



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO di SANITA' PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA e IGIENE  
VETERINARIA

SCUOLA di DOTTORATO di RICERCA in SCIENZE VETERINARIE  
INDIRIZZO di SANITA' PUBBLICA e PATOLOGIA COMPARATA  
CICLO XXIII

**RISPOSTA ALLO STRESS DA FREDDO NEI PESCI: ANALISI DEL TRASCRIPTOMA DI  
*SPARUS AURATA* (L.) ESPOSTA ALLE BASSE TEMPERATURE**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Massimo Morgante

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Mauro Da Casto

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Tomaso Patarnello

**Dottoranda:** Alba Nicoletta Mininni



*a pa-Pino*



## SUMMARY

From the second half of past century to nowadays aquaculture keeps on being the fastest-growing animal-food-producing sector, so that it has provided the 46% of total food fish supply in 2010. However, we are faced with a few problems closely connected to some aspects that are still unknown in the biology of certain relevant species such as the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Functional genomics can offer very well-grounded tools to get information about the molecular mechanisms which are involved in physiological processes whose consequences may be very high also from an economic point of view. The issue concerning how the marine organisms and populations react to climatic changes is a question of paramount importance which is still rather unsettled. The gilthead bream is very sensitive to low temperatures, so that it does not survive when temperature falls under 5°C. In fact, in winter time the breeding cause often huge economic losses to their owners since the mortality rate rises because of metabolic syndrome known as *winter disease*. In this study we considered the gene expression profiles of *Sparus aurata* individuals which have been exposed to low temperatures, in experimental conditions that could represent as realistic as possible the winter season. The gene expression profile can be used as a tool to link up the genotype to the physiology and to the phenotype. Moreover, the study looked into populations coming from regions with different climatic conditions (Veneto and Sicily), by assuming a different tolerance to cold exposition. Four groups of wild sea bream ( $120 \pm 16$  g), coming in pairs from the two regions, were exposed for 21 days to two temperature treatments:  $16 \pm 0.3$  °C (control groups) and  $6.8 \pm 0.3$  °C (cold groups). Liver and gill samples were collected during acute (0, 6 and 24 hours) and chronic exposure (21 days). The gene expression profiles were analyzed using an oligo-nucleotide microarray technology, with about 19,715 ESTs. Results revealed a complex transcriptomic response to cold with many molecular pathways involved among which: lipid and carbohydrate metabolism, regulation of heat shock proteins (HSPs) and other protein chaperones, protein degradation and repair, regulation of cell death, RNA and DNA metabolism, immune response. The earliest transcriptional response is linked to oxidative stress and anti-oxidant/survival cell response, suggesting an immediate disturbance of systemic oxygen balance. The largest transcriptional difference between cold and control groups occurred during long-term exposure, involving primarily several genes of lipid metabolism with a role in the re-allocation of energy sources and immune-related genes indicating an immunosuppressive effect of cold exposure. The data on the liver and gill transcriptome of the gilthead sea bream exposed to cold provide a starting point to investigate physiological mechanisms underlying long term cold adaptation in fish and to address future research for the identification of cold tolerant *S. aurata* strain for aquaculture.



## RIASSUNTO

Dalla seconda metà del secolo scorso ad oggi l'acquacoltura continua ad essere il settore delle produzioni animali in più rapida crescita, con il 46% di pesce fornito sul totale consumato nel 2010. Rimangono, tuttavia, problematiche strettamente legate ad aspetti ancora sconosciuti nell'ambito della biologia di alcune specie d'interesse come l'orata comune (*Sparus aurata*). La genomica funzionale può fornire validi strumenti per ottenere informazioni sui meccanismi molecolari coinvolti nei processi fisiologici importanti anche da un punto di vista economico. Come le popolazioni e le specie marine reagiscono ai cambiamenti climatici è una questione di importanza centrale ancora non del tutto risolta. L'orata comune risente fortemente del freddo, non sopravvivendo a temperature inferiori ai 5°C e spesso, durante l'inverno, gli allevamenti subiscono ingenti danni economici per l'elevata mortalità data dalla sindrome metabolica *winter disease*. In questo studio sono stati valutati i profili di espressione genica di individui di *S. aurata* esposti alle basse temperature, in condizioni sperimentali che fossero il più realistiche possibile con la stagione invernale. Il profilo di espressione genica può servire come strumento per legare il genotipo alla fisiologia e al fenotipo. Sono state, inoltre, esaminate popolazioni provenienti da regioni con condizioni climatiche diverse, Veneto e Sicilia, ipotizzando una differente tolleranza al freddo. Quattro gruppi di orate (120±16 g), provenienti a coppie dalle due regioni, sono state esposte per 21 giorni a due trattamenti di temperatura: 16 ± 0,3 °C (gruppi di controllo) e 6,8 ± 0,3 °C (gruppi dei trattati). Campioni di fegato e branchia sono stati raccolti durante esposizione acuta (0, 6 e 24 ore) e cronica (21 giorni). I profili di espressione sono stati analizzati usando un *microarray* a oligo-nucleotidi con circa 19.715 geni. I risultati hanno rivelato una risposta trascrizionale complessa per la risposta al freddo, con numerosi *pathway* coinvolti: metabolismo di lipidi e carboidrati, *heat shock protein* (HSP) e chaperoni, degradazione proteica, apoptosi, metabolismo di RNA e DNA, risposta immunitaria. La prima risposta è legata allo stress ossidativo, suggerendo un disturbo immediato del bilancio dell'ossigeno a livello sistemico, mentre le più grandi differenze trascrizionali tra trattati e controlli si rilevano durante l'esposizione a lungo termine, e coinvolgono principalmente geni del metabolismo lipidico per la redistribuzione delle riserve energetiche e geni dell'immunità per l'importante effetto immuno-soppressivo del freddo. I dati del trascrittoma di branchia e fegato di orate esposte alle basse temperature forniscono un punto di partenza per indagare i meccanismi fisiologici sottostanti l'adattamento al freddo a lungo termine nei pesci e per indirizzare ricerche future volte all'identificazione di ceppi di *S. aurata* resistenti al freddo in acquacoltura.



## INDICE

<b>1 INTRODUZIONE GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Acquacoltura: dal passato ad oggi</b>	<b>1</b>
<b>1.2 La piscicoltura: sistemi produttivi</b>	<b>2</b>
<b>1.3 La vallicoltura in Italia</b>	<b>3</b>
<b>1.3.1 Cenni storici</b>	<b>3</b>
<b>1.3.2. Caratteristiche generali e metodi di funzionamento</b>	<b>5</b>
<b>1.4 L'orata in vallicoltura</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Biologia di <i>Sparus aurata</i></b>	<b>7</b>
<b>1.6 Problematiche legate all'acquacoltura</b>	<b>9</b>
<b>1.6.1 <i>Winter disease</i> e risposta alle basse temperature in <i>Sparus aurata</i></b>	<b>9</b>
<b>1.7 La genomica funzionale al servizio dell'acquacoltura</b>	<b>11</b>
<b>1.7.1 Cos'è la genomica funzionale</b>	<b>11</b>
<b>1.7.2 Contributo della genomica funzionale alla produzione     in acquacoltura di <i>Sparus aurata</i></b>	<b>12</b>
<b>1.7.2.1 Approcci high-throughput: DNA microarray</b>	<b>13</b>
<b>1.7.2.2 Statistica e microarray</b>	<b>14</b>
<b>1.7.2.3 Studio mirato di geni candidati: chaperoni molecolari</b>	<b>15</b>
<b>1.7.2.4 Studio mirato di geni candidati: il sistema immunitario dei         teleostei</b>	<b>16</b>
<b>1.8 Scopo del lavoro</b>	<b>18</b>

<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Disegno sperimentale</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Campioni biologici ed estrazione dell'RNA</b>	<b>21</b>
<b>2.3 SAPD data base</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Esperimenti di <i>microarray</i> e analisi dei dati</b>	<b>23</b>
<b>2.4.1 Annotazione funzionale</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Validazione dei dati di <i>microarray</i> mediante <i>Real-time</i> RT-PCR</b>	<b>25</b>
<b>2.5.1 Analisi dei <i>pool</i> di fegato</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2 Controllo di omogeneità dei <i>pool</i> nei campioni di branchia</b>	<b>27</b>
<b>3 RISULTATI</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Analisi generale <i>microarray</i></b>	<b>28</b>
<b>3.2 Annotazione funzionale dei geni differenzialmente espressi</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Analisi del fegato</b>	<b>30</b>
<b>3.3.1 Analisi statistiche</b>	<b>30</b>
<b>3.3.2 Processi metabolici coinvolti nella risposta al freddo nel fegato</b>	<b>35</b>
3.3.2.1 <i>Annotazione funzionale</i>	35
<b>3.3.3 Analisi di <i>real-time</i> RT-PCR</b>	<b>37</b>
<b>3.4 Analisi delle branchie</b>	<b>41</b>
<b>3.4.1 Analisi statistiche</b>	<b>43</b>
3.4.1.1 <i>SAM a coppie tra controlli e trattati ad ogni tempo</i>	44
3.4.1.2 <i>SAM tra trattati (Sicilia e Veneto)</i>	45
3.4.1.3 <i>ANOVA a due vie (origine geografica vs trattamento)</i>	46

<b>3.4.2</b>	<b>Annotazione funzionale</b>	<b>47</b>
3.4.2.1	<i>Origini geografiche e metabolismo energetico</i>	52
3.4.2.2	<i>Basse temperature e immunodepressione</i>	53
3.4.2.3	<i>Basse temperature e angiogenesi</i>	54
3.4.2.4	<i>Stress termico e protein folding</i>	55
<b>3.4.3</b>	<b>Analisi in real-time RT-PCR</b>	<b>56</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Confronto dei dati di branchie e fegato (Veneto)</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Parte generale</b>	<b>58</b>
<b>4.2</b>	<b>Risposta al freddo in <i>Spaurs aurata</i></b>	<b>60</b>
4.2.1	<b>Risposta acuta alle basse temperature</b>	<b>60</b>
4.2.1.1	<i>Risposta allo stress ossidativo</i>	60
4.2.1.2	<i>Danno cellulare e chaperoni</i>	63
4.2.2	<b>Risposta cronica alle basse temperature</b>	<b>64</b>
4.2.2.1	<i>Tubuline</i>	64
4.2.2.2	<i>Metabolismo lipidico</i>	66
4.2.2.3	<i>Risposta immunitaria</i>	69
4.2.2.4	<i>Angiogenesi</i>	71
<b>4.3</b>	<b>Differenze nella risposta al freddo rispetto alle origini geografiche</b>	<b>72</b>
4.3.1	<b>Analisi di branchie di esemplari di <i>S. aurata</i> provenienti da due diverse regioni italiane</b>	<b>72</b>
4.3.1.1	<i>ANOVA a due vie nelle branchie di <i>S. aurata</i></i>	73

<i>4.3.1.2 SAM nelle branchie dei trattati di S. aurata provenienti da Sicilia e Veneto</i>	75
<b>4.4. Confronto tra tessuti: fegato e branchia</b>	<b>75</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>77</b>
<i>Bibliografia</i>	<i>79</i>
<i>Appendici</i>	<i>97</i>
<b>Pubblicazioni relative al progetto di ricerca</b>	<b>122</b>
<i>Ringraziamenti</i>	<i>123</i>

## **Introduzione**

### **1.1 Acquacoltura dal passato ad oggi**

L'acquacoltura viene praticata dall'uomo fin dall'antichità più remota. Reperti archeologici hanno rivelato testimonianze sull'utilizzo di tecniche per allevare pesci in zone circoscritte nell'antico Egitto già nel 2500 a.C. Allo stesso periodo risalgono le origini della carpicoltura in Cina e tracce dell'interesse per l'allevamento dei pesci si ritrovano tra i Fenici, gli Etruschi e i Romani. Il bisogno di mantenere costante nel tempo la disponibilità di specie acquatiche per scopi alimentari, liberandosi dall'incertezza delle riserve naturali, si sviluppa in modo consistente in tutta Europa durante il Medioevo.

Nel 2008 la pesca di cattura e l'acquacoltura hanno fornito a livello globale circa 142 milioni di tonnellate di pesce. Di questi, 115 milioni sono stati utilizzati per l'alimentazione umana (FAO, 2010). Sul totale del pesce consumato il settore dell'acquacoltura ha contato per circa il 46%, una percentuale leggermente più bassa di quella riportata nel *The State of World Fisheries and Aquaculture 2008* (50%), a causa di una minor produzione cinese. Essa comunque risulta in costante aumento dal 2006, in cui ha fornito il 43% del totale del pesce consumato. Dalla seconda metà del secolo scorso ad oggi l'acquacoltura continua ad essere il settore delle produzioni animali in più rapida crescita, con un rifornimento pro capite in aumento da 0,7 kg nel 1970 a 7,8 kg nel 2008, con un tasso di crescita medio annuo del 6,6 %. Se agli inizi degli anni '50 la produzione dell'acquacoltura (escluse le piante acquatiche) era meno di 1 milione di tonnellate all'anno, nel 2008 la produzione è stata di 52,5 milioni di tonnellate, con un valore di circa 98 miliardi di dollari. A livello mondiale, il pesce costituisce per più di 1,5 miliardi di persone circa il 20% della loro assunzione media pro capite di proteine animali, e per 3 miliardi di persone almeno il 15%. Il mondo dell'acquacoltura è fortemente dominato dalle regioni asiatiche, che contano per l'89 % della produzione in

termini di quantità e per il 79 % in termini di valore. Questa predominanza è dovuta principalmente alla Cina, che conta per il 62 % e il 51 % della produzione globale rispettivamente in termini di quantità e di valore.

Nel 2008, sono stati prodotti 1,8 milioni tonnellate di pesci marini, le cui specie dominanti sono il cefalo, la triglia, l'orata, il branzino, il rombo, l'halibut e il pagello.

Secondo "*The State of World Fisheries and Aquaculture*" (2008), mentre il massimo potenziale della pesca di cattura è ormai stato raggiunto, l'allevamento ittico è in continuo e rapido sviluppo.

## **1.2 La piscicoltura: sistemi produttivi**

Il termine 'acquacoltura' è riferito ad una produzione controllata. I sistemi di allevamento si suddividono in estensivo, semi-estensivo e intensivo, a seconda del tipo di alimentazione, dell'impegno esercitato dall'uomo, della densità raggiunta e, quindi, dei costi di produzione.

Nell'allevamento intensivo i pesci sono allevati in vasche di acqua dolce, salata o salmastra e vengono alimentati artificialmente. Nell'allevamento intensivo in mare aperto (maricoltura) i pesci vengono allevati in gabbie galleggianti o sommerse. Nell'allevamento estensivo il pesce è seminato allo stadio giovanile in lagune o stagni costieri e cresce con alimentazione naturale. L'allevamento semi-estensivo si ha quando l'alimentazione naturale viene integrata con quella artificiale.

### **1.3. La vallicoltura in Italia**

#### **1.3.1. Cenni storici**

E' nelle lagune dell'Alto Adriatico che, storicamente, si osserva la progressiva e lenta evoluzione di un sistema di pratiche empiriche il cui risultato finale è stato lo sviluppo della vallicoltura, una forma di allevamento estensivo del pesce (Bullo, 1940). L'uomo ha iniziato ad "intercettare" il flusso ittico, accogliendolo in fase di "montata" e trattenendolo poi in quello di "smontata" (Ravagnan, 1992). Probabilmente già in epoca pre-romana le valli venivano in qualche modo utilizzate a tal fine. Quest'attività si è poi venuta ad affermare con la Repubblica Veneta a partire dal 1515-1520, ed è rimasta sostanzialmente invariata fino agli anni 1950-1960. Inizialmente esistevano solo "valli aperte", parte integrante del sistema lagunare e caratterizzate da bassi fondali costantemente coperti dall'acqua, dove venivano esercitati diritti esclusivi di pesca. Il passaggio successivo fu la chiusura temporanea di queste aree lagunari con sbarramenti fatti di pali di legno. Gli sbarramenti permettevano la montata naturale degli avannotti mentre impedivano l'uscita dei pesci una volta cresciuti.

La vallicoltura è rimasta, sostanzialmente, quella delle origini, sia per la sua struttura che per il suo funzionamento e la sua produttività: un sistema di piscicoltura strettamente correlato all'approvvigionamento di novellame derivante dalla pesca e biologicamente dipendente dall'ambiente marino.

La vallicoltura italiana è un'attività peculiare che nasce in funzione dei grandi sistemi di laguna del Nord Adriatico, creati dai due più grandi bacini idrografici italiani (i fiumi Po e Adige), e copre una superficie totale di circa 36.323 ha (26.615 come superficie totale d'acqua) divisi in 92 "valli da pesca", con una superficie che varia da 10 a 10.000 ha (Cataudella et al., 2001). Questi habitat comprendono le valli di Comacchio, la laguna di Caleri, l'intera laguna veneta (Chioggia, Venezia, Jesolo, Caorle e Bibione, Lignano) e la laguna di Grado. La vallicoltura costituisce un patrimonio ecologico

paesaggistico e culturale, e contribuisce alla conservazione del delicato ecosistema delle zone umide del Nord Adriatico, costantemente minacciate dagli impatti negativi delle molteplici attività antropiche (Marino et al., 2005). La vallicoltura conta circa il 66% delle zone umide usate per la piscicoltura e circa l'87% delle unità operative estensive in Italia, fornendo circa il 70% della produzione di acquacoltura proveniente da lagune costiere. Le valli sono tradizionalmente sistemi estensivi (solo 11 hanno anche strutture semi-intensive e 3 intensive), con una produzione che varia da 30 kg/ha/anno (Valli di Comacchio) a 150 kg/ha/anno (Valli Venete). Tradizionalmente vengono allevate specie eurialine, come branzino, orata, mugilidi e anguilla; oggi, però, la tipologia delle produzioni è cambiata, in quanto c'è una forte riduzione della produzione di anguille in favore di orata e branzino. Attualmente la produttività della vallicoltura è molto ridotta, principalmente per il forte impatto degli uccelli ittiofagi, in particolare sugli stadi giovanili, e delle attività antropiche che insistono sull'area costiera. Dati i costi di produzione molto elevati rispetto ai sistemi marini intensivi, la sostenibilità economica della vallicoltura dipende dal miglioramento dei cicli produttivi e dalla differenziazione del prodotto.

Negli ultimi anni, una maggior attenzione per i rischi ambientali dell'eutrofizzazione inerenti ai sistemi di produzione intensivi nelle aree costiere e l'aumento della domanda da parte dei consumatori sulla sicurezza alimentare e sul benessere delle specie allevate hanno riportato alla ribalta i prodotti di acquacoltura estensiva e semi-estensiva. Tuttavia, i costi di produzione dei sistemi di allevamento estensivo e semi-estensivo sono spesso incompatibili con le attese di un'attività economica sostenibile nel contesto attuale, dal momento che agli elevati costi dei terreni e del lavoro corrisponde anche una bassa produttività di questi sistemi.

### 1.3.2. Caratteristiche generali e metodi di funzionamento

Esiste una serie di bacini che si estendono dal delta del fiume Po al confine tra Veneto ed Emilia Romagna a Sud e fino alla laguna di Grado in Friuli a Nord. In questa vasta area geografica del nord-est italiano trovano sede le “valli da pesca”. Questa espressione racchiude in sé entità produttive molto differenti sia per le caratteristiche intrinseche dell’ecosistema in cui sono state create, sia per l’intensità con cui l’uomo ha modificato il territorio. Sono presenti, infatti, valli caratterizzate da terreno argilloso di bassa o alta profondità e valli con terreno sabbioso. Una caratteristica che accomuna tutte le valli del nord-est e le differenzia da quelle presenti in sud Italia o nelle isole è quella di essere valli a clima freddo.

Un’altra importante caratteristica di queste realtà produttive è che in esse si pratica la policoltura. Generalmente sono allevate le seguenti specie: orata (*Sparus aurata*), branzino (*Dicentrarchus labrax*), lotregano (*Liza auratus*), bosega (*Chelon labrosus*), volpina (*Mugil cephalus*), verzellatta (*Liza saliens*), caostello (*Liza ramado*), anguilla (*Anguilla anguilla*) e passarin (*Platichthys flesus luscus*).

Nei bacini di acqua salmastra la temperatura si innalza precocemente rispetto alla fascia litoranea di mare antistante e, all’inizio della primavera, il pesce entra nei bacini salmastri in cerca di cibo e di migliori condizioni ambientali. Successivamente, con il trascorrere dell’estate e l’approssimarsi dell’autunno, la temperatura comincia a scendere e nuovamente i bacini di acqua salmastra subiscono per primi il decremento della temperatura. Questa nuova condizione spinge il pesce a tornare in mare dove, recandosi in zone con profondità elevate, troverà nuovamente una condizione di temperatura migliore per la propria omeostasi. Questo fenomeno è da attribuirsi alla natura eteroterma del pesce e alla presenza di condizioni ottimali in laguna durante la primavera soprattutto per le fasi giovanili di molte specie ittiche eurialine.

