q protein; TNF-like	3 dot
MGC01342	AJ625885	without similarity	/	3 dot
MGC01578	AJ624382	F5/8 type C domain protein DW4/3-1	/	3 dot
MGC01653	AJ624509	without similarity	/	3 dot
MGC01663	AJ624501	without similarity	/	3 dot
MGC01684	AJ623565	without similarity	/	3 dot
MGC01690	AJ623418	without similarity	/	3 dot
MGC01781	AJ623767	without similarity	/	3 dot
MGC01785	AJ623772	without similarity	/	3 dot
MGC01822	AJ623838	without similarity	/	3 dot
MGC01913	AJ625569	without similarity	/	3 dot
MGC02042	AJ624271	40S ribosomal protein S28	Ribosomal protein S28e; Nucleic acid-binding, OB-fold	3 dot
MGC02118	AJ624379	without similarity	/	3 dot
MGC02286	AJ624643	without similarity	/	3 dot
MGC02335	AJ624702	Macrophage galactose-type C-type lectin 2	C-type lectin; Type II antifreeze protein	3 dot
MGC02427	AJ624829	Ribosomal protein S20	Ribosomal protein S10; Ribosomal protein S10, eukaryotic and archaeal form	3 dot
MGC02496	AJ25006	without similarity	/	3 dot
MGC02526	AJ624961	without similarity	/	3 dot
MGC02546	AJ624991	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	/	3 dot
MGC02656	AJ625133	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	O-methyltransferase, family 3	3 dot
MGC02675	AJ625322	Glucose dehydrogenase	Glucose-methanol-choline oxidoreductase, C-terminal	3 dot
MGC02685	AJ625176	without similarity	/	3 dot
MGC02692	AJ625185	without similarity	/	3 dot
MGC02749	AJ625270	without similarity	/	3 dot
MGC02764	AJ625292	without similarity	/	3 dot
MGC02803	AJ625348	Monocarboxylate transporter	Major facilitator superfamily MFS_1	3 dot

# INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>	Phase <sup>e</sup>
MGC02814	AJ625361	Elongation factor 1-alpha	Translation elongation factor EFTu/EF1A, C-terminal; Translation elongation factor EFTu/EF1A, domain 2; Translation elongation and initiation factors/Ribosomal, beta-barrel; Translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2gamma, C-terminal	3 dot
MGC02822	AJ625375	without similarity	/	3 dot
MGC02827	AJ625383	60S ribosomal protein L37a	Ribosomal L37ae protein	3 dot
MGC02918	AJ625500	without similarity	Ubiquitin system component Cue;UBA-like	3 dot
MGC02938	AJ625527	without similarity	/	3 dot
MGC02984	AJ625589	without similarity	/	3 dot
MGC02987	AJ625594	General transcription factor 3C polypeptide 1	/	3 dot
MGC02989	AJ625760	Precollagen-D	Collagen triple helix repeat; Collagen helix repeat	3 dot
MGC03069	AJ625707	without similarity	/	3 dot
MGC03228	AJ626279	without similarity	/	3 dot
MGC03302	AJ626168	without similarity	/	3 dot
MGC03358	AJ626255	without similarity	/	3 dot
MGC10025	AJ626040	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mitochondrion, complete genome	/	3 dot
MGC00081	AJ624087	without similarity	/	1 wot
MGC00464	AJ625621	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	1 wot
MGC00482	AJ624301	40S ribosomal protein S2	Ribosomal protein S5; Ribosomal protein S5, C-terminal; Ribosomal protein S5, N-terminal; Ribosomal protein S5, eukaryotic and archaeal; Double-stranded RNA-binding-like; Ribosomal protein S5 domain, 2-type fold	1 wot
MGC01578	AJ624382	F5/8 type C domain protein DW4/3-1	/	1 wot
MGC01690	AJ623418	without similarity	/	1 wot
MGC01781	AJ623767	without similarity	/	1 wot
MGC01785	AJ623772	without similarity	/	1 wot
MGC01822	AJ623838	without similarity	/	1 wot
MGC02119	AJ624380	Serine protease CFSP2	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap; Peptidase S1A, chymotrypsin; Peptidase, trypsin-like serine and cysteine	1 wot
MGC02169	AJ624465	Sea star regeneration-associated protease SRAP	Phosphotransferasesystem, HPr histidine phosphorylation site; peptidase S1A, chymotrypsin; Peptidase, trypsin-like serine and cysteine	1 wot
MGC02206	AJ624522	Trypsin (Fragment)	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap; Peptidase, trypsin-like serine and cysteine	1 wot
