

Riassunto della tesi di Dottorato di ricerca della Dott.ssa Letizia Ambrosio

Titolo: “A chemical-toxicological study of animal models exposed to organohalogen environmental contaminants”

La proteomica indica un nuovo modo di affrontare la complessità biologica mediante lo studio dell'insieme, molto complesso ma finito, di tutte le proteine di un sistema biologico, insieme che può cambiare non solo in base alla modificazione delle condizioni fisiologiche e/o patologiche, ma anche in seguito all'esposizione a xenobiotici quali farmaci o inquinanti ambientali. Le tecniche utilizzate negli studi proteomici, originariamente sviluppate per l'identificazione di biomarcatori di malattie umane e per la scoperta di nuovi farmaci, hanno suscitato notevole interesse negli studi di ecotossicologia per la loro capacità di determinare la modificazione di precisi patterns proteici negli organismi esposti a contaminanti ambientali.

L'obiettivo del presente lavoro è stato la valutazione dei cambiamenti nell'espressione proteica di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) esposti a tre policlorobifenili al fine di identificare eventuali biomarcatori molecolari di esposizione precoce attraverso un approccio proteomico.

Per raggiungere questo obiettivo 100 mitili sono stati esposti ai PCB 138,153,180 per 3 settimane in condizioni controllate a alla concentrazione di 30 µg/l. Un ugual numero di mitili è stato mantenuto nelle stesse condizioni, ma non trattato, per costituire il controllo. E' stato effettuato lo studio comparativo dei gel ottenuti dall'analisi elettroforetica bidimensionale ed i mutamenti nell'espressione proteica sono stati valutati attraverso l'analisi di immagini. Gli spot di interesse sono stati tagliati dai gel e, poi, sottoposti alla procedura di digestione con tripsina. I digeriti triptici ottenuti sono stati sottoposti ad analisi LC/MS/MS. Per l'identificazione delle proteine modello, è stato utilizzato il motore di ricerca Mascot Matrix Science e la banca dati NCBI. E' stata infine utilizzata la tecnica elettroforetica OFFGEL per la separazione dei peptidi ottenuti dagli estratti proteici dopo digestione in soluzione con tripsina, peptidi analizzati anche essi con analoghe tecniche di spettrometria di massa.

Lo studio proteomico ha portato, in media, all'analisi di circa 700 spots in ogni gel, spots che sono risultati distribuiti lungo tutto il range di pH applicato nell'esperimento e la cui morfologia è risultata uniformemente circolare o ovale. Tra tutti gli spot proteici rilevati, sono state osservate differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) tra i controlli ed i trattati nei livelli di intensità di numerose macchie proteiche. Come tendenza generale si è osservata una riduzione nei livelli di esposizione proteica in seguito all'esposizione ai PCB.

L'identificazione delle proteine si è rivelato un processo complesso in quanto sono disponibili poche informazioni sul genoma e sul proteoma della specie in esame, ed è stato pertanto necessario recuperare informazioni da fonti diverse ed è stato possibile ottenere l'identificazione di alcune delle proteine analizzate, anche grazie a studi di omologia condotti su proteine espresse da organismi tassonomicamente relazionati a *Mytilus galloprovincialis*. In tutti i casi, un parametro fondamentale per valutare l'attendibilità del risultato è stato la buona qualità degli spettri di massa ed il numero di peptidi identificati per ciascuna proteina. I risultati ottenuti con la separazione OFFGEL, sebbene siano molto promettenti relativamente alla riproducibilità dei profili cromatografici delle miscele peptidiche, non ci hanno consentito l'identificazione proteica proprio a causa della mancanza di idonei database.

I risultati ottenuti suggeriscono che le analisi di proteomica potrebbero diventare un valido strumento per l'individuazione di biomarcatori di esposizione precoce a contaminanti ambientali. Anche se non possono ovviamente essere estrapolati completamente a condizioni di esposizione reali, essi rappresentano un primo tentativo di caratterizzare le risposte dei bivalvi marini all'esposizione simultanea a differenti PCB e suggeriscono che le concentrazioni utilizzate in questo lavoro possono influire sull'espressione proteica dei mitili anche in brevi tempi di esposizione.

I cambiamenti nell'espressione proteica ottenuti e parzialmente identificati indicano che la loro principale causa è la risposta ad uno stress ossidativo e possono costituire un punto di partenza per lo sviluppo di metodi di screening per la determinazione di questi contaminanti ambientali in mitili commerciali.