L'attività di pesca nelle valli è effettuata utilizzando principalmente il lavoriero. Nel lavoriero tradizionale particolari incannicciate, infisse nel fondo lagunare e sostenute da un'intelaiatura di pali e pertiche, delimitano un perimetro cuneiforme nel quale una serie di bacini triangolari, comunicanti fra loro, consentono la cattura differenziata del pesce. Nel corso del tempo, dal lavoriero primitivo di canna si è passati a quello moderno in cemento e metallo, più facile e rapido da costruire.

In autunno, quando si instaurano le condizioni favorevoli alla pesca, l'acqua del mare viene fatta entrare in valle. L'istinto riproduttivo stimola gli individui sessualmente maturi delle valli a risalire le correnti di acque marine affluenti, più calde e ossigenate di quelle vallive, per raggiungere il mare. Nella sua migrazione il pesce s'imbatte nei lavorieri allestiti nelle stazioni di pesca e, qui, il cannicciato del lavoriero, spesso fino a trenta centimetri, ne impedisce la fuga.

Altre strutture che rivestono particolare importanza per la continuità dell'allevamento vallivo sono quelle per la stabulazione dei pesci: si tratta delle peschiere di sverno, bacini dove i pesci introdotti all'inizio della primavera, che non hanno ancora raggiunto la taglia adatta per essere immessi sul mercato, vengono tenuti durante l'inverno. Questi bacini presentano una profondità maggiore rispetto alla valle e, grazie a tale caratteristica, la temperatura dell'acqua sul fondo rimane più alta, consentendo ai pesci di superare la stagione fredda.

Il ciclo di allevamento dura da un minimo di uno/due anni per l'orata, fino ad un massimo di cinque/sei per il cefalame. Finché l'intera alimentazione è affidata all'ambiente, senza interventi né diretti come la somministrazione di alimento, né indiretti come trattamenti di concimazione e aratura delle valli in secca, si tratta di un allevamento di tipo prettamente estensivo. Con questo tipo di impianto si possono produrre dagli ottanta ai centocinquanta chilogrammi di pesce per ettaro.

#### **1.4 L'orata in vallicoltura**

L'orata è uno dei pesci più pregiati allevati nelle valli. I motivi per cui il mercato gradisce particolarmente questo prodotto risiedono senza dubbio nella qualità e nella prelibatezza delle sue carni, caratteristiche per cui l'orata rappresenta un capitolo economicamente significativo e importante all'interno di una valle da pesca.

La percentuale di sopravvivenza dell'orata alla fine del primo anno di allevamento risulta superiore al 50 %, mentre alla fine del secondo anno sono normali valori del 95% (Ravagnan, 1988). Queste percentuali sono da riferirsi a condizioni di svernamento ottimali e a pesci che hanno già raggiunto un peso di circa 200 grammi. In caso di inverni con temperature molto rigide le percentuali di mortalità al primo anno possono essere del 60 % (Ravarotto, 2005).

L'orata raggiunge la taglia commerciale (300-400 grammi) a partire dal secondo anno di allevamento. Tuttavia, l'allevamento dell'orata in valle è fortemente condizionato dalla scarsissima resistenza alle basse temperature di questo pesce. Un corretto svernamento diventa, quindi, fondamentale per il conseguimento di buoni risultati economici.

#### **1.5 Biologia di *Sparus aurata***

L'orata comune (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) è un teleosteo marino appartenente alla famiglia degli Sparidi, la cui distribuzione è 62°N- 15°N, 17°W - 43°E. Si ritrova naturalmente nel Mar Mediterraneo, raramente nel Mar Nero, e nell'Atlantico orientale, dalle Isole Britanniche allo Stretto di Gibilterra a Capo Verde e intorno alle Isole Canarie (Froese and Pauly, 2006). I teleostei sono ectotermi e la temperatura dell'acqua influenza enormemente la loro fisiologia, il loro comportamento e la loro salute.

Gli Sparidi sono di grande importanza per i settori della pesca e dell'acquacoltura, essendo un eccellente alimento, con un elevato valore commerciale. L'orata viene catturata con attrezzature sportive e, a volte, con sistemi semi-professionali (Spagna,

Sicilia, Egitto, Cipro), in quanto sono comunemente usati reti a strascico e palangari di fondo. Questa specie è regolarmente presente sui mercati del Mar Adriatico, in Grecia, Turchia e tutto il Maghreb. Viene commercializzata fresca, refrigerata e congelata.

L'orata si ritrova sia su fondali sabbiosi che rocciosi e su praterie di alghe (*Posidonia oceanica*), comunemente ad una profondità di circa 30 metri, ma gli adulti raggiungono anche 150 metri. I giovani sono gregari, mentre gli esemplari più grossi tendono a divenire solitari. Nei suoi spostamenti giornalieri tende a seguire sempre le stesse rotte. E' una specie eurialina e, quindi, tollera variazioni anche notevoli del grado di salinità, pur non adattandosi ad ambienti acquatici del tutto dolci. Resiste a temperature che possono raggiungere anche i 32-33°C, mentre risente fortemente del freddo, non sopravvivendo a temperature inferiori ai 5°C (Ravagnan, 1992). All'inizio della primavera si sposta verso le acque costiere protette in cerca di cibo più abbondante e temperature più miti (migrazione trofica). Nel tardo autunno ritorna in mare aperto per la riproduzione. E' principalmente carnivora (molluschi, inclusi mitili e ostriche) e, occasionalmente, erbivora (Froese and Pauly, 2006).

L'orata è una specie ermafrodita proterandria: sviluppa gli elementi maschili nei primi due anni d'età (possono corrispondere ad una lunghezza approssimativa di 20-30 cm) e poi quelli femminili, dopo aver raggiunto 33-40 cm di lunghezza e 3 anni di età.

Gli individui di sesso femminile depongono le uova più volte nella stagione riproduttiva e possono depositare tra le 20000 e le 80000 uova ogni giorno per un periodo di 4 mesi.

Invero, il percorso di inversione da maschio a femmina non è del tutto chiaro, cosicché l'evoluzione di ciascun esemplare non è facile da predire. Peraltro sembra che non tutti i maschi di orata siano soggetti allo stesso modo al fenomeno dell'inversione sessuale, in quanto in alcuni risulta assente. I meccanismi che sottendono a questo fenomeno sono tuttora ignoti, anche se è probabile che questo avvenga in relazione a fattori genetici,

ambientali e sociali (Meiri *et al.*, 2002) che possono essere sfruttati per ottimizzare il rapporto maschi/femmine dei riproduttori in acquacoltura.

## **1.6 Problematiche legate all'acquacoltura**

### **1.6.1 *Winter disease* e risposta alle basse temperature in *Sparus aurata***

*Winter disease* o *winter stress syndrome* è un'espressione coniata da Lemly (1993) per indicare un disordine metabolico che insorge durante i mesi invernali nei pesci di acqua temperata. La sindrome si sviluppa quando, in concomitanza dell'abbassamento della temperatura e dell'accorciamento del fotoperiodo nel tardo autunno, e dell'aumento del fabbisogno energetico dato da *stressor* esterni, gli animali riducono la loro attività e l'assunzione di cibo. Per questo motivo, il rallentamento stagionale dell'attività metabolica dei pesci è in netto contrasto con gli sforzi fisiologici necessari per far fronte ai fattori di stress. Se l'elevata domanda metabolica per affrontare condizioni di stress persiste, i lipidi necessari all'organismo per superare l'inverno vengono esauriti e si determina un peggioramento della condizione fisica che può portare alla morte degli animali (Lemly, 1996).

La stagione invernale, particolarmente fredda nelle regioni del Nord Italia, dove viene allevata l'orata in vallicoltura, favorisce l'insorgenza di tale patologia. Cambiamenti improvvisi di temperatura, così come temperature al di fuori dei *range* di tolleranza delle specie, scatenano una serie di risposte, a livello cellulare e dell'intero organismo, che determinano una cascata di eventi che portano alla *winter stress syndrome*. Tuttavia, non è ancora ben noto il meccanismo sottostante l'intero processo e la precisa eziologia di tale patologia.

In molti Paesi europei le produzioni semi-intensive ed estensive di *Sparus aurata* vengono significativamente danneggiate dalla *winter stress syndrome* con ingenti danni economici (Ravagnan *et al.*, 1992; Tort *et al.*, 1998). Quando la temperatura dell'acqua

scende al di sotto degli 8°C, nell'orata comune si verificano focolai di *winter disease* (Ravagnan et al., 1992; Barnabé, 1990). Questa sindrome colpisce generalmente esemplari alla fine del loro primo anno d'età nel periodo che intercorre tra l'inverno e la primavera, causando mortalità cronica durante i mesi più freddi; mentre si verificano episodi di mortalità acuta quando la temperatura aumenta all'inizio della primavera (Bovo et al., 1995; Tort et al., 1998; Domenéch et al., 1997; Sarusic et al., 1999; Gallardo et al., 2003). In Spagna e Portogallo il tasso di mortalità riportato è del 30% (Domenech et al., 1997), mentre nel Nord Italia viene riportato il record di mortalità che raggiunge il 60% (Ravarotto et al., 2005).

Oltre la *winter disease* nell'orata, le modifiche metaboliche della risposta al freddo e ad altri fattori di stress rimangono una questione rilevante nella biologia dei pesci. Negli ultimi anni sono state acquisite nuove conoscenze riguardo questa materia, in particolare in merito all'ipossia (Ju et al., 2007), allo stress da confinamento (Krasnov et al., 2005), allo shock da caldo (Podrabsky and Somero, 2004; Gollock et al., 2006; Kassahn et al., 2007; Perez-Casanova et al., 2008; Feidantsis et al., 2009), allo shock/stress da freddo (Johnston, 1990; Ju et al., 2002; Bouchard and Guderley, 2003; Gracey et al., 2004; Guderley, 2004; Tort et al., 2004; Lamarre et al., 2009). In molti casi l'applicazione di nuove tecnologie, come lo studio del profilo di espressione mediante l'analisi microarray, ha permesso di ottenere informazioni sull'intero trascrittoma sotto diverse condizioni fisiologiche (Miller and Maclean, 2008).

## **1.7 La genomica funzionale al servizio dell'acquacoltura**

### **1.7.1 Cos'è la genomica funzionale**

Tutti gli esseri viventi portano nel loro genoma istruzioni ben precise sulla loro struttura, crescita e funzione attraverso l'esatta sequenza dei geni contenuti nel DNA di ogni cellula. La genomica funzionale comprende un insieme di tecnologie che hanno proprio lo scopo di identificare le relazioni funzionali tra un particolare genotipo e una determinata condizione patologica, e di stabilire come i geni si concertano per controllare lo sviluppo e il funzionamento dell'intero organismo. Infatti, la genomica funzionale rappresenta lo studio della vita cellulare nei suoi diversi livelli, e cioè nelle complesse interazioni tra le molte componenti del sistema.

La nascita della genomica è recente; solitamente si fa risalire al sequenziamento del primo genoma completo, le 5.375 bp del fago PHI-X174, avvenuto nel 1977 (Sanger et al., 1977) . Da quel momento la genomica ha subito uno sviluppo esponenziale contando ai giorni nostri oltre 2.000 genomi procarioti e poco più di 200 genomi eucarioti completi o quasi completi, e altrettanti in fase di sequenziamento (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>).

La genomica funzionale ha lo scopo di individuare quale gene è responsabile di un determinato cambiamento/carattere fenotipico, permettendo di capire i meccanismi di controllo molecolare dei processi biologici e fisiologici, della risposta alle patologie e agli stimoli ambientali, attraverso la comprensione della funzione di ciascun gene e di come esso viene regolato e interagisce con gli altri.

### **1.7.2 Contributo della genomica funzionale alla produzione in acquacoltura di *Sparus aurata***

L'acquacoltura rimane un settore produttivo in crescita, che ha come prodotto finale un cibo ad alto contenuto proteico, importante per la salute umana. L'applicazione della genomica e delle altre "omics", può offrire un notevole contributo al miglioramento del benessere animale e alla comprensione dei processi biologici che determinano le caratteristiche fenotipiche importanti in acquacoltura (tasso di crescita, suscettibilità a patologie, risposte fisiologiche a determinati stress ambientali, ecc.), sia dal punto di vista economico che qualitativo.

La genomica funzionale, in particolare nei suoi approcci "whole-genome" allo studio delle interazioni tra i geni e l'ambiente circostante, offre nuove opportunità per raggiungere questo obiettivo.

Negli ultimi anni hanno avuto un forte sviluppo studi di genetica e genomica su specie ittiche modello, quali *zebrafish* (*Danio rerio*, Teh *et al.* 2005), *tetraodon* (*Tetraodon nigroviridis*; Crollius, 2006) e *fugu* (*Takifugu rubripes*; Clark *et al.* 2001). Recentemente i genomi di altre due specie di teleostei --*stickleback* (*Gasterosteus aculeatus*) e *medaka* (*Oryzias latipes*, Takeda *et al.* 2008)-- sono stati interamente sequenziati (<http://www.ensembl.org>). Il rapido sviluppo della genomica funzionale nelle specie ittiche modello apre la strada a validi studi di tipo comparativo; in questo modo è ora possibile la caratterizzazione di specie non modello, ma di forte interesse economico, come l'orata.

Nel caso dell'orata è stato sviluppato un primo *array* a cDNA da Sarropoulou *et al.* (2005), più di recente un secondo *microarray* a cDNA (Calduch-Giner *et al.*, 2010) basato su tecnologia SSH (*suppression subtractive hybridization*) per studiare la risposta allo stress nel fegato dopo confinamento. La tecnologia a oligo-DNA è stata recentemente impiegata per sviluppare un nuovo *microarray* di *S. aurata* basato su

19.734 trascritti unici (Ferraresso et al., 2008) per investigare i profili di espressione di orata a diversi stadi di sviluppo.

Il progetto europeo *Bridgemap* ha permesso di ottenere circa 200 microsatelliti e 3000 EST (*Expressed Sequence Tag*) per *Sparus aurata* (<http://www.bridgemap.tuc.gr>). L'identificazione di EST in organismi di cui non è ancora stato interamente sequenziato il genoma, permette di trovare e caratterizzare nuovi geni.

A partire dal 2004, altri due progetti europei --*Marine Genomics Europe* (MGE) (<http://www.marine-genomics-europe.org>) e *Aquafirst* (<http://aquafirst.vitamib.com>) -- si sono posti l'obiettivo di rendere il genoma di orata come uno dei meglio annotati tra le diverse specie di teleostei, oltre le specie modello.

Attraverso i dati prodotti nel progetto MGE, è stato completato il sequenziamento di EST con più di 18.000 EST da diversi tessuti di orata, in cui sono stati identificati centinaia di SNP (*single nucleotide polymorphism*) e SSR-EST (*sequences containing tandem repeat*).

I marcatori molecolari selezionati all'interno del progetto *Bridgemap* hanno determinato lo sviluppo di una mappa genetica di *linkage* di prima e seconda generazione (Franch *et al.* 2006) e una mappa di ibridi di radiazione (RH, *Radiation Hybrid*) di prima (Senger *et al.*, 2006) e seconda generazione (Sarroupolou *et al.*, 2007).

#### 1.7.2.1 Approcci high-throughput: DNA microarray

Lo studio dei profili di espressione genica mediante la tecnologia *microarray* è tra le tecnologie maggiormente utilizzate nella branca della genomica funzionale. I *microarray* a DNA possono essere descritti come una serie ordinata di frammenti di acidi nucleici noti posizionati su un supporto solido e che fungono da “*detector*” molecolari. Su tali *slide* vengono ibridate in modo specifico molecole di DNA o RNA

fluorescenti e così è possibile identificare e quantificare simultaneamente un numero elevatissimo di molecole di RNA o DNA (Ramsay 1998; Schena *et al.* 1998).

Questa tecnologia fornisce nuove informazioni che prima non era possibile ottenere con approcci molecolari ma meno globali. Ad oggi, i *microarray* vengono utilizzati per diversi scopi tra cui *Comparative Genomics Hybridization* (CGH) (Oostlander *et al.* 2004), ChIP-on-CHIP (Nègre *et al.* 2006), *genotyping* (Hacia 1999) e quantificazione di microRNA (Yin *et al.* 2008); tuttavia, la loro principale applicazione rimane l'analisi dell'espressione genica su larga scala.

I *microarray* per lo studio dei profili di espressione possono essere fabbricati mediante lo spottaggio di cloni di cDNA o prodotti di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o mediante la sintesi, direttamente sul supporto, di oligonucleotidi.

Tale metodica permette di analizzare contemporaneamente migliaia di geni, identificando i profili di espressione che caratterizzano particolari condizioni fisiologiche o sperimentali (es. la risposta alle basse temperature). In breve tempo questa tecnologia ha avuto uno sviluppo esponenziale portando alla progettazione e applicazione di piattaforme *microarray* per quasi 20 diverse specie di teleostei (Miller *et al.* 2008) appartenenti a 3 diversi ordini (*Ostariophysi*, *Protacanthopterygi*, *Acanthopterygi*).

#### 1.7.2.2 Statistica e microarray

Senza una misura dell'errore non ci sono basi per l'inferenza statistica (Kerr & Churchill 2001). Dal momento che le differenze tra campioni di RNA sono la caratteristica principale dell'esperimento stesso, risultano necessarie le repliche tecniche. Negli esperimenti di *microarray* la varianza tecnica è prodotta da componenti sia casuali che sistematici. I fattori casuali che contribuiscono alla varianza tecnica

includono le differenze tra spot ripetuti all'interno di una *slide* ibridata e tra diverse *slide* (Kerr & Churchill 2001; Churchill 2002).

Se i singoli campioni vengono mescolati in *pool*, per ridurre la variabilità individuale, sono necessarie repliche biologiche di *pool* indipendenti tra loro (costituiti da singoli campioni diversi a seconda dei *pool*) per l'inferenza statistica tra gruppi (Kendziorski *et al.* 2003, 2005). Differenze inter-individuali nell'espressione genica sono state misurate nell'uomo, nel topo e nei pesci. Ci si aspetta che la variazione sia minima tra individui geneticamente identici e che aumenti tra individui geneticamente più distanti (Whitthead & Crawford, 2006). Apparentemente, all'interno della popolazione la variazione di espressione è ampia ed essa ha una vasta componente genetica (Gibson & Weir 2005). Ma, anche con una grande variazione tra individui, le differenze tra gruppi sperimentali, come uno stato patologico o l'esposizione ad una fonte di stress, sono rilevabili applicando un appropriato disegno sperimentale e statistico (Whitthead & Crawford, 2006).

#### 1.7.2.3 Studio mirato di geni candidati: chaperoni molecolari

La corretta struttura tridimensionale di una proteina è essenziale per la sua funzione. Un difetto nel ripiegamento produce una proteina inattiva che di solito è tossica. A garantire il corretto ripiegamento di una proteina durante condizioni di stress come l'esposizione a stress termico, ai metalli pesanti, all'ipossia e alle tossine, vi sono molecole note come chaperoni (Werner *et al.*, 2006).

In particolare, *heat shock protein 70* (HSP70) gioca un ruolo fondamentale nell'adattamento alle temperature ed è stato proposto per essere un indicatore di stress cellulare (Beg *et al.*, 2010). Le *heat shock protein* hanno un ruolo nella riparazione del danno cellulare e forniscono alle cellule la protezione da ulteriori danni (Sanders 1993; Varo *et al.*, 2002).

Sia basse che alte temperature determinano stress cellulare, metabolismo anaerobio, proteine danneggiate o mal ripiegate e, quindi, l'induzione dei chaperoni molecolari (Chen et al., 2008, Feidantsis et al., 2009, Kyprianou et al., 2010). In particolare, nei pesci antartici è stata riportata un'espressione costitutiva del gene hsp70, probabilmente in risposta alla continua esposizione a temperature sotto zero.

#### 1.7.2.4 Studio mirato di geni candidati: il sistema immunitario dei teleostei

La risposta immunitaria innata è un sistema di difesa primitivo esistente sia nelle piante che negli animali. Nei teleostei è un sistema complesso composto di una triplice componente: parametri fisici (scaglie, pelle,branchie e mucose), componente cellulare (cellule fagocitiche e citotossiche non specifiche) e umorale (transferrina, interferone, lisozima, sistema del complemento, opsonine, pentraxine, citochine e chemochine) (Magnadottir, 2006). Come nei mammiferi, anche nei pesci lo stress è considerato tra i principali fattori responsabili dell'alterazione delle risposte immunitarie innate e acquisite (Ellis, 1981; Harris & Bird, 2000). Le branchie dei teleostei, pur essendo esposte all'ambiente esterno, risultano protette da meccanismi umorali e cellulo-mediati poiché sono sede del MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) (Hart et al., 1988) e costituiscono la prima barriera contro i patogeni (Abelli et al., 1997). Il sistema di attivazione del complemento è il principale sistema umorale dell'immunità innata (Nakao et al., 2011). E' responsabile di numerosi meccanismi di difesa tra cui l'eliminazione dei patogeni, la promozione della risposta infiammatoria, la produzione di anticorpi, la fagocitosi (Walport, 2001; Le Friec & Kemper, 2009). Nei mammiferi è costituito da più di 30 proteine plasmatiche e proteine di membrana che si attivano in cascata attraverso tre diversi *pathway*: la via di attivazione classica, la via alternativa e la via della lectina. Questo sistema è molto conservato e si ritrova in tutti i vertebrati, tra cui i teleostei. Da un punto di vista funzionale il componente centrale del sistema del

complemento è C3, sintetizzato nel fegato ma espresso anche in altri tessuti come pelle, intestino e branchie (Løvoll et al., 2007).