MGC02286	AJ624643	without similarity	/	1 wot
MGC02675	AJ625322	Glucose dehydrogenase	Glucose-methanol-choline oxidoreductase, C-terminal	1 wot
MGC02749	AJ625270	without similarity	/	1 wot
MGC02784	AJ625320	without similarity	/	1 wot
MGC02814	AJ625361	Elongation factor 1-alpha	Translation elongation factor EFTu/EF1A, C-terminal; Translation elongation factor EFTu/EF1A, domain 2; Translation elongation and initiation factors/Ribosomal, beta-barrel; Translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2gamma, C-terminal	1 wot

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>	Phase <sup>e</sup>
MGC02822	AJ625375	without similarity	/	1 wot
MGC02891	AJ625462	Cytochrome P450 2P1	Cytochrome P450; Cytochrome P450, E-class, group I	1 wot
MGC02918	AJ625500	without similarity	Ubiquitin system component Cue;UBA-like	1 wot
MGC02938	AJ625527	without similarity	/	1 wot
MGC02984	AJ625589	without similarity	/	1 wot
MGC02989	AJ625760	Precollagen-D	Collagen triple helix repeat; Collagen helix repeat	1 wot
MGC03069	AJ625707	without similarity	/	1 wot
MGC03302	AJ626168	without similarity	/	1 wot
MGC03429	AJ626363	without similarity	/	1 wot
MGC00007	AJ623636	without similarity	/	3 wot
MGC00035	AJ625778	without similarity	/	3 wot
MGC00060	AJ624093	Chitinase 1	Glycoside hydrolase, family 18, catalytic domain; Glycoside hydrolase, chitinase active site; Chitin binding Peritrophin-A, Chitinase II; Glycoside hydrolase, catalytic core	3 wot
MGC00081	AJ624087	without similarity	/	3 wot
MGC00123	AJ625789	without similarity	/	3 wot
MGC00135	AJ624548	Chymotrypsinogen 2-like protein (Fragment)	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap; Peptidase, trypsin-like serine and cysteine	3 wot
MGC00177	AJ626199	60S ribosomal protein L23a-like protein mRNA, partial cds	Ribosomal L23 protein; Ribosomal protein L23, N-terminal; Nucleotide-binding, alpha-beta plait; Ribosomal L23 and L15e, core; Ribosomal protein L25/L23	3 wot
MGC00234	AJ624460	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (strain CCE9901)	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	3 wot
MGC00464	AJ625621	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	3 wot
MGC01663	AJ624501	without similarity	/	3 wot
MGC01690	AJ623418	without similarity	/	3 wot
MGC01781	AJ623767	without similarity	/	3 wot
MGC01785	AJ623772	without similarity	/	3 wot
MGC01790	AJ626387	without similarity	/	3 wot
MGC01802	AJ626069	without similarity	von Willebrand factor, type A	3 wot
MGC01822	AJ623838	without similarity	/	3 wot
MGC01841	AJ623902	without similarity	/	3 wot
MGC01853	AJ623940	without similarity	/	3 wot
MGC01913	AJ625569	without similarity	/	3 wot
MGC01969	AJ624162	without similarity	/	3 wot
MGC01991	AJ624753	Calcectin	calcium-binding EF-hand; EF-Hand type	3 wot
MGC02117	AJ624376	Nocardicin 3-amino-3-carboxypropyl transferase subsp. tsuyamanensis	Methyltransferase type 11	3 wot
MGC02206	AJ624522	Trypsin (Fragment)	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap; Peptidase, trypsin-like serine and cysteine	3 wot
MGC02286	AJ624643	without similarity	/	3 wot
MGC02335	AJ624702	Macrophage galactose-type C-type lectin 2	C-type lectin; Type II antifreeze protein	3 wot
MGC02445	AJ625269	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma	Mov34/MPN/PAD-1	3 wot
MGC02487	AJ624910	without similarity	/	3 wot
MGC02496	AJ25006	without similarity	/	3 wot
MGC02513	AJ625130	without similarity	/	3 wot
MGC02543	AJ624987	without similarity	/	3 wot
MGC02546	AJ624991	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	/	3 wot
MGC02595	AJ625043	without similarity	/	3 wot

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>	Phase <sup>e</sup>
MGC02619	AJ625077	without similarity	/	3 wot