Dati in letteratura riportano che i teleostei possiedono componenti e funzioni non osservate nei mammiferi (Aoki *et al.* 2008) suggerendo, quindi, un certo grado di diversità e di complessità nella funzione del sistema immunitario innato dei pesci. L'analisi di EST può permettere l'identificazione di geni coinvolti nella risposta immunitaria sulla base di geni noti e strutturalmente correlati in altre specie.

## 1.8 Scopo del lavoro

I sistemi di acquacoltura tradizionali estensivi e semi-intensivi nel Sud Europa si trovano ad affrontare diverse difficoltà, dovute specialmente all'aumentata competizione per le aree costiere e per i mercati, innescata dai bassi prezzi dei prodotti provenienti dall'acquacoltura intensiva. Tra gli effetti positivi dell'acquacoltura estensiva e semi-intensiva nelle aree costiere vanno segnalati la protezione ambientale e il ripristino di aree di particolare interesse ecologico, nonché l'opportunità di occupazione e lo sviluppo nelle zone rurali e costiere. Ecco perché essi sono stati chiaramente riconosciuti come obiettivi specifici all'interno delle politiche dell'Unione Europea.

La genomica funzionale, incrementando la conoscenza dei meccanismi molecolari responsabili di caratteristiche fenotipiche di forte interesse economico e qualitativo in acquacoltura, offre la prospettiva di rivoluzionare e rendere più efficiente questo settore. Il lavoro di questo triennio di dottorato è coinciso con il *Task 2.3* del progetto europeo SEACASE (*Sustainable extensive and semi-intensive coastal aquaculture in Southern Europe*), che aveva l'obiettivo di chiarire le basi molecolari della risposta allo stress da freddo in *Sparus aurata*, per distinguere individui che rispondessero diversamente (*high performing* e *low performing*), identificare geni candidati come marcatori genetici per l'adattabilità alle basse temperature ed esaminare popolazioni con origini termiche differenti, per verificare eventuali differenze nei limiti minimi di tollerabilità al freddo.

In questo lavoro, esemplari di orata provenienti da due regioni italiane (Veneto e Sicilia) con climi differenti, sono stati esposti alle basse temperature. E' stata utilizzata la piattaforma *custom-microarray* a oligo-DNA precedentemente validata da Ferrarese et al. (2008) per eseguire analisi di espressione genica di campioni di fegato e branchia durante il corso dell'esperimento. Lo scopo del presente studio è di fornire conoscenze

di genomica funzionale sulla risposta allo stress da freddo e l'adattabilità alle basse temperature in *S. aurata*.

Una miglior comprensione dei meccanismi molecolari sottostanti la risposta allo stress da freddo permette di sviluppare strumenti genetici per migliorare la produttività di orata in acquacoltura semi-intensiva ed estensiva attraverso l'identificazione di ceppi resistenti al freddo.

Tutto ciò contribuisce a migliorare l'immagine dell'acquacoltura come un'attività compatibile con l'ambiente, con prodotti di alta qualità, sani, sicuri e ottenuti senza costi aggiuntivi per l'ambiente.

## 2 Materiali e metodi

### 2.1 Disegno sperimentale

La parte sperimentale è stata condotta nel Centro Sperimentale di Acquacoltura di Veneto Agricoltura, presso Valle Bonello (Rovigo) da gennaio a marzo 2008.

Orate comuni autoctone sono state catturate a Valle Bonello e distribuite in modo casuale in due vasche circolari di 5 m<sup>3</sup> di volume con acqua di ricircolo (250 animali per ognuna) e acclimatate per due mesi a 16 °C. Orate comuni provenienti da una salina di Marsala (Sicilia) sono state anch'esse distribuite in due vasche e acclimatate durante lo stesso periodo (tab.1). Il peso medio degli animali era 120±16 g e la lunghezza media 21±1 cm. Sono stati applicati due trattamenti di temperatura: i gruppi di controllo sono stati tenuti a 16± 0.3 °C, mentre i gruppi trattati sono stati tenuti a 6,8± 0.3 °C; tutti i gruppi sono stati tenuti a digiuno. Le condizioni di temperatura calda e fredda dell'acqua sono state mantenute fornendo alle vasche due distinti sistemi di ricircolo equipaggiati con filtri meccanici e biologici. Durante il trattamento, dal primo al 21esimo giorno, i pesci dei gruppi "trattati" sono stati esposti alle basse temperature secondo il seguente profilo termico. Le condizioni di freddo sono state raggiunte inducendo due diminuzioni consecutive di temperatura:

Prima diminuzione: la temperatura dell'acqua è stata gradualmente raffreddata da 16 °C a 12 °C alla velocità di 1°C al giorno.

Seconda diminuzione: la temperatura dell'acqua è stata raffreddata da 12 °C a 6,8 °C in un giorno. Quest'ultima temperatura è stata tenuta costante per tre settimane (21 giorni). Nelle vasche di controllo la temperatura è stata mantenuta a 16± 0.3 °C per tutto l'esperimento.

Le analisi effettuate nel presente lavoro sono state condotte su 144 pesci (80 dal Veneto e 64 dalla Sicilia), campionati ai seguenti intervalli di tempo: 0 h, 6 h, 24 h e 21d. 0h è il

tempo in cui si completa la “seconda diminuzione” e la temperatura raggiunge 6,8 °C. Ad ogni tempo sono stati raccolti 10 individui per vasca per le orate venete e 8 per le orate siciliane. Questo schema di campionamento serve a valutare la risposta acuta (a breve termine) e quella cronica (a lungo termine) di *S. aurata* alle basse temperature.

<b>Origine</b>	<b>Latitudine</b>	<b>Range Temperatura (°C)</b>
Orate selvatiche da Valle Bonello (RO, Veneto)	44°57 N	2-27
Orate selvatiche dalla Laguna di Marsala (TP, Sicilia)	37°48 N	8-30

**Tabella 1** latitudini e intervalli di temperatura delle regioni di provenienza delle due popolazioni di *S. aurata*.

## 2.2 Campioni biologici ed estrazione del RNA

Gli esemplari di orata campionati sono stati anestetizzati trasferendoli in una vasca con acqua salata e MS222 (tricaina metano sulfonato, 300 mg/l). L'eutanasia è stata effettuata per recisione della spina dorsale. Sono stati raccolti campioni di fegato e di branchia (~ 30 mg) ad ogni tempo (0h, 6h, 24h, 21d), conservati in RNA *later* a 4 °C per 24 h e poi conservati a -20 °C.

Per ogni tempo di campionamento, è stato estratto l'RNA totale dai singoli campioni di tessuto (~15 mg) dei 18 individui dei gruppi trattati e dei 18 individui dei gruppi di controllo (10 Veneto+8 Sicilia) usando l'*RNAeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). La concentrazione di RNA è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica con lo strumento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). L'integrità e la qualità del RNA sono state valutate con l'utilizzo del Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) e l'RNA *integrity number* (RIN) è stato calcolato per ogni campione utilizzando il software Agilent 2100 Expert. Il RIN

fornisce una valutazione numerica e, quindi, oggettiva dell'integrità del RNA; solo campioni con un RIN >7,5 sono stati utilizzati per i successivi esperimenti di *microarray*. Dopo aver estratto e misurato i singoli campioni di RNA, sono stati preparati 3 *pool* (*pool\_a* costituito da 4 individui, *pool\_b* and *\_c* da 3 per gli individui veneti, *pool\_a* costituito da 2 individui, *pool\_b* and *\_c* da 3 per gli individui siciliani) per ogni tempo di campionamento. Questo mira ad ottenere un sufficiente potere statistico, raggiunto con un minimo di tre repliche biologiche per ogni tempo analizzato, e a ridurre i costi dell'analisi con *microarray*.

### 2.3 SAPD data base

Il *database* SAPD (SAPD: *Sparus aurata* Padova), creato sulla base dell'ambiente BioMart, può essere interrogato utilizzando diversi filtri tra cui l'ID di ciascun *cluster*, la sua descrizione, il GO ID, il Pfam ID o una combinazione di questi criteri; noto l'ID del *cluster* è possibile ottenere diverse informazioni che comprendono la corrispondente sequenza consenso nonché la sua annotazione (<http://enne.cribi.unipd.it:5555/biomart/martview/e8d9c9143a310799b0b7f9adca9d34a4>).

Allo scopo di sviluppare una piattaforma *microarray* ad alta densità sono state disegnate due sonde non sovrapposte per ogni trascritto unico. Il disegno delle sonde è stato completato positivamente per 19.715 *cluster target*. 19.664 di questi sono rappresentati da due sonde non sovrapposte, mentre per 51 è stato possibile disegnare solo una sonda. Circa il 40% dei 19.715 *cluster target* trova una significativa similarità con almeno un gene/proteina annotato presente nei *database* pubblici (Ferraresso et al. 2008).

Un totale di 39.379 sonde oligonucleotidiche è stato usato per costruire un *microarray* di orata ad alta densità basato sul formato Agilent 4 x 44K, che prevede la sintesi di quattro *microarray*, ciascuno costituito da circa 44.000 sonde, in un'unica *slide*. La

tecnologia utilizzata è la tecnologia Agilent, dove gli oligo-nucleotidi vengono sintetizzati mediante una tecnica detta “a getto di inchiostro” (*inkjet* Agilent SurePrint™ *technology*).

#### **2.4 Esperimenti di *microarray* e analisi dei dati**

Sono stati analizzati 72 campioni: 12 campioni di controllo e 12 trattati di fegato, 12 campioni di controllo e 12 trattati di branchia di individui provenienti dal Veneto, 12 campioni di controllo e 12 trattati di branchia di individui provenienti dalla Sicilia.

La marcatura e l'ibridazione dei campioni sono state eseguite secondo il protocollo *Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis*. 500 ng di RNA totale di ciascuno dei 24 *pool* di fegato e dei 48 *pool* di branchia sono stati amplificati in modo lineare e marcati con Cy3-dCTP (cianina) ed è stata aggiunta a ciascun campione una miscela di 10 diversi RNA virali poliadenilati (*Agilent Spike-In Mix*) allo scopo di poter monitorare, a posteriori, l'andamento di ciascuna fase dell'esperimento, usando il *Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS one-color* (Agilent Technologies). Il cRNA (RNA complementare) marcato è stato quindi purificato con il kit Qiagen *RNAeasy Mini Kit* e la sua concentrazione, nonché l'attività specifica (pmol Cy3/μg cRNA), sono state valutate allo spettrofotometro NanoDrop® ND-1000. Successivamente un totale di 1,650 ng di cRNA marcato è stato sottoposto a frammentazione, mediante l'aggiunta di 11 μl di *Blocking Agent* (10X) e 2,2 μl di *Fragmentation Buffer* (25X) a cui è seguita un'incubazione a 60°C per 30 min, e diluiti per aggiunta di 55 μl di *GE Hybridization buffer* (2X). Un volume totale di 100 μl della soluzione di ibridazione è stato quindi depositato nel *microarray*, ciascuna *slide* è stata incubata a 65°C per 17 ore e successivamente sottoposta a lavaggio.

Lo scanner Agilent “*G2565BA DNA microarray scanner*” è stato utilizzato per la scansione degli *array* ad una risoluzione di 5 μm; ciascuna *slide* è stata sottoposta a una

duplice scansione utilizzando due diversi livelli di sensibilità del laser (XDR Hi 100% and XDR Lo 10%).

L'estrazione dei dati e l'analisi dell'immagine sono state eseguite con il *Feature Extraction Software 9.5.1*, che restituisce una serie di indicatori della qualità di ciascuno spot per valutare la bontà e l'affidabilità delle stime di intensità degli spot. I valori degli *Spike-in* di controllo sono stati usati per identificare la migliore procedura di normalizzazione per ogni *dataset*. Dopo la normalizzazione *cyclic loess* (Bolstad *et al.* 2003), ci si aspetta di avere i valori di intensità degli *spike* uniformi tra i vari esperimenti di un determinato *dataset*. Il filtraggio delle sonde e le normalizzazioni sono state eseguite usando il software statistico R (<http://www.r-project.org/>).

Per identificare i geni differenzialmente espressi tra gli individui di *S. aurata* esposti alle basse temperature e i controlli sono stati utilizzati il test statistico SAM (*Significance Analysis of Microarray*; Thusher *et al.* 2001) e l'analisi della varianza a due vie (ANOVA) mediante il software TMeV (*Tigr MultiExperiment Viewer*; Saeed *et al.*, 2003, 2006). Il test non parametrico di correlazione di Spearman è stato utilizzato per osservare la correlazione tra i valori di espressione misurati rispettivamente con le sonde del *microarray* e la metodica di *Real-time* RT-PCR. Il test di Mann-Whitney è stato, invece, applicato per identificare le differenze significative di espressione in *real-time* RT-PCR tra i trattati e i controlli. Le analisi statistiche sono state eseguite usando SPSS ver. 12.0.

#### **2.4.1 Annotazione funzionale**

L'annotazione funzionale dei geni differenzialmente espressi tra gli individui esposti alle basse temperature e quelli di controllo è stata eseguita utilizzando il software DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*; Huang *et al.* 2009, Dennis *et al.*, 2003), con le seguenti impostazioni per il GO *Biological Process*

Database: BP\_3 o BP\_4, *gene count*= 5, *ease* =0.1, sono stati considerati solo i termini con FDR<50.

Sono stati effettuati dei BLASTN con il database di ENSEMBL (cut off e-value= 1.0 E-5) (<http://www.ensembl.org/index.html>) alla ricerca di *match* di similarità significativi con i trascrittomi di 5 specie di teleostei (*Gasterosteus aculeatus*, *Oryzias latipes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Takifugu rubripes*, *Danio rerio*), per poter ottenere dei codici riconosciuti da DAVID. Successivamente, per annotare i trascritti di orate mostrando gli appaiamenti significativi con più di una specie, l'ordine di priorità assegnato è stato il seguente: *stickleback* (*Gasterosteus aculeatus*), *fugu* (*Takifugu rubripes*), *tetraodon* (*Tetraodon nigroviridis*), *Japanese medaka* (*Oryzias latipes*) e *zebrafish* (*Danio rerio*). I trascritti dei teleostei ottenuti da Ensembl sono stati poi impiegati per una seconda ricerca, con l'opzione blastp (cut off e-value=1.0 E-3), contro tutte le proteine umane di Ensembl. Infine, si sono ottenuti Ensembl Human Gene ID dalle voci corrispondenti alle Ensembl protein, usando BIOMART (<http://www.ensembl.org/biomart/martview/>).

## **2.5 Validazione dei dati di *microarray* mediante *Real-time* RT-PCR**

### **2.5.1 Analisi dei *pool* di fegato**

Dieci geni *target* (*glycerol-3-phosphate acyl transferase*, *fatty acid synthase*, *interleukin enhancer-binding factor 2*, *superoxide dismutase*, *CD59*, *3-ketoacylCoA thiolase*, *protein kinase C*, *malate dehydrogenase*, *acyl carrier protein*, *26S proteasoma complex subunit*. Appendice A) sono stati selezionati per l'analisi di espressione mediante *real-time* RT-PCR. E' stato disegnato un saggio in qRT-PCR per ogni gene *target* selezionato e per il gene *reference* (*RPL13a*, *Ribosomal Protein L13a*), utilizzando il sistema di rivelazione con SYBRGreen. I *primer* gene-specifici sono stati determinati con il software Primer3. Per poter disegnare i *primer* a cavallo di un introne, le giunzioni esone-introne dei trascritti di orata, ove possibile, sono state dedotte sulla base

del confronto con le sequenze genomiche di omologhi in specie di teleostei per i quali i genomi sono stati interamente sequenziati e resi pubblici (*T. nigroviridis*, *D. rerio*, *O. latipes*, *T. rubripes* e *G. aculeatus*).

I campioni analizzati sono i *pool* di fegato di orata a 24h e 21d.

Un microgrammo di RNA totale di ciascun campione è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando l'enzima Superscript II (Invitrogen™); un'aliquota (2,5 µl) di cDNA diluito 1:40 è stata quindi amplificata in un volume totale di 10 µl, contenente 5 µl di SYBRGreen® Master 2X (Invitrogen), 0,25 µl di ciascun *primer* gene-specifico (10 µM). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati con lo strumento LightCycler® 480 (Roche Diagnostics); il protocollo di amplificazione ha previsto uno *step* iniziale di 2 min a 50°C e 10 min a 95°C seguito da 45 cicli di 10'' a 95°C e 30'' a 60°C.

Per valutare l'efficienza di ciascun saggio, sono state costruite curve standard amplificando diluizioni seriali (1:2) dello stesso cDNA utilizzato come calibratore (Sa\_CAL). Il valore di Cp (*Crossing point*) per ogni campione è stato utilizzato per determinare la concentrazione relativa del gene *target* in ciascun campione; tutte le quantificazioni sono state effettuate in duplicato e normalizzate rispetto al gene *reference* (RPL13a), anch'esso misurato in duplicato. RPL13a è stato scelto come gene *reference* nei saggi di qRT-PCR poichè è considerato un gene *housekeeping* e non mostra alcun cambiamento significativo nei dati di *microarray* tra gli individui trattati e i controlli. Infine, per essere sicuri che tutti i geni *target* fossero espressi nel calibratore, esso è stato costruito mescolando la stessa quantità dei tre campioni di RNA di fegato per ogni tempo e condizione.

### **2.5.2 Controllo di omogeneità dei *pool* nei campioni di branchia**

Per assicurare e confermare l'omogeneità dei *pool* ed escludere particolari differenze tra i singoli campioni che costituiscono lo stesso *pool*, campioni di singoli RNA di branchie sono stati analizzati singolarmente in *real-time* RT-PCR con la metodica di rivelazione SYBRGreen.

Nel lavoro condotto è stata valutata la quantificazione relativa di espressione dei geni MDH (*malate dehydrogenase*), PGK-1 (*phosphoglycerate kinase 1*), SOD (*superoxide dismutase*) e BCR (*B-cell receptor*) nei campioni di branchie (controlli e trattati) appartenenti a singoli individui, ai tempi 0h e 21d.

Le condizioni di reazione sono le stesse descritte nel paragrafo precedente (2.5.1).

E' stato effettuato il t-test sui valori di *fold change* di ogni campione per i quattro geni ai due tempi (0h, 21d).

## 3 Risultati

### 3.1 Analisi generale *microarray*

Le analisi effettuate sono rivolte ad identificare la risposta alle basse temperature in due tessuti (fegato e branchia) di individui di *Sparus aurata* provenienti dal Veneto e a confrontare tale risposta nello stesso tessuto (branchia) di individui provenienti dal Veneto e dalla Sicilia, due regioni italiane con condizioni climatiche differenti.

Per identificare i geni e i *pathway* coinvolti nella risposta al freddo, è stata effettuata un'analisi *time-course* (0h, 6h, 24h, 21d) dell'espressione genica nel fegato di esemplari di *S. aurata* esposti a basse temperature ( $6,8 \pm 0,3$  °C). I profili di espressione degli individui esposti al freddo sono stati comparati con quelli degli animali di controllo, tenuti a  $16 \pm 0,3$ °C per l'intera durata dell'esperimento.

Per confrontare le due popolazioni ed identificare eventuali differenze nella risposta al freddo dovute all'origine geografica, è stata eseguita un'analisi di espressione genica per i 4 tempi considerati nelle branchie di orate sottoposte alle basse temperature ( $6,8 \pm 0,3$  °C) e dei loro controlli ( $16 \pm 0,3$ °C), sia per gli individui siciliani che per i veneti.

I cambiamenti nei livelli di espressione dell'mRNA sono stati determinati attraverso l'ibridazione di un *microarray custom* ad alta densità, costituito da 39.379 sonde oligonucleotidiche derivate da un database di trascritti unici (Materiali e metodi, parag. 2.2).

### 3.2 Annotazione funzionale dei geni differenzialmente espressi

Il software DAVID è stato usato per assegnare un'annotazione funzionale ai geni differenzialmente espressi tra i gruppi esposti alle basse temperature e i controlli. Per ottenere ID compatibili con DAVID, è stato usato BLASTN (cut off e-value of 1.0 E-5) per cercare nel database di ENSEMBL *match* significativi col trascrittoma delle 5 specie di teleostei (*G. aculeatus*, *O. latipes*, *T. nigroviridis*, *T. rubripes*, *D. rerio*) (vedi Materiali e metodi). Il più alto numero di geni omologhi è stato ottenuto effettuando blastn tra trascritti SAPD e il trascrittoma di *Gasterosteus aculeatus* in Ensembl (6.186 *match*), mentre il numero più piccolo di *match* si è ottenuto confrontando orata con zebrafish (3.986 *match*) (Appendice B). Sono stati trovati geni omologhi in almeno una specie di teleostei per 7.295 trascritti di SAPD, è stato quindi eseguito un Blastp (cut off e-value= 1,0 E-3) tra i geni dei teleostei e le proteine umane nel *database* di Ensembl. In questo modo sono stati identificati omologhi umani per 6.835 trascritti di SAPD, poi usati nelle analisi con DAVID.

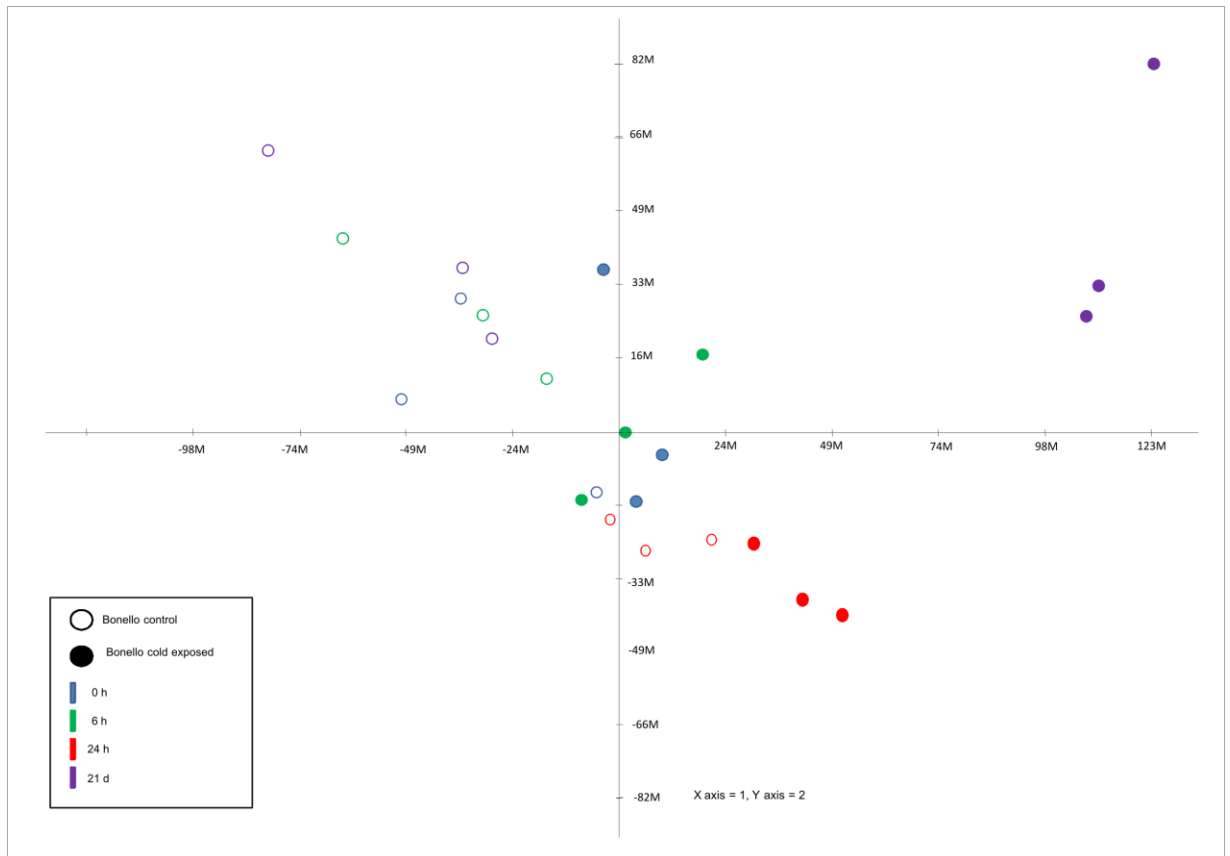
Prima di introdurre i risultati dell'annotazione funzionale, bisogna considerare la ridondanza nei termini di GO (*Gene Ontology*) presente nell'analisi di DAVID, poiché per ogni gene ci sono numerosi livelli di descrizione della stessa annotazione.

### **3.3 Analisi del fegato**

#### **3.3.1 Analisi statistiche**

Ad ogni campionamento sono stati raccolti dieci campioni di fegato del gruppo esposto al freddo e dieci del gruppo dei controlli per gli individui provenienti dal Veneto. Dopo l'estrazione di RNA dai singoli campioni, si sono mescolati i diversi RNA in modo da ottenere tre repliche biologiche sottoforma di *pool* come descritto in Materiali e metodi. La concentrazione di RNA nei campioni di fegato era di circa 800-900 ng/ $\mu$ l. Il valore medio del R.I.N. di tali campioni 8.

L'analisi di PCA (*Principal Component Analysis*) ha mostrato che il 78,6 % dei cambiamenti trascrizionali associati al freddo viene spiegato dalle prime tre componenti per identificare le principali differenze tra i trattati e i controlli, e il 72,4 % viene spiegato dalle prime due componenti di PCA. Quest'analisi ha rivelato che i campioni esposti al freddo per un periodo più lungo (21 giorni) sono i più distanti dai controlli e dagli altri campioni trattati (fig.1).



**Figura1.** La PCA dei profili di espressione del fegato dei trattati e dei rispettivi controlli mostra una chiara separazione del gruppo esposto al freddo da quello di controllo, principalmente dopo 21d di esposizione al freddo. La PCA utilizza l'intero set di ESTs (*Expression Sequence Tags*) presenti sull'*array* di *S. aurata*; gli assi rappresentano le combinazioni dei geni che spiegano la maggior parte delle modifiche di espressione dovute alla riduzione della temperatura nei campioni esposti rispetto al profilo di espressione genica dei campioni di controllo.

E' stata osservata una crescente differenza nei profili di espressione nel corso del tempo tra il gruppo di controllo e quello esposto alle basse temperature, rivelando un importante ruolo della diminuzione della temperatura dell'acqua nei cambiamenti trascrizionali. L'analisi di ANOVA a due vie ( $\alpha$ -value = 0.0010; p-value based on *F-distribution*) (tempo vs trattamento) ha rivelato un diverso *pattern* di espressione tra i due gruppi.

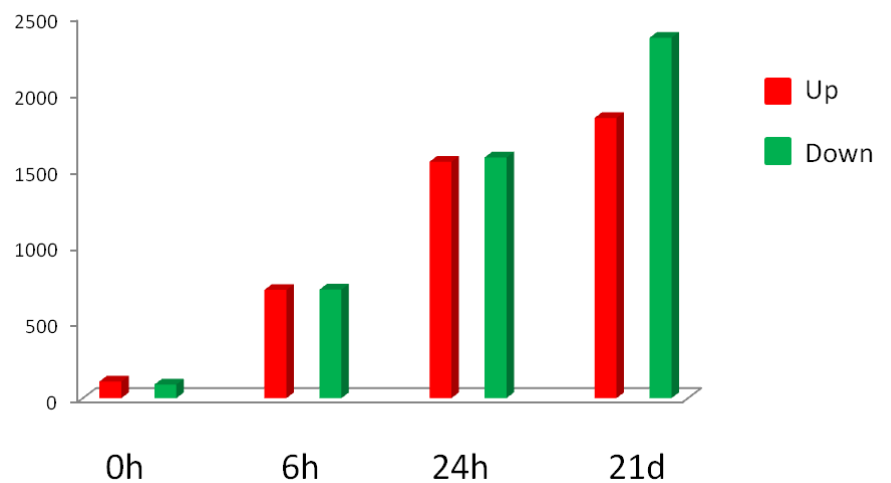
L'analisi di ANOVA a due vie ha permesso di identificare tre liste di geni differenzialmente espressi: 1250 geni hanno mostrato differenze nell'espressione genica

in relazione al tempo di esposizione, 4218 geni rispetto all'esposizione alle basse temperature, mentre 961 geni sono risultati differenzialmente espressi per l'interazione tra i due fattori (tempo versus trattamento). Vale la pena di notare che 373 geni sono in comune tra le tre liste.

Allo scopo di identificare i geni differenzialmente espressi tra il gruppo dei trattati e quello dei controlli ad ogni tempo di campionamento (0h, 6h, 24h, 21d), è stata eseguita un'analisi statistica mediante l'utilizzo di SAM (*Significance Analysis of Microarray*), con un *False Discovery Rate* (FDR) uguale a zero e la soglia con *fold-change* pari a 2. Questo ha prodotto quattro diverse liste di geni significativi differenzialmente espressi, una per ogni tempo. Un totale di 198 (109 sovra-espressi e 89 sotto-espressi), 1419 (709 sovra-espressi e 710 sotto-espressi), 3124 (1548 sovra-espressi and 1576 sotto-espressi), e 4194 (1835 sovra-espressi e 2359 sotto-espressi) geni differenzialmente espressi è stato ottenuto per 0h, 6h, 24h, e 21d rispettivamente. I geni con un *fold-change*  $\geq 4$  sono 30 (21 sovra e 9 sotto-espressi), 181 (125 sovra e 56 sotto-espressi), 433 (224 sovra e 209 sotto-espressi), 590 (282 sovra e 308 sotto-espressi) rispettivamente per 0h, 6h, 24h, 21d (tab.2, fig.2).

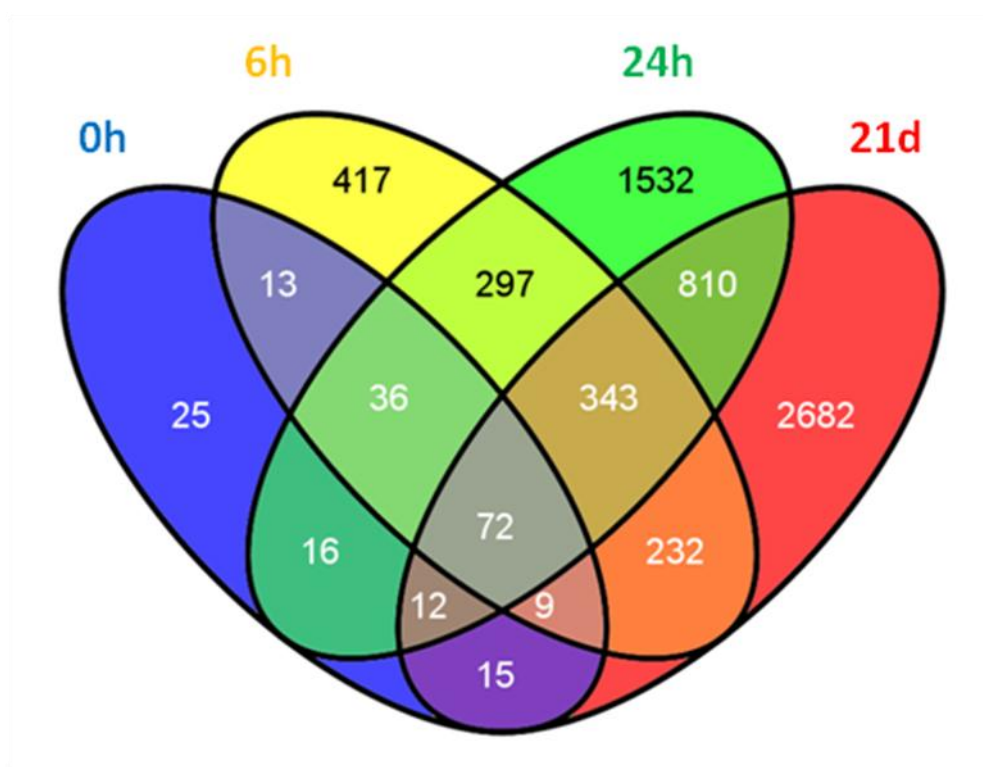
<b>0h</b>	<i>UP-regulated</i>	109	f.c.>10 = 1	4<f.c.<10= 21	2<f.c.<3.9= 88
	<i>DOWN-regulated</i>	89	f.c.<0.1 = 0	0.1<f.c.<0.25= 9	0.25<f.c.<0.5= 80
<b>6h</b>	<i>UP-regulated</i>	709	f.c.>10 = 16	4<f.c.<10= 125	2<f.c.<3.9= 568
	<i>DOWN-regulated</i>	710	f.c.<0.1 = 5	0.1<f.c.<0.25= 56	0.25<f.c.<0.5= 649
<b>24h</b>	<i>UP-regulated</i>	1548	f.c.>10 = 16	4<f.c.<10= 224	2<f.c.<3.9= 1308
	<i>DOWN-regulated</i>	1576	f.c.<0.1 = 36	0.1<f.c.<0.25=209	0.25<f.c.<0.5= 1331
<b>21d</b>	<i>UP-regulated</i>	1835	f.c.>10 = 36	4<f.c.<10= 282	2<f.c.<3.9= 1517
	<i>DOWN-regulated</i>	2359	f.c.<0.1 = 34	0.1<f.c.<0.25=308	0.25<f.c.<0.5= 2017

**Tabella2.** Numero di geni differenzialmente espressi e loro classificazione in base al *fold-change* (f.c.) per ogni tempo analizzato dopo la discesa della temperatura a  $6,8 \pm 0,3$  °C. Nella terza colonna viene riportato il numero assoluto dei geni per ogni categoria.



**Figura2.** Geni sovra e sotto espressi nel fegato di individui di *S. aurata* dopo esposizione acuta (0h, 6h, 24h) e cronica (21d) a  $6,8 \pm 0,3$  °C.

**Figura3.** Il diagramma di Venn mostra il numero di geni differenzialmente espressi in comune tra le diverse liste ottenute con SAM per i 4 tempi di campionamento.



### 3.3.2 Processi metabolici coinvolti nella risposta al freddo nel fegato

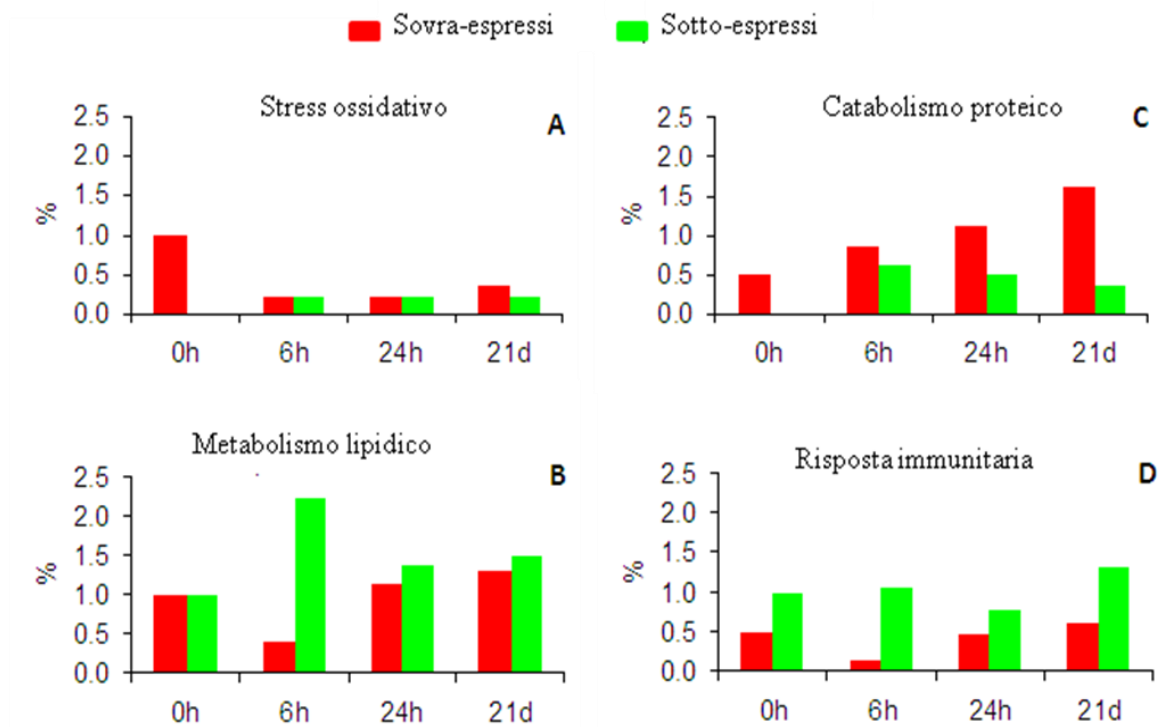
#### 3.3.2.1 Annotazione funzionale

Per identificare i processi più significativi tra i *pathway* differenzialmente espressi, sono state effettuate analisi di annotazione funzionale e arricchimento delle liste dei geni differenzialmente espressi (ottenute con le analisi di ANOVA e SAM) con il *software* di DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*; Dennis et al., 2003; Huang et al., 2009). Tutte queste liste sono state prima annotate con il *database* SAPD, e poi analizzate con DAVID (Appendice C). L'omogeneità dei controlli ai diversi tempi è stata confermata da SAM (FDR = 5%), i cui risultati non hanno dato alcun gene differenzialmente espresso. La maggior parte dei geni differenzialmente espressi sono coinvolti in 10 *pathway* e assegnati a 36 gruppi funzionali, 4 di questi sono presenti in più di un tempo (Appendice C). I profili di espressione di molti processi biologici vengono alterati dopo 21 giorni di esposizione al freddo, rivelando una risposta cronica dipendente dal lungo periodo di esposizione alle basse temperature. Per esempio, il metabolismo degli aminoacidi e la proteolisi ubiquitina-dipendente sono i principali processi biologici differenzialmente espressi a 21d, indicando l'elevato livello di degradazione proteica, indice di danno cellulare. Dall'altro lato, è anche evidente una risposta acuta dopo poche ore dalla discesa della temperatura (0h e 6h), in cui sono coinvolti i processi di apoptosi, metabolismo lipidico, dei carboidrati e degli aminoacidi.

I geni coinvolti nella risposta al freddo sono responsabili di un'ampia varietà di processi biologici, incluso il metabolismo lipidico ( *$\beta$ 2-apolipoprotein, long chain fatty acid CoA ligase, acylCoA tioesterase, gastrotropin, delta 9 desaturase, fatty acid syntase, L-FABP, enoylCoA idratase*), l'apoptosi (*GADD153, apoptosis facilitator, mdm4, p53 binding protein, CIDE3*), la risposta immunitaria (*chemokine CK1, MHC Class I e II, complement C3 precursor, immediate early response, macrophage colony stimulating*

*factor, TLR9, HLA class histocompatibility*) (fig. 4). In tutti i tempi campionati il gene *gastrotropin* (f.c.< 0,19) risulta sotto-espresso e GADD153 (CHOP) sovra-espresso nel gruppo trattati rispetto ai controlli. La risposta immunitaria è di solito sotto-espressa, eccetto che per alcuni componenti cellulari e umorali della risposta immunitaria innata: lisozima, *C7 complement precursor* (f.c.= 3,86) e *complement factor I* (f.c. = 2,43), sovra-espressi nella risposta iniziale allo stress da freddo (24h). Dopo 21 giorni di esposizione alle basse temperature, molti componenti del complemento risultano sotto-espressi: i) *C1 complement subcomponent* (f.c. = 0,47), ii) *C2 complement precursor* (f.c. = ,38), iii) *C3 complement precursor* (f.c. = 0,12), iv) *C5 complement precursor* (f.c. = 0,40), e v) *C8 complement precursor* (f.c. = 0,44).

Il profilo di espressione dei geni per gli enzimi detossificanti ha rivelato un *pattern* complesso; in particolare, la catalasi risulta sotto-espressa a 21d (f.c. = 0,4), mentre la glutazione perossidasi è sotto-espressa a 24h (f.c. = 0,39) ma sovra-espressa a 21d (f.c. = 2,94); la glutazione S-transferasi (*class-a member 5*) è sotto-espressa sia a 24h che a 21d (f.c. = 0,33 e 0,48) e la glutazione reduttasi è sovra-espressa sia a 24h che a 21d (f.c. = 2,25 e 2,39).



**Figura4.** Geni sovra e sotto espressi (in percentuale al numero dei geni differenzialmente espressi ad ogni tempo sull'asse Y) coinvolti nella risposta allo stress ossidativo (A), nel metabolismo lipidico (B), nel catabolismo proteico (C), nella risposta immunitaria (D) nel fegato di orata dopo esposizione acuta (0h, 6h, 24h) e cronica (21d) a  $6,8 \pm 0,3$  °C.

### 3.3.3 Analisi di *real-time* RT-PCR

Per validare i risultati di *microarray*, sono stati condotti saggi gene-specifici in qRT-PCR, usando il metodo di rivelazione SYBRGreen. Sono stati selezionati 10 geni *target* per l'analisi in qRT-PCR in base ai seguenti criteri: i geni selezionati (i) devono essere all'interno dei valori di *fold-change* di 0,2-13, (ii) devono essere presenti con entrambe le sonde indipendenti, nei dati normalizzati di *microarray* (Appendice A). Il *fold-change* viene calcolato come il rapporto tra il valore medio di intensità delle tre repliche biologiche degli individui esposti al freddo e quello del gruppo di controllo.