MGC02692	AJ625185	without similarity	/	3 wot
MGC02732	AJ625243	P53 tumor suppressor-like protein	p53 tumor antigen; p53-like transcription factor, DNA binding; tetramerisation; p53, DNA-binding; p53 and RUNT-type transcription factor, DNA-binding; cellular tumor antigen p53	3 wot
MGC02738	AJ625253	without similarity	/	3 wot
MGC02749	AJ625270	without similarity	/	3 wot
MGC02764	AJ625292	without similarity	/	3 wot
MGC02784	AJ625320	without similarity	/	3 wot
MGC02803	AJ625348	Monocarboxylate transporter	Major facilitator superfamily MFS_1	3 wot
MGC02814	AJ625361	Elongation factor 1-alpha	Translation elongation factor EFTu/EF1A, C-terminal; Translation elongation factor EFTu/EF1A, domain 2; Translation elongation and initiation factors/Ribosomal, beta-barrel; Translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2gamma, C-terminal	3 wot
MGC02822	AJ625375	without similarity	/	3 wot
MGC02891	AJ625462	Cytochrome P450 2P1	Cytochrome P450; Cytochrome P450, E-class, group I	3 wot
MGC02918	AJ625500	without similarity	Ubiquitin system component Cue;UBA-like	3 wot
MGC02937	AJ625525	Phosphatidyl choline 2-acylhydrolase cPLA2	C2 calcium-dependent membrane targetin; Lysophospholipase, catalytic region; C2 calcium/lipid-binding region, CaLB	3 wot
MGC02938	AJ625527	without similarity	/	3 wot
MGC02984	AJ625589	without similarity	/	3 wot
MGC02987	AJ625594	General transcription factor 3C polypeptide 1	/	3 wot
MGC02989	AJ625760	Precollagen-D	Collagen triple helix repeat; Collagen helix repeat	3 wot
MGC03069	AJ625707	without similarity	/	3 wot
MGC03087	AJ625734	without similarity	/	3 wot
MGC03142	AJ625884	without similarity	/	3 wot
MGC03146	AJ625892	without similarity	/	3 wot
MGC03213	AJ626014	without similarity	/	3 wot
MGC03228	AJ626279	without similarity	/	3 wot
MGC03246	AJ626064	ATP-dependent RNA helicase DDX42	/	3 wot
MGC03286	AJ626137	without similarity	/	3 wot
MGC03302	AJ626168	without similarity	/	3 wot
MGC03356	AJ626256	without similarity	/	3 wot
MGC03358	AJ626255	without similarity	/	3 wot
MGC03429	AJ626363	without similarity	/	3 wot
MGC03432	AJ626366	without similarity	/	3 wot
MGC10025	AJ626040	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mitochondrion, complete genome	/	3 wot
MGC00007	AJ624990	without similarity	/	5 wot
MGC00035	AJ625778	without similarity	/	5 wot
MGC00060	AJ624093	Chitinase 1	Glycoside hydrolase, family 18, catalytic domain; Glycoside hydrolase, chitinase active site; Chitin binding Peritrophin-A, Chitinase II; Glycoside hydrolase, catalytic core	5 wot
MGC00081	AJ624087	without similarity	/	5 wot
MGC00135	AJ624548	Chymotrypsinogen 2-like protein (Fragment)	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap; Peptidase, trypsin-like serine and cysteine	5 wot
MGC00464	AJ625621	Heat shock protein 90	Heat shock protein Hsp90; ATPase-binding region, ATPase-like	5 wot
MGC00590	AJ516636	Cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1	Cytochrome c oxidase, subunit Via	5 wot

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>	Phase <sup>e</sup>
MGC01337	AJ516372	Heavy metal binding protein precursor	Complement C1q protein; TNF-like	5 wot
MGC01342	AJ625885	without similarity	/	5 wot
MGC01578	AJ624382	F5/8 type C domain protein DW4/3-1	/	5 wot
MGC01632	AJ516882	without similarity	Collagen triple helix repeat; Collagen helix repeat	5 wot
MGC01653	AJ624509	without similarity	/	5 wot
MGC01663	AJ624501	without similarity	/	5 wot
MGC01675	AJ623384	without similarity	/	5 wot
MGC01684	AJ623565	without similarity	/	5 wot
MGC01690	AJ623418	without similarity	/	5 wot
MGC01741	AJ623568	without similarity	/	5 wot
MGC01781	AJ623767	without similarity	/	5 wot
MGC01785	AJ623772	without similarity	/	5 wot
MGC01802	AJ626069	without similarity	von Willebrand factor, type A	5 wot
MGC01822	AJ623838	without similarity	/	5 wot