E' stato usato il test non parametrico di Spearman per valutare la correlazione tra i valori d'espressione misurati in *real-time* RT-PCR e quelli di *microarray*. Per tutti i geni *target* testati, la direzione del cambiamento d'espressione è concordante tra i

risultati di qRT-PCR e di *microarray*. Comparando i livelli d'espressione di ogni gene tra tutte le repliche biologiche si è ottenuta una buona correlazione, spesso statisticamente significativa. Cinque geni hanno mostrato degli elevati coefficienti di correlazione (rho di Spearman > 0,8) per entrambe le sonde (p-value < 0,01) con i dati di qPCR (tab. 3). Un gene (*glycerol-3-phosphate acyl transferase*) mostra un'elevata correlazione (Spearman rho > 0,8, p-value < 0,01) per una sonda e una significativa correlazione (0,7 < rho > 0,8 con p-value < 0,01) per l'altra. Un altro gene (*superoxide dismutase*) presenta una significativa correlazione per una sonda (0.5 < rho < 0,8 con p-value < 0,01) e una correlazione positiva per l'altra (rho=0,5, p-value > 0,1). I tre geni rimanenti (26S, MDH, ACP) mostrano una correlazione non significativa, seppur positiva (rho < 0.5, p-value > 0.1) per entrambe le sonde.

SAPD ID	Gene	rho di Spearman		
		Sonda_1/Sonda_2	qPCR/Sonda_1	qPCR/Sonda_2
SAPD23647	<i>26S proteasome complex subunit</i>	0.930**	0.347	0.270
SAPD21212	<i>Fatty acid synthase</i>	0.951**	0.895**	0.951**
SAPD10252	<i>Glycerol-3-phosphate acyl transferase</i>	0.804**	0.937**	0.747**
SAPD23278	<i>Protein kinase C</i>	0.893**	0.930**	0.858**
SAPD20246	<i>3-ketoacylCoA thiolase</i>	0.944**	0.867**	0.832**
SAPD11592	<i>Acyl carrier protein</i>	0.958**	0.298	0.326
SAPD20810	CD-59	0.965**	0.839**	0.881**
SAPD18820	<i>Interleukin-2</i>	0.973**	0.879**	0.821**
SAPD02236	<i>Malate dehydrogenase</i>	0.818**	0.053	0.249
SAPD22939	<i>Superoxide dismutase</i>	0.453	0.502	0.712**

\*\* p < 0.01

**Tabella3.** Correlazione tra i dati di espressione del *microarray* e quelli di *real-time* RT-PCR.

Il test dei ranghi di Mann-Whitney è stato applicato ai dati di *real-time* PCR per valutare statisticamente le differenze nell'espressione genica tra trattati e controlli. In particolare, dopo 24 ore a 6,8°C, risultano differenzialmente espressi (con significatività statistica) 7 dei 10 geni nel gruppo trattati rispetto al controllo; in modo simile, dopo 21 giorni 7 dei 10 geni risultano differenzialmente espressi tra i due gruppi, e solo cinque di questi sono in comune tra risposta acuta e cronica (tab. 4), suggerendo che alcuni geni coinvolti nella risposta al freddo possano essere alternativamente “accesi” e “spenti” a tempi diversi. I geni sovra-espressi a 24h sono i seguenti: *glycerol-3-phosphate acyl transferase*, *fatty acid synthase*, *interleukin enhancer-binding factor 2*, *superoxide dismutase*; mentre i sotto-espressi sono *CD59*, *3-ketoacylCoA thiolase* e *protein kinase C*. I restanti geni non sono differenzialmente espressi in modo significativo (*malate dehydrogenase*, *acyl carrier protein*, *26S proteasoma complex subunit*). Dopo 21 giorni di esposizione al freddo i geni sovra-espressi risultano i seguenti: *26S proteasoma complex subunit*, *glycerol-3-phosphate acyl transferase*, *fatty acid synthase*, *interleukin enhancer-binding factor 2*, *superoxide dismutase*, *acyl carrier protein*, *protein kinase C*. I restanti geni sono sotto-espressi ma non significativi: *malate dehydrogenase*, *3-ketoacylCoA thiolase* e *CD59*. E' interessante notare che *PKC* risulta sempre differenzialmente espresso in modo significativo, ma nelle due diverse direzioni: a 24h è sotto-espresso mentre a 21d è sovra-espresso.

E' confermato che, sopra una certa soglia di espressione differenziale (f. c.~ 10), la sensibilità del *microarray* tende ad essere “compressa” (vedi *FAS* e *ILF2* a 21d in tab.3). Tale fenomeno è noto come “*fold-change compression*” ed è dovuto a diverse limitazioni tecniche, incluso il limitato *range* dinamico, la saturazione del segnale e le cross-ibridazioni dei *microarray* (Wang et al., 2006, Ferraresso et al., 2008).

GENE	Espressione differenziale	24h fold change				21d fold change			
		qPCR	S1	S2	MW	qPCR	S1	S2	MW
<b>26S</b>	Sovra	1.10	0.75	0.90	•	4.86	2.42	2.43	*
<b>FAS</b>	Sovra	2.41	1.86	2	*	12.57	8.13	7	*
<b>GPAT</b>	Sovra	4.13	5	5	*	8.51	7	5.61	*
<b>PKC</b>	Sovra e sotto	0.38	0.29	0.39	*	2.59	1.67	2.40	*
<b>KAT</b>	Sotto	0.13	0.20	0.24	*	0.77	0.38	0.45	•
<b>ACP</b>	Sovra	1.13	0.98	0.92	•	2.36	1.78	1.85	*
<b>CD59</b>	Sotto	0.44	0.27	0.29	*	0.96	0.61	0.63	•
<b>ILF2</b>	Sovra	2.7	2.12	2.92	*	17.1	13.82	10.82	*
<b>MDH</b>	Sotto	0.74	0.47	0.41	•	0.73	0.57	0.51	•
<b>SOD</b>	Sovra	1.63	1.07	1.29	*	2.67	1.35	1.65	*

**Tabella4.** *Fold-change* tra trattati e controlli per i dieci geni analizzati sia in q RT-PCR che in *microarray*. Abbreviazione dei geni nell'ordine seguente: *26S proteasome complex subunit, fatty acid synthase, glycerol-3phosphate-acyltransferase, protein kinase C, 3-ketoacylCoA thiolase, acyl carrier protein, CD59, interleukin enhancer-binding factor 2, malate dehydrogenase, superoxide dismutase*. qPCR = *quantitative real-time PCR*, S1 e S2 = sonda 1 sonda 2 del *microarray*, MW = Mann–Whitney *U* test, \* differenzialmente espresso in modo significativo in qPCR, • differenzialmente espresso in modo non significativo in qPCR.

### 3.4 Analisi delle branchie

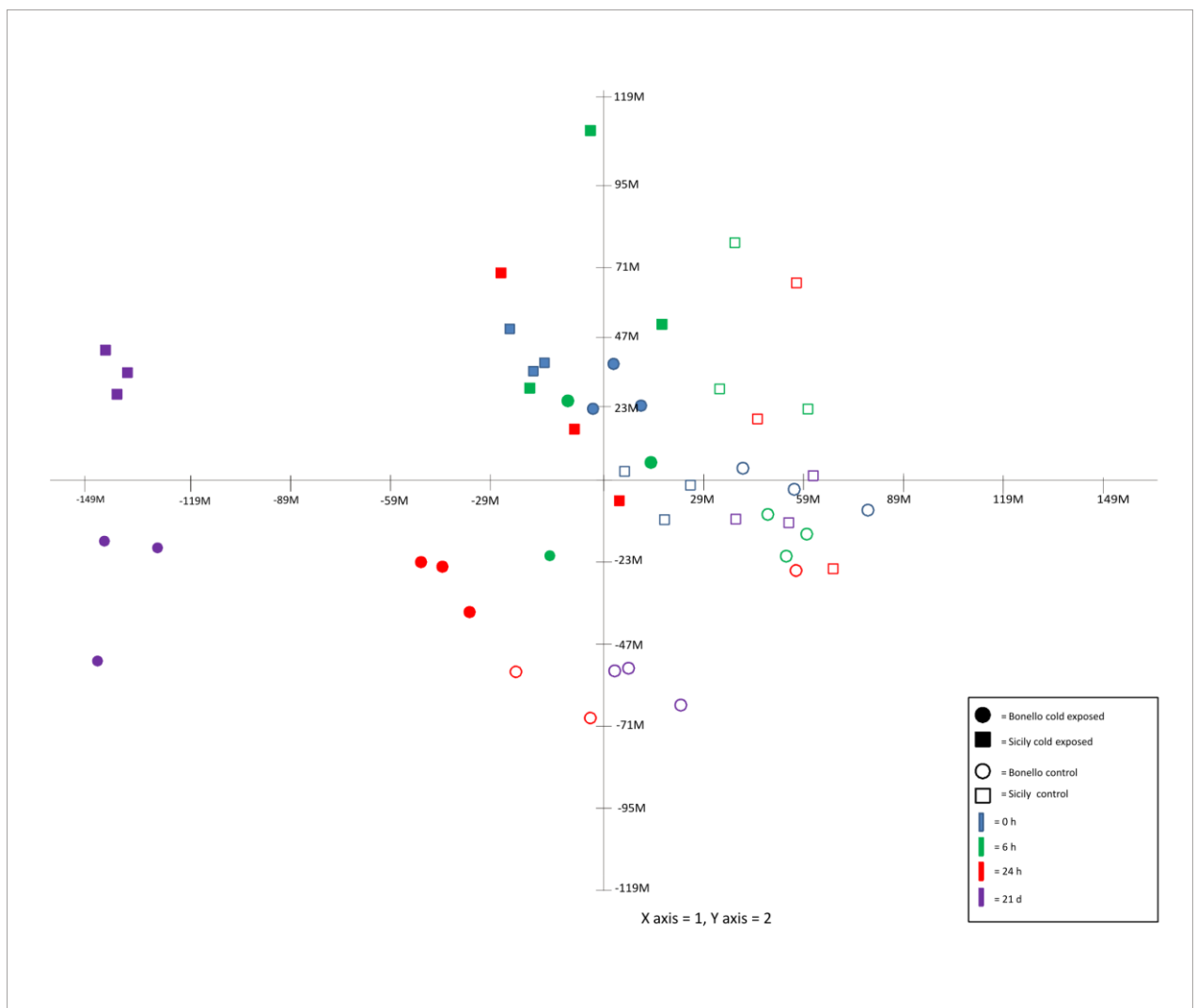
Per identificare i geni e i *pathway* coinvolti nell'acclimatazione al freddo e per confrontare le due popolazioni provenienti dal Veneto e dalla Sicilia, è stata eseguita un'analisi di espressione genica per i 4 tempi presi in considerazione nelle branchie delle orate sottoposte alle basse temperature ( $6,8 \pm 0,3$  °C) e dei loro controlli ( $16 \pm 0,3$  °C).

Ad ogni tempo di campionamento sono stati raccolti dieci campioni di branchia dal gruppo trattati e dieci da quello controlli per il Veneto, e 8 campioni di branchia per i rispettivi gruppi negli individui provenienti dalla Sicilia. Da ognuno di questi campioni è stato estratto l'RNA e mescolato in tre *pool* come descritto in Materiali e metodi (parag. 2.2). Sono stati analizzati 24 *pool* del gruppo dei trattati (12 dal Veneto e 12 dalla Sicilia) e 24 di quello di controllo (12 dal Veneto e 12 dalla Sicilia), per un totale di 48 *pool* di RNA. La concentrazione di RNA nei campioni di branchia era di circa 1000 ng/ $\mu$ l e il valore medio del R.I.N. di tali campioni 9.

I dati di *microarray* sono stati soggetti a *hierarchical clustering analysis* per identificare geni che mostrassero cambiamenti significativi nell'espressione rispetto al tempo tra gruppo trattato e di controllo. Il *clustering* gerarchico ha dimostrato un'elevata omogeneità all'interno del gruppo di controllo, anche considerando i diversi tempi di campionamento. E' stata osservata una grande differenza nei profili di espressione dei campioni esposti al freddo per 21 giorni rispetto agli altri gruppi sperimentali, indicando il ruolo importante della diminuzione di temperatura sulle modifiche trascrizionali. I campioni trattati prelevati agli altri tempi (0h, 6h, 24h) sono raggruppati insieme, in parte distinti rispetto alle loro origini geografiche (Appendice D).

L'analisi delle componenti principali (PCA) ha mostrato che il 54 % delle variazioni trascrizionali è associato al freddo e viene spiegato dalle prime due componenti di PCA

(fig.5), mentre il 64 % dalle prime tre. Quest'analisi ha rivelato che ogni campione si separa chiaramente dal suo rispettivo controllo, in particolare quelli esposti a  $6,8 \pm 0,3$  °C per un lungo periodo (21 d). La PCA ha anche permesso di identificare una discreta risposta geografica, poiché i campioni siciliani condividono lo stesso profilo trascrizionale lungo la componente 2 (asse Y).



**Figura5.** La PCA dei profili di espressione delle branchie dei trattati (Veneto e Sicilia) e dei rispettivi controlli mostra una chiara separazione tra i campioni esposti al freddo e i controlli, principalmente dopo 21d di esposizione a  $6,8 \pm 0,3$  °C. Trattati e controlli si separano rispetto alla prima componente (asse X), mentre l'origine geografica influisce maggiormente sulla seconda componente (asse Y).

### **3.4.1 Analisi statistiche**

Le analisi elencate di seguito sono state effettuate per cercare di descrivere un quadro più ampio possibile sulle modifiche trascrizionali che avvengono durante la risposta dell'organismo alle basse temperature in individui con differenti origini geografiche.

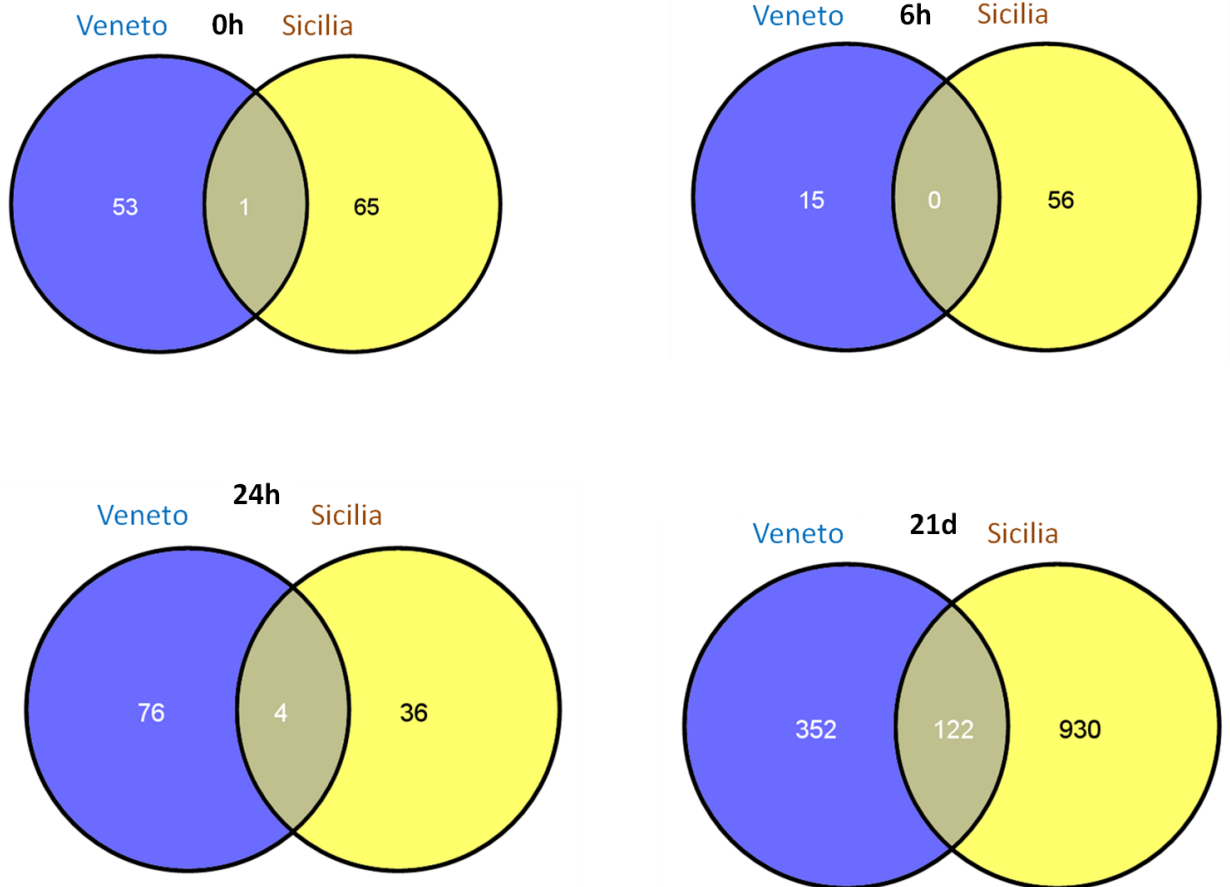
1. SAM a coppie tra controlli e trattati ad ogni tempo, separatamente per Sicilia e Veneto, per identificare la risposta al freddo nelle due regioni.
2. SAM a coppie tra trattati veneti e siciliani per identificare le differenze geografiche nella risposta al freddo.
3. ANOVA a due vie (geografia *vs* trattamento) tra campioni siciliani (trattati e controlli) e campioni veneti (trattati e controlli) ad ogni tempo.

### 3.4.1.1 SAM a coppie tra controlli e trattati ad ogni tempo

Il confronto tra trattati e controlli di Veneto e Sicilia ha prodotto due liste di geni differenzialmente espressi (sovra e sotto espressi) ad ogni tempo (tab. 5). E' interessante notare come, alla fine dell'esperimento, dopo 21 giorni di esposizione al freddo, la risposta trascrizionale coinvolta sia molto maggiore rispetto agli altri tempi. I diagrammi di Venn riportati in fig. 6 evidenziano i geni in comune tra le diverse liste delle due regioni.

<b>Tempi</b>		<b>Sicilia</b>	<b>Tot</b>	<b>Tempi</b>		<b>Veneto</b>	<b>tot</b>
<b>0h</b>	UP-regulated	28	66	<b>0h</b>	UP-regulated	51	54
	DOWN-regulated	38			DOWN-regulated	3	
<b>6h</b>	UP-regulated	20	56	<b>6h</b>	UP-regulated	10	15
	DOWN-regulated	36			DOWN-regulated	5	
<b>24h</b>	UP-regulated	15	45	<b>24h</b>	UP-regulated	42	80
	DOWN-regulated	25			DOWN-regulated	38	
<b>21d</b>	UP-regulated	693	1052	<b>21d</b>	UP-regulated	320	474
	DOWN-regulated	359			DOWN-regulated	154	

**Tabella5.** Numero di geni differenzialmente espressi ottenuti effettuando SAM a coppie singolarmente tra trattati e controlli in Sicilia e Veneto FDR=0%.



**Figura6.** Diagrammi di Venn tra i geni differenzialmente espressi tra individui trattati e controlli del Veneto e della Sicilia a 0h, 6h, 24h e 21d di esposizione a  $6,8 \pm 0,3$  °C.

#### 3.4.1.2 SAM tra trattati (Sicilia e Veneto)

Il confronto tra i trattati delle due popolazioni ha evidenziato risultati interessanti: mentre a 0h e 21d vi sono circa mille geni differenzialmente espressi, indicando rispettivamente delle differenze iniziali (geografiche) ed una diversa risposta ad una prolungata esposizione al freddo tra gli esemplari siciliani e quelli veneti; a 6h e 24h le differenze si annullano, lasciando ipotizzare una comune risposta al freddo a breve termine.

TEMPI	N geni
0h	1114
6h	0
24h	1
21d	1120

**Tabella6.** Numeri di geni differenzialmente espressi tra trattati siciliani e veneti ottenuti con SAM ai tempi 0h, 6h, 24h, 21d dall'esposizione a  $6,8 \pm 0,3$  °C.