MGC01841	AJ623902	without similarity	/	5 wot
MGC01853	AJ623940	without similarity	/	5 wot
MGC01913	AJ625569	without similarity	/	5 wot
MGC01966	AJ624156	Inhibitor of apoptosis 1 (Fragment)	Proteinase inhibitor I32, inhibitor of apoptosis	5 wot
MGC01969	AJ624162	without similarity	/	5 wot
MGC01991	AJ624753	Calexcitin	calcium-binding EF-hand; EF-Hand type	5 wot
MGC02117	AJ624376	Nocardicin 3-amino-3-carboxypropyl transferase subsp. tsuyamanensis	Methyltransferase type 11	5 wot
MGC02173	AJ624472	without similarity	/	5 wot
MGC02206	AJ624522	Trypsin (Fragment)	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap; Peptidase, trypsin-like serine and cysteine	5 wot
MGC02286	AJ624643	without similarity	/	5 wot
MGC02335	AJ624702	Macrophage galactose-type C-type lectin 2	C-type lectin; Type II antifreeze protein	5 wot
MGC02348	AJ624722	without similarity	/	5 wot
MGC02445	AJ625269	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 3 gamma	Mov34/MPN/PAD-1	5 wot
MGC02457	AJ624870	without similarity	PDZ/DHR/GLGF	5 wot
MGC02481	AJ625425	Hillarin	/	5 wot
MGC02513	AJ625130	without similarity	/	5 wot
MGC02526	AJ624961	without similarity	/	5 wot
MGC02546	AJ624991	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	/	5 wot
MGC02604	AJ625056	Nup205 protein (Fragment)	/	5 wot
MGC02619	AJ625077	without similarity	/	5 wot
MGC02637	AJ625103	without similarity	CHD, N-terminal	5 wot
MGC02656	AJ625133	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	O-methyltransferase, family 3	5 wot
MGC02692	AJ625185	without similarity	/	5 wot
MGC02738	AJ625253	without similarity	/	5 wot
MGC02749	AJ625270	without similarity	/	5 wot
MGC02764	AJ625292	without similarity	/	5 wot
MGC02784	AJ625320	without similarity	/	5 wot
MGC02803	AJ625348	Monocarboxylate transporter	Major facilitator superfamily MFS_1	5 wot
MGC02814	AJ625361	Elongation factor 1-alpha	Translation elongation factor EFTu/EF1A, C-terminal; Translation elongation factor EFTu/EF1A, domain 2; Translation elongation and initiation factors/Ribosomal, beta-barrel; Translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2gamma, C-terminal	5 wot
MGC02822	AJ625375	without similarity	/	5 wot
MGC02891	AJ625462	Cytochrome P450 2P1	Cytochrome P450; Cytochrome P450, E-class, group I	5 wot

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

MytiBase ID Cluster <sup>a</sup>	ID EMBL <sup>b</sup>	Description <sup>c</sup>	Functional domain <sup>d</sup>	Phase <sup>e</sup>
MGC02918	AJ625500	without similarity	Ubiquitin system component Cue;UBA-like	5 wot
MGC02937	AJ625525	Phosphatidyl choline 2-acylhrolase cPLA2	C2 calcium-dependent membrane targetin; Lysophospholipase, catalytic region; C2 calcium/lipid-binding region, CaLB	5 wot
MGC02938	AJ625527	without similarity	/	5 wot
MGC02984	AJ625589	without similarity	/	5 wot
MGC02986	AJ625593	Lysozyme II	Glycoside hydrolase, family 22	5 wot
MGC02987	AJ625594	General transcription factor 3C polypeptide 1	/	5 wot
MGC02989	AJ625760	Precollagen-D	Collagen triple helix repeat; Collagen helix repeat	5 wot
MGC03069	AJ625707	without similarity	/	5 wot
MGC03087	AJ625734	without similarity	/	5 wot
MGC03142	AJ625884	without similarity	/	5 wot
MGC03228	AJ626279	without similarity	/	5 wot
MGC03246	AJ626065	ATP-dependent RNA helicase DDX42	/	5 wot
MGC03286	AJ626136	without similarity	/	5 wot
MGC03288	AJ626139	Cholinephosphate cytidylyl transferase isoform B2	/	5 wot
MGC03302	AJ626168	without similarity	/	5 wot
MGC03358	AJ626255	without similarity	/	5 wot
MGC03429	AJ626363	without similarity	/	5 wot
MGC03432	AJ626366	without similarity	/	5 wot
MGC10006	AJ623623	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mitochondrion, complete genome	/	5 wot
MGC10025	AJ626040	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mitochondrion, complete genome	/	5 wot