#### 3.4.1.3 ANOVA a due vie (origine geografica vs trattamento)

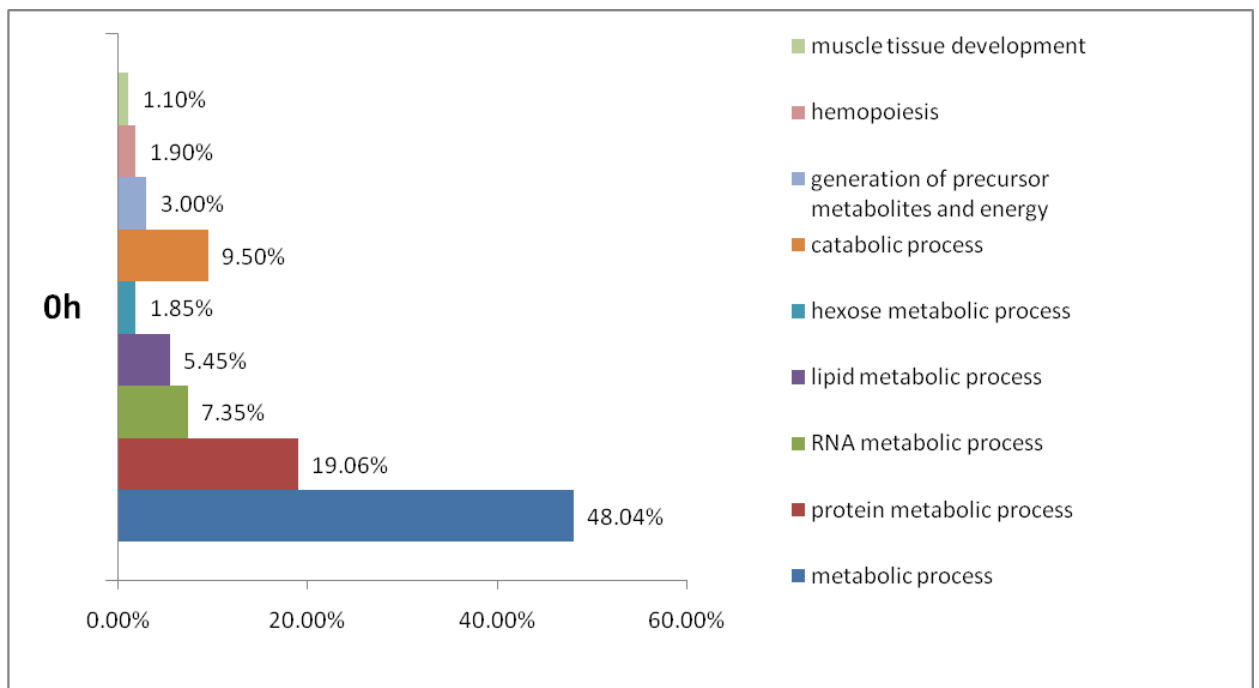
L'analisi della varianza (ANOVA a due vie) dei profili di espressione delle branchie delle due popolazioni di *S. aurata* ha prodotto tre liste di geni differenzialmente espressi per ogni tempo, rispettivamente in base alla diversa origine geografica, all'esposizione al freddo e all'interazione tra questi due fattori (tab.7).

Tempo	Origine geografica	Trattamento	Interazione	Geni in comune tra le tre liste
0 h	8914	5723	1271	738
6 h	1175	1879	55	19
24 h	434	3136	22	10
21 d	2505	9288	315	181

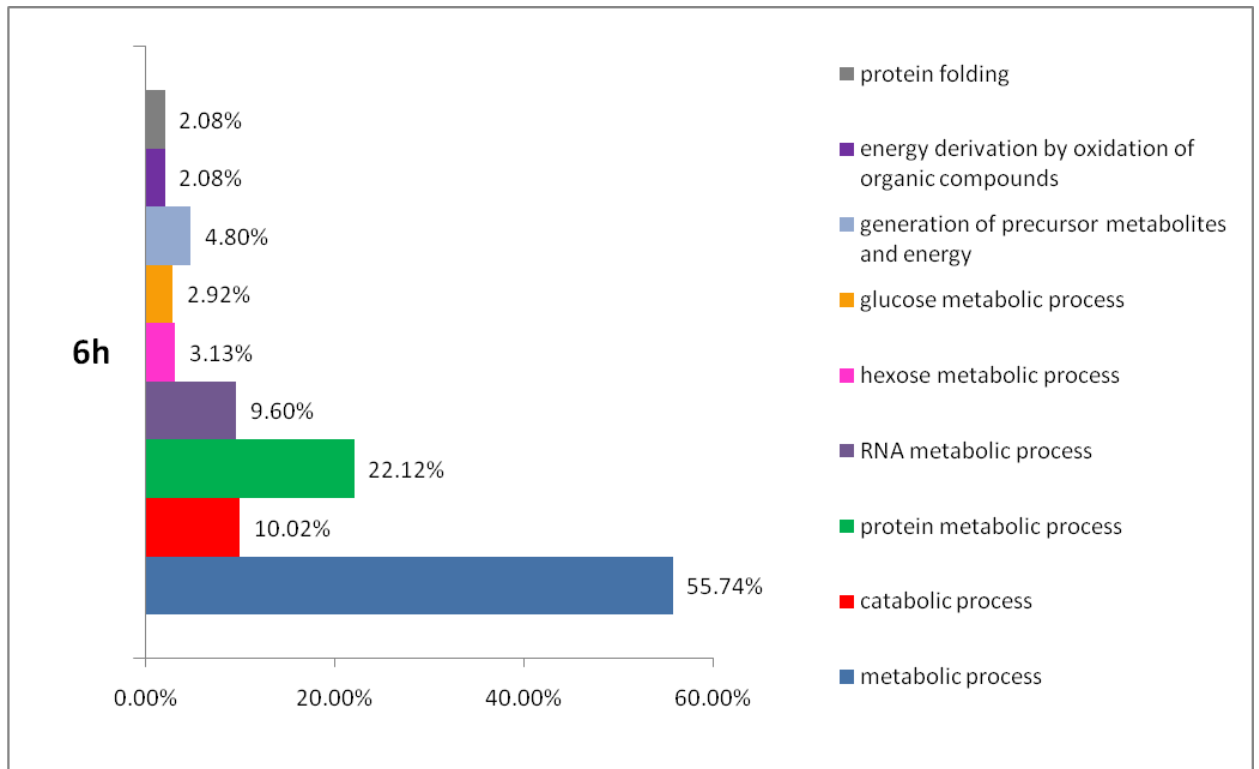
**Tabella7.** ANOVA a due vie (origine geografica vs trattamento) dei profili di espressione delle branchie di individui veneti e siciliani,  $p\text{-value}=0,001$ .

### 3.4.2 Annotazione funzionale

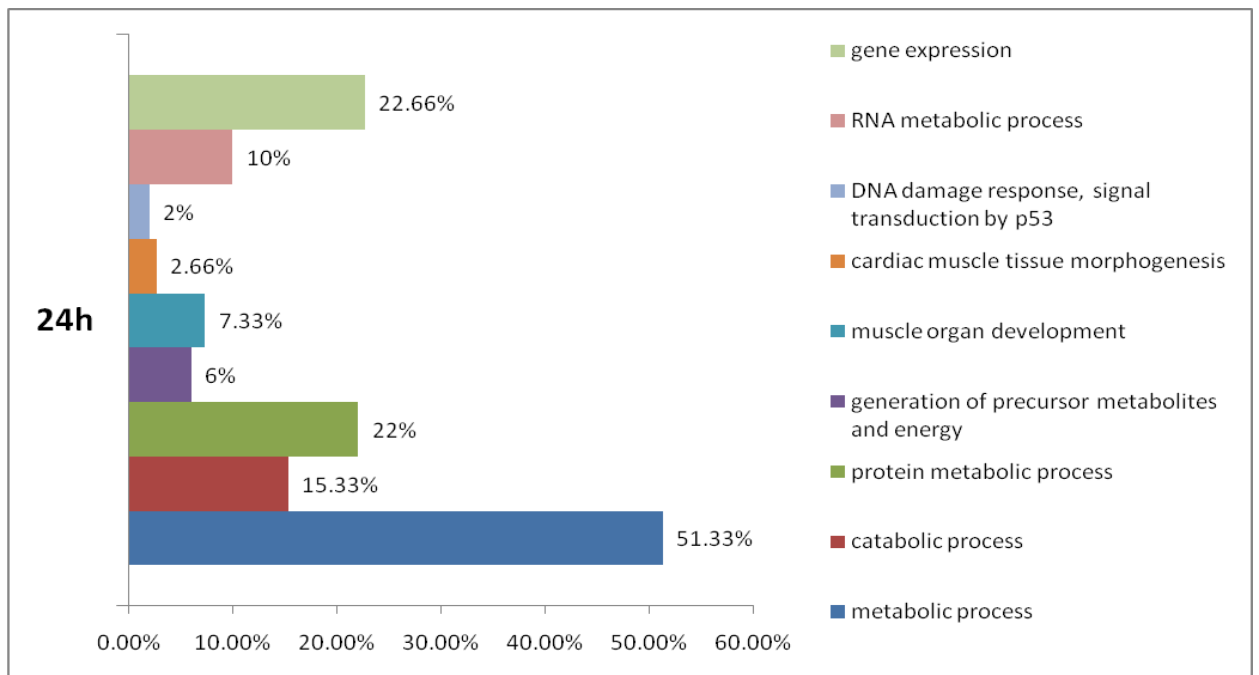
Per identificare i processi più significativi tra i *pathway* differenzialmente espressi delle liste di geni ottenute con l'ANOVA, sono state effettuate analisi di annotazione funzionale e arricchimenti (Appendice E). La componente geografica sembra essere caratterizzata da *pathway* coinvolti principalmente nel metabolismo energetico e nello sviluppo di organi e tessuti (figg.7-10), mentre fanno parte della componente del trattamento, oltre che numerosi processi metabolici (metabolismo lipidico, proteico e dei carboidrati) e di espressione genica, l'intera risposta allo stress (risposta allo stress ossidativo, ai radicali liberi, all'ipossia, apoptosi) e la risposta immunitaria (cascata del complemento, differenziazione e attivazione dei linfociti, cellule NK) (figg.11-14).



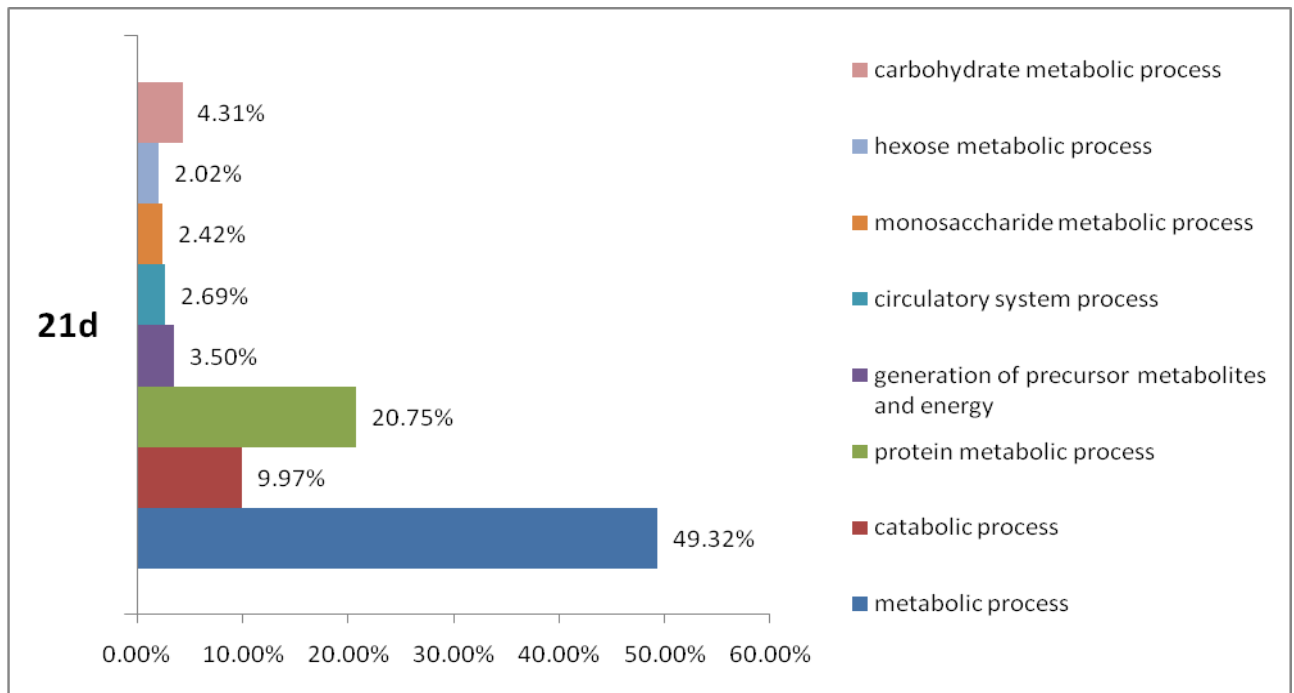
**Figura7.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base all'origine geografica (ANOVA a due vie) a 0h dall'esposizione al freddo.



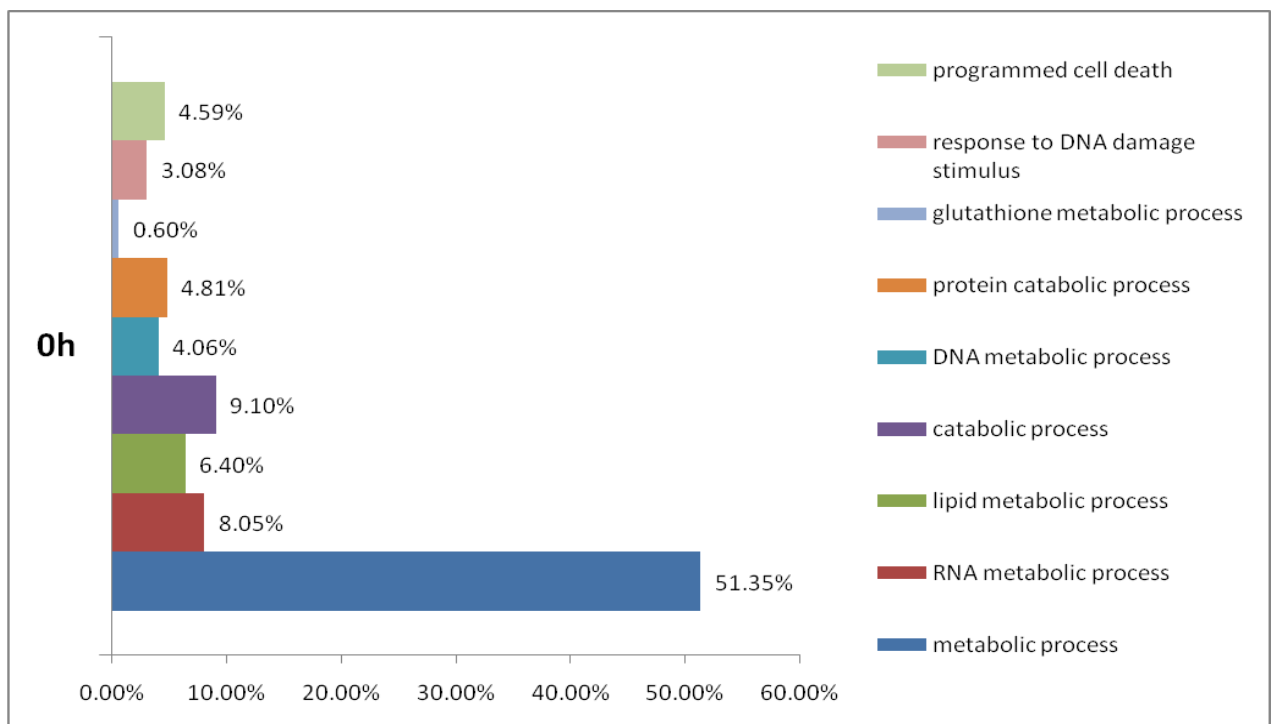
**Figura8.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base all'origine geografica (ANOVA a due vie) a 6h dall'esposizione al freddo.



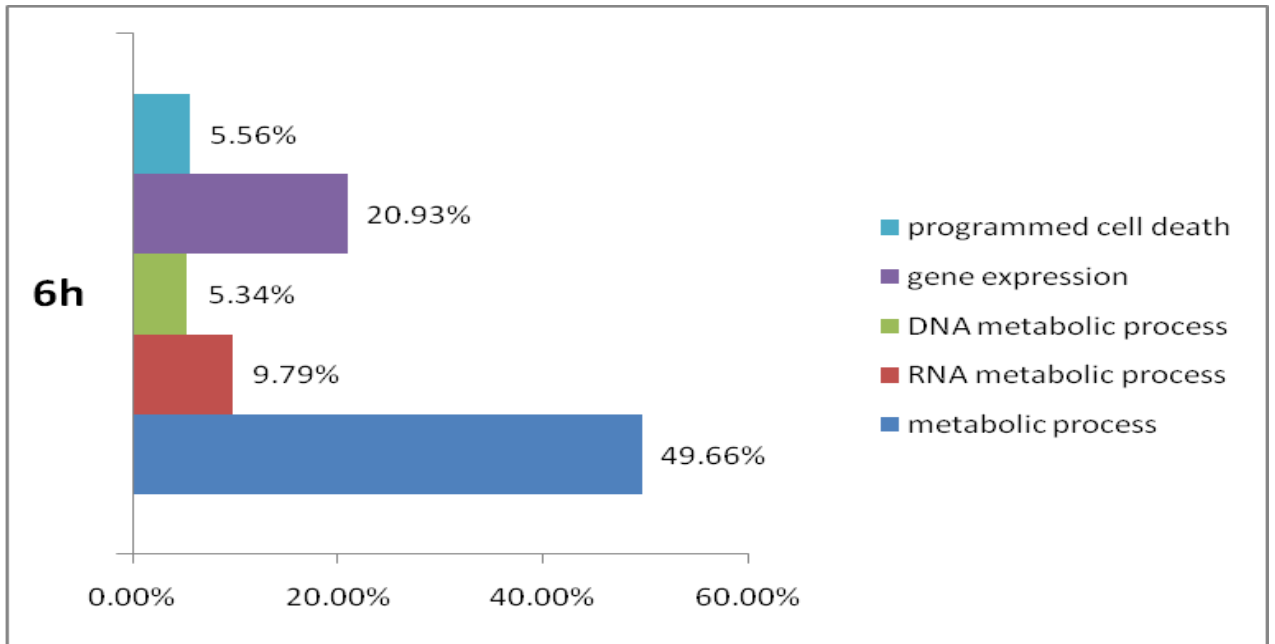
**Figura9.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base all'origine geografica (ANOVA a due vie) a 24h dall'esposizione al freddo.



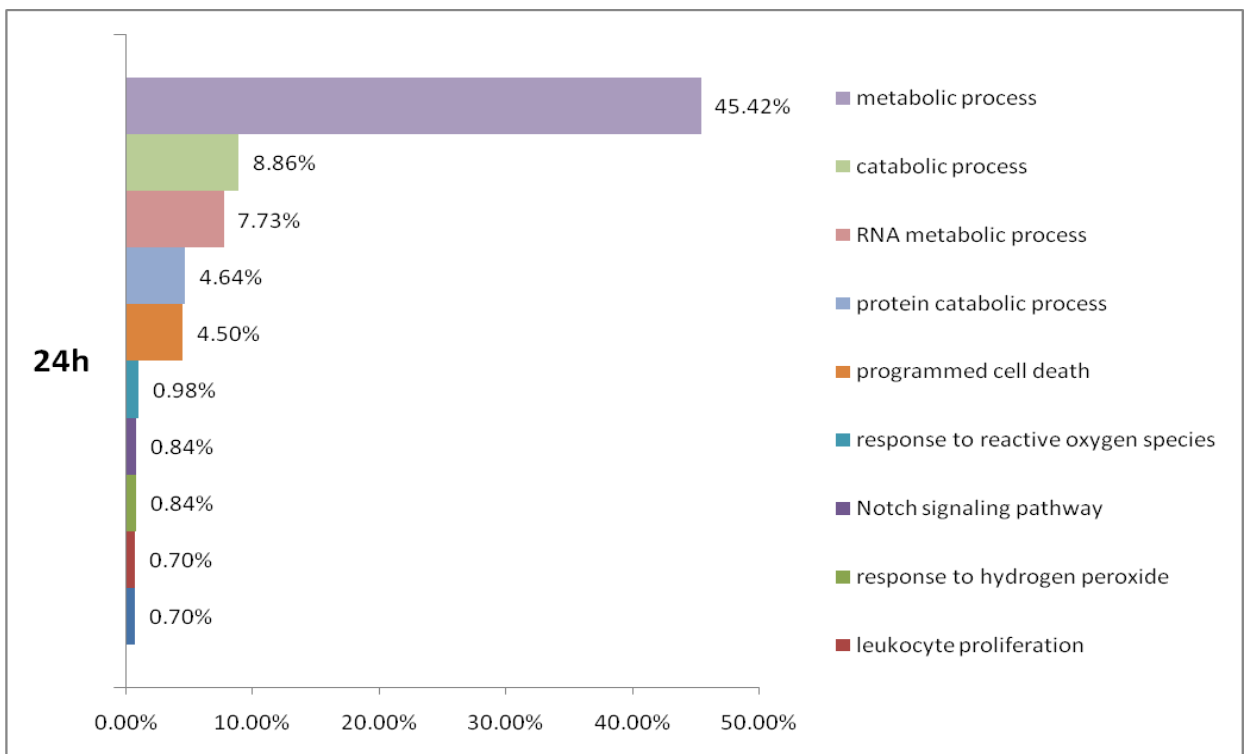
**Figura10.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base all'origine geografica (ANOVA a due vie) a 21d dall'esposizione al freddo.



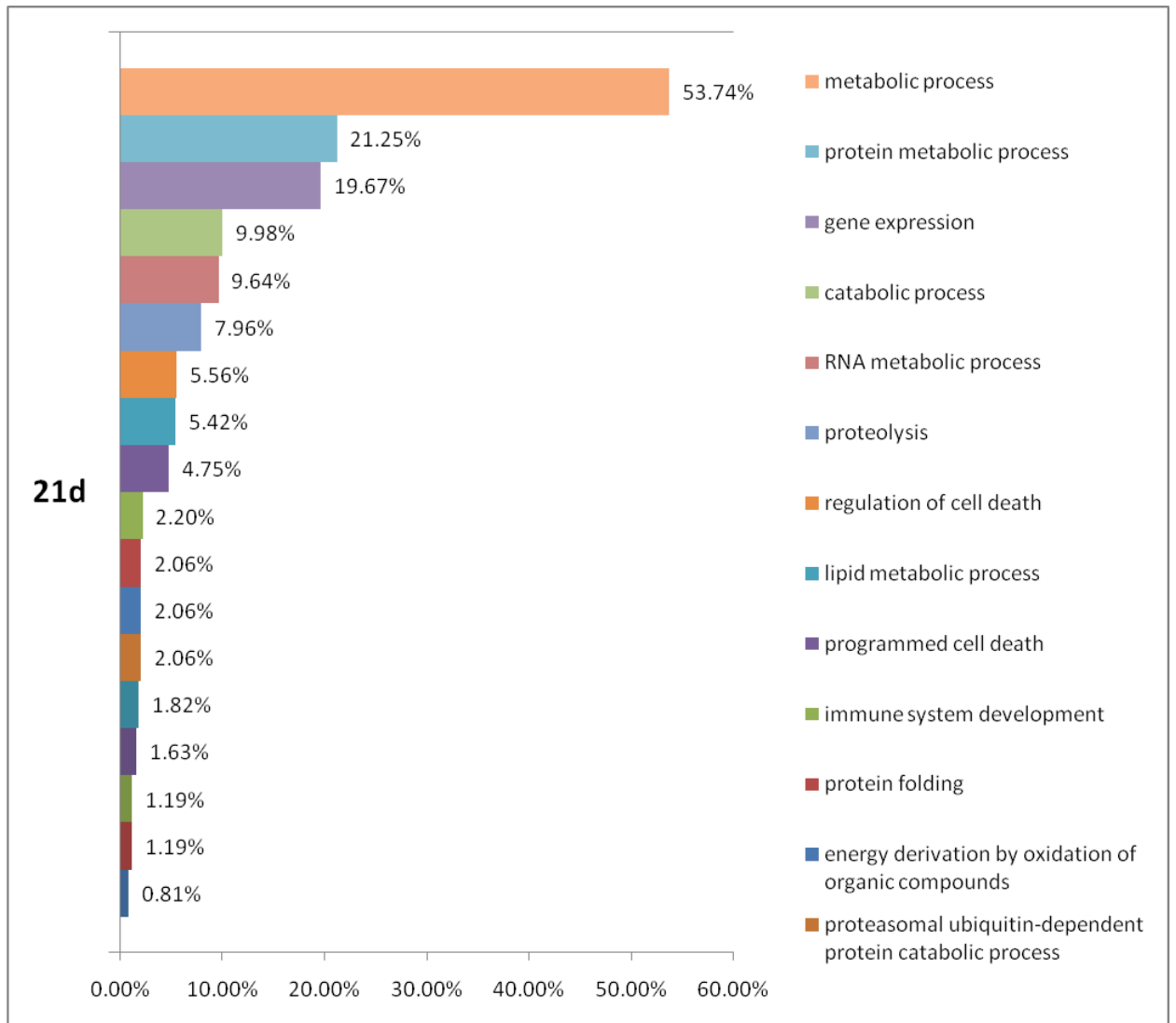
**Figura11.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base al trattamento (ANOVA a due vie) a 0h dall'esposizione al freddo.



**Figura12.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base al trattamento (ANOVA a due vie) a 6h dall'esposizione al freddo.



**Figura13.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base al trattamento (ANOVA a due vie) a 24h dall'esposizione al freddo.



**Figura 14.** Principali processi presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base al trattamento (ANOVA a due vie) a 21d dall'esposizione al freddo.

Nei paragrafi seguenti sono riportate alcune liste dei geni differenzialmente espressi coinvolti nei processi biologici peculiari della risposta al freddo e delle differenze geografiche.

### 3.4.2.1 Origini geografiche e metabolismo energetico

La componente geografica identificata con l'ANOVA a due vie risulta essere costituita principalmente da processi biologici coinvolti nel metabolismo energetico (Appendice E). Il GO:0006091: *generation of precursor metabolites and energy* è presente in tutti i tempi, sempre con FDR molto bassi, ed è costituito dai geni elencati in tab.8.

Gene
<i>ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F<sub>0</sub> complex, subunit C3 (subunit 9)</i>
<i>ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F<sub>1</sub> complex, beta polypeptide</i>
<i>ATPase inhibitory factor 1</i>
<i>ATPase, H<sup>+</sup> transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2</i>
<i>cytochrome c oxidase subunit 1</i>
<i>ERO1-like beta (S. cerevisiae)</i>
<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa</i>
<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase)</i>
<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2</i>
<i>acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain</i>
<i>amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase</i>
<i>cytochrome b-561 domain containing 2</i>
<i>cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1</i>
<i>enolase 1, (alpha)</i>
<i>enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal</i>
<i>fatty acid 2-hydroxylase</i>
<i>fatty acid desaturase 2</i>
<i>glucokinase (hexokinase 4)</i>
<i>glucosamine-6-phosphate deaminase 1</i>
<i>glucose-6-phosphatase, catalytic subunit</i>
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 6;</i>
<i>glycogen synthase 1 (muscle)</i>
<i>hexokinase 2 pseudogene; hexokinase 2</i>
<i>isocitrate dehydrogenase 2 (NADP<sup>+</sup>), mitochondrial</i>
<i>lactate dehydrogenase B</i>
<i>malate dehydrogenase 1B, NAD (soluble)</i>
<i>malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial</i>
<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)</i>
<i>phosphoglucomutase 1</i>
<i>phosphorylase, glycogen, muscle</i>
<i>protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit</i>
<i>similar to Pyruvate kinase, isozymes M1/M2 (Pyruvate kinase muscle isozyme)</i>
<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>
<i>Thioredoxin</i>
<i>thioredoxin reductase 3</i>
<i>ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein-like; ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein</i>

**Tabella8.** Elenco dei geni coinvolti nel GO:0006091: *generation of precursor metabolites and energy*.

### 3.4.2.2 Basse temperature e immunodepressione

Le diverse tipologie di analisi effettuate sui profili di espressione delle branchie esposte a  $6,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$  (ANOVA a due vie, SAM) confermano i dati riportati in letteratura e i risultati ottenuti per il fegato. Numerosi geni coinvolti nella risposta immunitaria risultano sotto-espressi fin dai primi tempi di esposizione al freddo, e aumentano sempre di più quando l'esposizione diventa cronica, determinando una considerevole immunodepressione. Di seguito sono elencati i principali geni differenzialmente espressi coinvolti nella risposta immunitaria alle basse temperature.

Gene
<i>B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)</i>
<i>CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II</i>
<i>SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit</i>
<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 5</i>
<i>cytokine induced apoptosis inhibitor 1</i>
<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29)</i>
<i>interferon regulatory factor 1</i>
<i>peroxiredoxin 3</i>
<i>phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)</i>
<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
<i>similar to Mast/stem cell growth factor receptor precursor (SCFR)</i>
<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>
<i>transcription elongation factor A (SII)</i>
<i>transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)</i>
<i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i>
<i>vacuolar protein sorting 33 homolog A (S. cerevisiae)</i>
<i>zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa</i>
<i>Chemokine</i>
<i>MHC class II</i>
<i>NK-cell</i>
<i>granzyme B</i>
<i>phospholipase C</i>
<i>NOD3</i>
<i>T-cell surface glycoprotein CD8</i>
<i>lymphocyte cytosolic protein 2 SH2</i>
<i>leukocyte surface antigen CD53</i>
<i>CCL20</i>
<i>C1q-like</i>
<i>T-cell surface glycoprotein CD3</i>

**Tabella9.** Elenco dei geni coinvolti nel GO:0002520 *immune system development*.

### 3.4.2.3 Basse temperature e angiogenesi

Se esposte a basse temperature, alcune specie aumentano la propria rete vascolare per minimizzare gli effetti della ridotta diffusione di ossigeno e dell'aumentata viscosità del sangue (Herbert et al., 2009). Tra i numerosi processi biologici coinvolti nella risposta al freddo nel fegato, ne sono stati identificati alcuni riferiti all'angiogenesi (GO:0001568 *blood vessel development*, GO:0001525 *angiogenesis*, GO:0048514 *blood vessel morphogenesis*). Tra i geni riportati in tab.10, molti coincidono con la classificazione dei geni angiogenetici effettuata da Herbert e collaboratori (2009).

Gene
<i>angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1</i>
<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
<i>hemoglobin, zeta</i>
<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29)</i>
<i>interferon regulatory factor 1</i>
<i>peroxiredoxin 3</i>
<i>phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)</i>
<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
<i>vascular endothelial growth factor A</i>
<i>mitogen-activated protein kinase 7, MAPK7</i>
<i>angiopoietin-like 4</i>
<i>heme oxygenase (decycling) 1, HO1</i>
<i>histone deacetylase 7</i>
<i>hypoxia inducible factor 1 alpha subunit, HIF1</i>
<i>apolipoprotein E1, E2</i>
<i>VEGFR</i>
<i>renin, REN</i>
<i>endothelin converting enzyme-1, ECE-1</i>

**Tabella10.** Elenco dei geni coinvolti nei GO:0001568 *blood vessel development* e GO:0001525 *angiogenesis*.

#### 3.4.2.4. Stress termico e protein folding

E' noto in letteratura che lo stress termico (sia *heat stress* che *cold stress*) influenza l'espressione di alcuni geni, definiti chaperoni, che hanno il ruolo di garantire il corretto ripiegamento delle proteine durante condizioni di stress cellulare. La risposta trascrizionale al freddo identificata in questo studio coinvolge anche tali geni. Nel profilo di espressione di fegato e branchia degli individui trattati è presente una sovra-espressione di numerosi geni coinvolti nel *protein folding*, tra cui hsp70, hsp40, hsp10 e altri chaperoni molecolari, principalmente a 21d dall'esposizione a  $6,8 \pm 0,3$  °C (tab.11).

Gene
<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1</i>
<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 25</i>
<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12</i>
<i>SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)</i>
<i>heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)</i>
<i>heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)</i>
<i>heat shock 90kDa protein</i>
<i>nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 21</i>
<i>peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)</i>
<i>prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)</i>
<i>serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47)</i>
<i>translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)</i>
<i>tubulin folding cofactor B</i>

**Tabella11.** Elenco dei geni coinvolti nel GO:0006457 *protein folding*.

### 3.4.3 Analisi in real-time RT-PCR

Per assicurare e confermare l'omogeneità dei *pool*, i singoli campioni di RNA di branchie (controlli e trattati) sono stati analizzati in *real-time* RT-PCR ai tempi 0h e 21d per i geni MDH (*malate dehydrogenase*), PGK-1 (*phosphoglycerate kinase 1*), SOD (*superoxide dismutase*) e BCR (*B-cell receptor*).

MDH e PGK1 sono geni del metabolismo energetico coinvolti nel ciclo di Krebs, mentre BCR è coinvolto nella risposta immunitaria e SOD codifica un importante enzima detossificante.

Il t-test permette di confrontare i valori di *fold change* tra gruppi di individui trattati e controlli e affermare se la differenza tra i due gruppi è statisticamente significativa. Ciò dimostra anche una buona omogeneità dei singoli campioni, che possono quindi essere raggruppati in *pool* per le analisi con i *microarray*. I risultati di tale analisi statistica rivelano che in fase acuta l'espressione di PGK1 e SOD non viene condizionata dalla bassa temperatura, mentre in fase cronica sí. Al contrario, l'espressione dei geni MDH e BCR risente precocemente della diminuzione di temperatura, per cui si possono classificare tali geni all'interno della prima risposta al freddo (*early response*) (tab.12).

Geni	<i>p-value</i> 0h	<i>p-value</i> 21d
<b>MDH</b>	0,0052 *	5,87582E-06 *
<b>PGK1</b>	0,1650	0,0204 *
<b>BCR</b>	2,98359E-06 *	1,46675E-09 *
<b>SOD</b>	0,7113	0,0012 *

**Tabella 12.** T-test dei valori di *fold change* dei singoli campioni di RNA in q-PCR. \* Valori significativi per *p-value* < 0,05.

### 3.4.4 Confronto dei dati di branchie e fegato (Veneto)

I geni in comune tra i due tessuti negli stessi esemplari di *S. aurata*, campionati ai diversi tempi dell'esperimento, sono coinvolti nei principali *pathway* precedentemente identificati, che sembrano essere quelli responsabili della risposta al freddo in tale specie. In particolare, nella risposta comune tra fegato e branchia, dopo 21 giorni di esposizione alle basse temperature, si identificano geni sovra-espressi coinvolti nel metabolismo lipidico, nell'apoptosi (GADD45, RTP801, TP53-*regulating kinase*, *programmed cell death protein 2*), nel *protein folding* (*hsp70-binding protein 1*, *mitochondrial chaperone BCS1*, *tubulin folding cofactor B*), nell'assemblaggio dei microtubuli (*tubulin alpha 1*, *tuba 1*) e geni sotto-espressi coinvolti nella risposta immunitaria (*chemokine*, *MHC class II*, *NK-cell*, *granzyme B*, *phospholipase C*, NOD3, *T-cell surface glycoprotein CD8*, *lymphocyte cytosolic protein 2 SH2*, *MHC class II  $\alpha$  e  $\beta$* , *Leukocyte surface antigen CD53*, CCL20, *C1q-like*, *T-cell surface glycoprotein CD3*) (Appendice F).

Tempi		Fegato	Branchia	Geni in comune	Tot geni in comune
0h	<i>UP-regulated</i>	109	579	20	44
	<i>DOWN-regulated</i>	89	577	24	
6h	<i>UP-regulated</i>	709	120	53	150
	<i>DOWN-regulated</i>	711	388	97	
24h	<i>UP-regulated</i>	1548	279	130	339
	<i>DOWN-regulated</i>	1576	497	209	
21d	<i>UP-regulated</i>	1835	675	313	700
	<i>DOWN-regulated</i>	2360	867	387	

**Tabella13.** Numero di geni differenzialmente espressi per fegato e branchia e geni in comune, ad ogni tempo analizzato dopo la diminuzione di temperatura.

## 4 Discussione

### 4.1 Parte generale

I pesci, come molti organismi acquatici, sono ectotermi, nel senso che la loro temperatura corporea varia al variare di quella ambientale. Ogni specie nel corso della sua evoluzione si è adattata a vivere in un determinato intervallo di temperatura ambientale e, perciò, l'esposizione a temperature fuori dal *range* ottimale può essere stressante o, addirittura, fatale.

In che modo le popolazioni e le specie reagiscono ai cambiamenti climatici è una questione di importanza centrale per diverse discipline. Il profilo di espressione genica può servire come strumento per legare il genotipo alla fisiologia e al fenotipo. Ne consegue che popolazioni di alcune specie, che vivono in ambienti con condizioni termiche diverse dovrebbero rivelare le basi genetiche dell'adattamento termico (Whithead e Crawford 2006).

All'interno del loro *range* ottimale di temperatura ci si aspetta che le potenzialità fisiologiche degli ectotermi per far fronte alle normali variazioni stagionali e alle condizioni energetiche dei tessuti debbano essere massime (Morley et al., 2009). Tuttavia, di fronte a condizioni estreme, o vicino i limiti di tolleranza, la capacità aerobica si riduce, tanto più che l'energia disponibile viene richiesta per far fronte ai processi metabolici di routine e i meccanismi di rifornimento di ossigeno diventano sub-ottimali (Pörtner et al., 2007).

In prossimità del limite caldo o freddo della tolleranza termica, il pesce può soffrire di ipossia sistemica (anche se le acque sono ben ossigenate), con conseguente perdita di capacità aerobica nell'intero organismo. Questa perdita non è causata dalla ridotta concentrazione dell'ossigeno nell'ambiente, ma sembra essere dovuta alla limitata capacità dei meccanismi di rifornimento di ossigeno (ventilazione, circolazione) a

coprire il fabbisogno di ossigeno di un animale in funzione della temperatura (Kyprianou et al., 2010). Questo ha sviluppato un principio unificante secondo cui i limiti fisiologici degli ectotermi marini vengono definiti dalla disponibilità di ossigeno (Portner 2002, 2006; Peck et al., 2007). Lo stress da freddo ha numerosi effetti deleteri a livello cellulare e dell'intero organismo, tra cui è stata documentata la destabilizzazione delle interazioni idrofobiche, che determina proteine danneggiate o ripiegate in modo non corretto. Ciò induce l'attivazione dei chaperoni molecolari (Donaldson et al., 2008, Somero 2010, Patarnello et al., 2011). La risposta fenotipica dell'orata allo stress da freddo, nonché i sintomi associati alla patologia “*winter disease*”, sono stati ben descritti in lavori recenti (Kyprianou et al., 2010, Ibarz et al., 2010b). Entrambi i tessuti analizzati in questo studio, seppur per motivi diversi, sono coinvolti nella risposta alle basse temperature. Il fegato è la sede principale del metabolismo e sembra essere l'organo più affetto dalla depressione metabolica conseguente alla discesa di temperatura. Dopo l'esposizione dei pesci alle basse temperature, infatti, il fegato diventa steatosico per una significativa disfunzione epatica, probabilmente associata ad un alterato metabolismo dei grassi, che determina la rapida deposizione di grassi non polari (Ibarz et al 2007). La branchia è un organo multifunzionale, coinvolto nella respirazione, nell'osmoregolazione, nell'escrezione dei cataboliti azotati e anche nella risposta immunitaria, essendo sede del MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*). Essa rappresenta il primo contatto dell'organismo con l'ambiente esterno e, dopo la diminuzione della temperatura, si notano un disequilibrio nel bilancio dell'ossigeno e uno stato di immunodepressione che aumenta nel corso del tempo. La nostra scelta di indirizzare le ricerche sull'analisi del trascrittoma di fegato e branchia è rivolta allo studio della risposta al freddo in *S. aurata*, focalizzandosi sul profilo d'espressione degli organi che sembrano avere un ruolo chiave durante la discesa della temperatura. Le informazioni raccolte, per la prima volta in questo studio, sul trascrittoma di orata

esposta a stress da freddo acuto e cronico, possono ben integrare lavori simili che hanno riportato alterazioni metaboliche e fisiologiche associate alla *winter stress syndrome* in questa specie (Ibarz et al., 2007; Kyprianou et al., 2010).

## **4.2 Risposta al freddo in *Spaurs aurata***

### **4.2.1 Risposta acuta alle basse temperature**

#### 4.2.1.1 Risposta allo stress ossidativo

La risposta trascrizionale alle basse temperature aumenta considerevolmente dopo 6 ore dalla diminuzione di temperatura e viene mantenuta per tre settimane, sia in termini di numero di geni significativamente sovra o sotto espressi, che per i loro valori di *fold change*. La prima risposta trascrizionale al freddo sembra essere legata allo stress ossidativo, all'induzione di apoptosi e alla risposta cellulare verso gli antiossidanti. Tutto questo è in accordo con l'ipotesi che gli effetti immediati dell'esposizione alle basse temperature includono la rottura dell'equilibrio sistemico dell'ossigeno (Kyprianou et al., 2010, Feidantis et al., 2009). I livelli di ossigeno nei fluidi corporei diminuiscono, determinando stress ossidativo e riflettendo un'insufficiente capacità aerobica dei mitocondri alle basse temperature (Portner 2001). Come conseguenza immediata della diminuzione di temperatura (0h, 6h), risultano sovra-espressi molti fattori di trascrizione o regolatori trascrizionali, principalmente coinvolti nella risposta allo stress ossidativo. Come in altre condizioni di stress, l'esposizione a temperature estreme porta ad un'aumentata produzione di ROS (*reactive oxygen species*), che determinano stress ossidativo. La perossiredossina è un enzima antiossidante che svolge un ruolo importante nell'eliminazione dei perossidi prodotti durante il metabolismo. Può partecipare nella cascata di segnale di fattori di crescita e TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*), regolando le concentrazioni intracellulari di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il gene che codifica tale enzima è sovra-espresso nelle branchie sin dai primi tempi di esposizione a  $6,8 \pm 0,3$

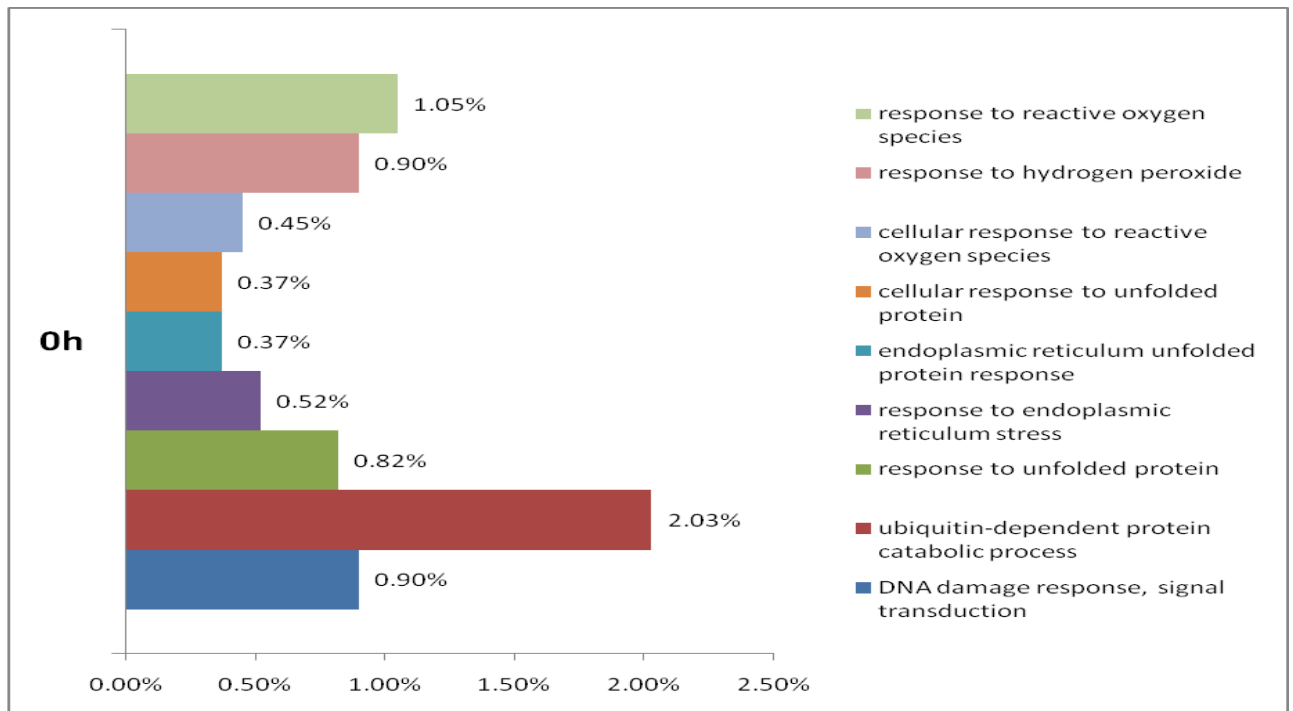
°C (0h, 6h). Il principale sistema sensore/effettore nelle cellule eucarioti si basa sull'attivazione di Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). In assenza di stress cellulare Nrf2 è solitamente localizzato nel citosol, complessato con Keap1 (*Kelch-like erythroid cell-derived protein*). Sotto condizioni di stress ossidativo, Nrf2 viene fosforilato, per cui si dissocia da Keap1 e trasloca nel nucleo, dove si lega ad un dominio di DNA chiamato ARE (*Antioxidant Response Element*), inducendo l'espressione di mRNA di geni anti-ossidanti (es. *heme oxygenase 1*, HO1), ma anche attivando il suo stesso inibitore Keap1 (Kaspar et al 2009).

IL'attivazione di Nrf2 in cellule di mammiferi è nota per essere veloce, verificandosi all'interno di 15 minuti dalla comparsa dello stress ossidativo. La significativa sovra-espressione dei geni target di Nrf2 a 0h (HO1, Keap1) fornisce un forte sostegno all'ipotesi di una prima attivazione di questa risposta fondamentale allo stress ossidativo nel fegato e nelle branchie delle orate esposte a basse temperature.

L'enzima eme ossigenasi-1 (HO-1) è una proteina legata alla risposta allo stress e la sua induzione è associata alla protezione della cellula dallo stress ossidativo. E' l'enzima limitante nel catabolismo dell'eme e scinde l'eme in biliverdina IXa, monossido di carbonio (CO) e ferro (Kikuchi et al., 2005). La sopravvivenza cellulare durante l'esposizione a stress ambientali è correlata ad alti livelli di HO-1 (Ghattas et al., 2002). Il gene che codifica tale enzima (*heme oxygenase 1*) risulta sovra-espresso in fegato e branchia (rispettivamente f.c.= 3,9 e 2,5) esclusivamente a 0h dall'esposizione alle basse temperature, indicando una partecipazione di HO1 nella risposta cellulare al freddo fin dai primi momenti.

Un'ulteriore prova dell'attivazione precoce della risposta allo stress ossidativo è l'aumento nella trascrizione di mRNA di DDIT3 (*DNA-damage-inducible transcript 3*), meglio noto come CHOP (*C/EBP homology protein*). CHOP è un fattore di trascrizione indotto dallo stress, che può promuovere sia l'apoptosi che aumentare l'espressione di

GADD34 (*growth arrest and DNA damage 34*), un fattore chiave di sopravvivenza. E' stato anche dimostrato essere direttamente sovra-espresso come conseguenza dello stress ossidativo (Ariyama et al 2008), ed è stato ritrovato sovra-espresso in entrambi i tessuti a 0h e 6h.



**Figura15.** Processi biologici coinvolti nella prima risposta allo stress presenti nella lista di geni differenzialmente espressi in base al trattamento (ANOVA a due vie) nelle branchie a 0h dall'esposizione al freddo.

#### 4.2.1.2 Danno cellulare e chaperoni

CHOP, gene descritto nel paragrafo precedente, è uno dei fattori chiave di trascrizione che regolano la complessa risposta cellulare allo stress del reticolo endoplasmatico (ER), anche chiamata UPR (*unfolded protein response*) (Kapoor & Sanyal 2009). Essa viene attivata in seguito ad accumulo nel lume del reticolo endoplasmatico di proteine danneggiate o ripiegate non correttamente. La risposta UPR ha due scopi: in un primo momento ripristinare le normali funzioni cellulari, anche incrementando la produzione di chaperoni molecolari; se il danno cellulare risulta irreparabile, la risposta UPR avvia la morte cellulare programmata. Un ampio set di geni codificanti proteine coinvolte nella UPR risulta significativamente sovra-espresso a 0h nella branchia (CHOP, Nrf2, AMFR --*autocrine motility factor receptor*--) e a 21 giorni dall'esposizione a  $6,8 \pm 0,3$  °C nel fegato. Sono incluse sia proteine con il ruolo di chaperoni molecolari (hsp70, hsp90, DNAJ -hsp40-) sia proteine che costituiscono il sistema di degradazione proteica associato al reticolo endoplasmatico (ERAD, *Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation*) come *derlin-1* (DER1) e *selenoprotein S* (SELS). DER1 è un componente funzionale dell'ERAD. Può agire formando un canale che permette la traslocazione delle proteine mal ripiegate nel citoplasma, dove subiscono il processo di ubiquitinazione e vengono degradate dal proteasoma. SELS è coinvolta nel processo di degradazione delle proteine mal ripiegate presenti nel lume del reticolo endoplasmatico (ER) e partecipa nel loro trasferimento dall'ER al citoplasma, insieme a DERL1, dove sono distrutte dal proteasoma secondo il processo ubiquitina-dipendente (Meusser et al 2005, Calduch-Giner 2010).

Chaperoni e *heat shock protein* sono sovra-espressi per aumentare la capacità di ripiegamento delle proteine da parte dell'ER (Roberts et al 2010). La proteina Hsp70 è nota per assistere al ripiegamento delle catene polipeptidiche nascenti e media la riparazione e la degradazione delle proteine alterate o denaturate (Basu et al., 2002,

Kiang & Toskos 1998). Il gene hsp70 risulta sovra-espresso nel fegato in condizioni di stress acuto e cronico in numerosi dati riportati in letteratura (Hori et al., 2010, Saera Vila et al., 2009, Calduch-Giner et al., 2010). In linea con queste osservazioni, nel profilo di espressione epatico delle orate sottoposte a  $6,8 \pm 0,3$  C° i geni hsp70BP (*Binding Protein*) e hsp90 sono risultati sovra-espressi a 24h (f.c.=2,6) e 21d (f.c.=3,7). Il profilo trascrizionale delle branchie ha dato risultati lievemente diversi, probabilmente poiché le cellule epatiche risentono dello stress termico con maggiore intensità e in tempi più rapidi. I geni hsp70 e *hsp90 co-chaperone Cdc37* sono, infatti, sovra-espressi nella branchia solo dopo 21 giorni di esposizione al freddo.

Tali risultati confermano i dati in letteratura e consolidano l'idea che la sovra-espressione di *heat shock protein* e chaperoni sia la risposta anche allo stress da freddo.

## **4.2.2 Risposta cronica alle basse temperature**

### 4.2.2.1 Tubuline

Oltre a specifici processi biologici (risposta allo stress ossidativo, UPR), i risultati di *microarray* hanno identificato due grandi importanti famiglie proteiche, sovra-esprese a tutti i tempi analizzati in entrambi i tessuti: tubuline  $\alpha$  e  $\beta$ . Una sovra-regolazione delle tubuline è stata osservata anche nel proteoma di fegato di orate mantenute a 8°C per 10 giorni (Ibarz et al 2010a); gli autori conclusero che tale sovra-regolazione fosse la conseguenza dello stress ossidativo e dell'induzione di apoptosi. Ciò è in accordo col fatto che durante l'esposizione alle basse temperature l'assemblaggio dei microtubuli e la loro funzione siano compromesse e il citoscheletro vada incontro ad un radicale cambiamento. A questo proposito, il caso dei pesci antartici è ancora una volta un confronto interessante per come questi pesci abbiano evoluto specifiche modificazioni di sequenza delle tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  per far fronte alla produzione di microtubuli alle basse temperature (Detrich et al 2000).

Sono stati condotti altri studi per valutare gli effetti delle basse temperature sui microtubuli. Abdrakhamanova e collaboratori (2003) hanno identificato un rapido, transitorio e parziale disassemblaggio dei microtubuli nei *cultivar* di *Triticum aestivum* resistenti al freddo, che precede la formazione di microtubuli tolleranti al freddo e il recupero del tasso di crescita. L'analisi di espressione di alcuni geni ha rivelato una sovra-espressione di *tuba-1* nei *cultivar* resistenti al freddo.

I dati di microarray sono stati analizzati al fine di trovare geni codificanti proteine delle famiglie di  $\alpha$  e  $\beta$  tubuline.

Come si vede in tabella 13 le variazioni di espressione di alcuni geni di tubuline in risposta al freddo sono più rilevanti nel tessuto epatico e con l'aumentare del tempo; in particolare, *tuba1* si ritrova sovra-espresso significativamente sia nella risposta acuta che cronica (6h, 24h, 21d). Il gene *tubulin-folding cofactor B* (TBCB) è coinvolto nella formazione di eterodimeri tubulinici correttamente ripiegati e nella regolazione della dissociazione degli eterodimeri stessi. Tali risultati possono far supporre ad una risposta al freddo che coinvolga modificazioni strutturali a livello delle tubuline del citoscheletro. Non è possibile sapere se tali modifiche determinino danni cellulari o tentativi di resistere alle variazioni di temperatura.

Gene	0h		6h		24h		21d	
	Branchia	Fegato	Branchia	Fegato	Branchia	Fegato	Branchia	Fegato
<i>Tubulin <math>\alpha 1</math></i>	2	4	2,6	4,27	2,9	4	3,03	7,36
<i>Tubulin <math>\beta 1</math></i>							2,7	
<i>Tubulin <math>\beta 2</math></i>	2,2			3,4		6,9		5,7
<b>TBCB</b>						2	2,25	2,86
<i>Tuba1</i>				3,7		3,4	2	4,6
<i>Tubulin <math>\alpha 8</math></i>	0,4	2,6	0,38		0,25		0,23	3,5
<i>Tubulin <math>\delta</math></i>					0,5	0,45		

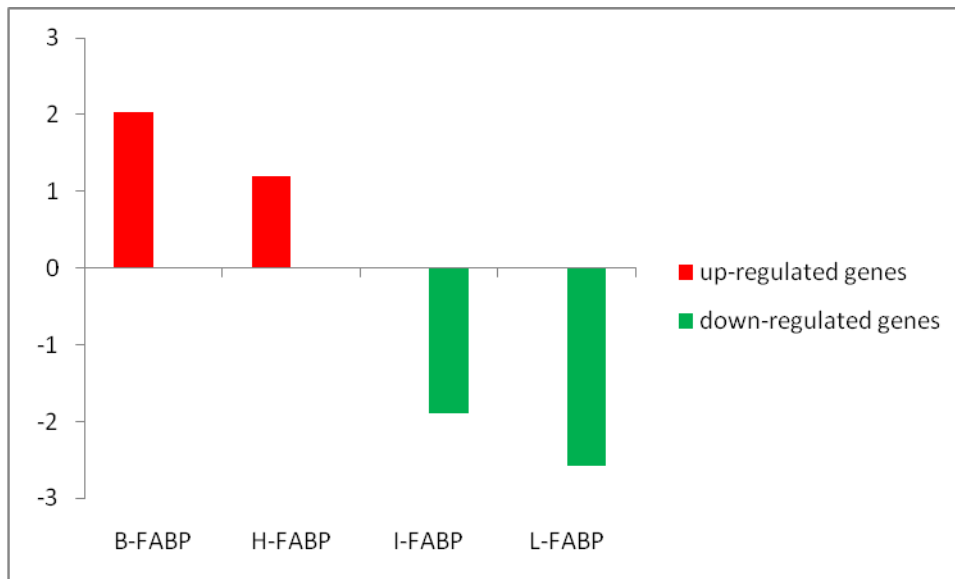
**Tabella13.** *Fold change* di alcuni geni presenti sul microarray di *S. aurata* appartenenti alla famiglia delle tubuline  $\alpha$  e  $\beta$ .

#### 4.2.2.2 Metabolismo lipidico

L'analisi del profilo di espressione genica del fegato dopo la diminuzione di temperatura ha identificato un ampio gruppo di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, sia per la ri-distribuzione delle risorse energetiche che per l'adattamento delle membrane cellulari. Secondo Ibarz e collaboratori (2005, 2007, 2010b), una delle principali conseguenze dell'esposizione al freddo sulla composizione del fegato è l'aumento della deposizione lipidica. Nella fig. 4 (parag.3.3.2) sono classificati i geni significativi coinvolti nel metabolismo lipidico. A 6h dalla diminuzione della temperatura sono presenti numerosi geni sotto-espressi (coinvolti nella  $\beta$ -ossidazione lipidica e nella sintesi degli steroidi) e un numero inferiore di geni sovra-espressi (coinvolti nella sintesi del triacilglicerolo e nel processo di adattamento delle membrane). Lo stress da freddo ha indotto un rapido aumento della domanda energetica, che determina la mobilitazione delle riserve metaboliche e il loro *uptake* da parte dei tessuti (Calduch-Giner et al., 2010). Nei pesci i lipidi sono la principale fonte di energia, diversamente dai mammiferi per i quali i carboidrati costituiscono la fonte più importante. L'enzima lipoprotein lipasi (LPL) idrolizza le lipoproteine circolanti ricche

in trigliceridi, inducendo lo stoccaggio di lipidi nel fegato. La steatosi epatica è, infatti, un comune effetto della *winter disease* (Gallardo et al., 2003; Ibarz et al., 2005, 2007, 2010a 2010b). Il rapido accumulo di lipidi è stato proposto come uno dei principali fattori associati al probabile mal funzionamento del fegato (Ibarz et al., 2010b). Le FABP (*fatty acid binding protein*) rappresentano una famiglia di proteine responsabile del trasporto e del mantenimento intracellulare dei lipidi derivati dagli acidi grassi. Esse giocano un ruolo importante nel metabolismo energetico, poiché uno dei primi aspetti dell'adattamento dei pesci a condizioni di stress consiste nella mobilizzazione delle riserve energetiche (Bernlohr et al., 1997). E' stato dimostrato che l'espressione delle FABP viene modulata dallo stress cronico, come suggerito dall'analisi di proteomica comparativa effettuata da Alves e colleghi (2010), che hanno investigato sulla risposta allo stress in orata, dopo ripetuta manipolazione in vasche ad alta densità.

Dopo 21 giorni di esposizione al freddo, nel profilo di espressione del fegato dei trattati si è identificata una sovra-espressione delle FABP tessuto-specifiche di cervello e cuore B-FABP e H-FABP (*brain-fatty acid binding protein* e *heart-fatty acid binding protein*), come meccanismo di risposta all'aumentata richiesta di energia. E' interessante notare che sono risultate sotto-espresse le FABP specifiche del fegato e dell'intestino L-FABP e I-FABP (*liver-fatty acid binding protein* e *intestinal-fatty acid binding protein*) (fig.16).



**Figura16.** Il grafico mostra i valori di *fold-change* (asse Y) dei geni codificanti le FABP (*fatty acid binding protein*) tra i trattati e i controlli dopo 21 giorni dall'esposizione al freddo nel fegato. B-FABP=*brain-FABP*, H-FABP=*heart-FABP*, I-FABP=*intestinal-FABP*, L-FABP=*liver-FABP*.

L'enzima  $\Delta$ -9 desaturasi è coinvolto nell'adattamento delle membrane (*homeoviscous adaptation*, HVA) (Cossins et al., 2002, Gracey et al., 2004, Hazel, 1995), un processo che promuove la modificazione della composizione lipidica delle membrane biologiche per assicurare la loro fluidità a temperature molto basse. Il rimodellamento dei fosfolipidi di membrana modifica le capacità ossidative dei mitocondri. I risultati di *microarray* hanno rivelato una sovra-espressione del gene  *$\Delta$ -9 desaturase 1* a 24h e 21d dall'esposizione a  $6,8 \pm 0,3$  °C nel fegato e nelle branchie di *S. aurata*. L'attivazione di tale enzima, che determina cambiamenti nel livello di saturazione del doppio strato fosfolipidico in risposta alle basse temperature, è un meccanismo comune nei pesci ed è stato riportato anche nella carpa (*Cyprinus carpio*) (Guderley, 2003).

Alle normali condizioni di temperatura le membrane lipidiche sono fondamentali per il trasporto intracellulare dell'ossigeno (Dutta & Popel, 1995). Alcuni dati in letteratura dimostrano, però, che l'aumentata presenza di acidi grassi saturi e colesterolo rende le membrane più rigide e più difficoltoso il passaggio dell'ossigeno attraverso le catene di

idrocarburi (Subczynski *et al.* 1991; Smotkin *et al.* 1991). Alla luce di queste considerazioni, l'adattamento delle membrane biologiche ai cambiamenti di temperatura (HVA) diventa fondamentale anche per favorire la diffusione dell'ossigeno all'interno della cellula (Sidell, 1998).

#### 4.2.2.3 Risposta immunitaria

Sia lo stress acuto che cronico modulano la risposta immunitaria nei pesci (Kassahn *et al.*, 2007, 2008). Lo stress da freddo non è un'eccezione; molti studi hanno, infatti, documentato che l'esposizione dei pesci alle basse temperature influisce sul sistema immunitario (Bly & Clem 1991, Engelsma *et al.*, 2003). Le nostre analisi di espressione genica confermano i risultati riportati in letteratura sui parametri immunologici a temperature al di sotto dei limiti di tolleranza (LeMorvan *et al.*, 1998, Contessi *et al.*, 2006), identificando una generale immunodepressione nella risposta a lungo termine. Come riportato da Demers e collaboratori (1997), lo stress cronico ha un effetto immunosoppressivo, mentre lo stress acuto aiuta sia i componenti cellulari che umorali del sistema immunitario innato. Il profilo di espressione del fegato delle orate esposte a  $6,8 \pm 0,3$  °C ha, infatti, rivelato una sovra-espressione del gene *lysozyme-g-like protein* dopo 6 ore di esposizione al freddo, mentre dopo 24 ore risultano sovra-espressi *lysozyme-g-like protein*, *complement component C7 precursor* e *complement factor I precursor*. Questo può essere spiegato da uno "slancio" iniziale del sistema immunitario come risposta acuta ad una situazione di stress (Bayne *et al.*, 2001). Tuttavia, nel corso dell'esperimento, si osserva una sotto-espressione di numerosi geni correlati all'immunità, poiché l'esposizione prolungata al freddo (21d) determina un'immunodepressione generalizzata (parag.3.4.2.2).

E' stato identificato l'andamento di espressione nel corso del tempo di alcuni geni del sistema del complemento nei due tessuti (tab.14). Essendo il fegato la principale sede in

cui vengono sintetizzati tali componenti, è anche l'organo maggiormente interessato nella risposta trascrizionale. Nella risposta acuta si rileva un'interessante sovra-espressione del C3, l'enzima chiave nel processo di attivazione della cascata del complemento. Probabilmente la sua trascrizione avviene nel tentativo iniziale di rispondere allo stress termico (0h, 6h, 24h) ma, con il persistere delle condizioni di stress, gli effetti a lungo termine sul sistema del complemento e sull'intero sistema immunitario sono negativi.

Analisi sierologiche di *S. aurata* durante il periodo invernale (Tort et al., 1998) hanno confermato una debole condizione immunologica causata dalla soppressione grave di numerosi componenti del sistema immunitario innato e acquisito (l'attività del complemento e del lisozima, la conta dei linfociti e i macrofagi). In questa condizione fisiologica alterata, che non coinvolge solo il sistema immunitario ma anche altri processi metabolici fondamentali dell'organismo, si prevede che alcuni patogeni opportunisti si manifestino e contribuiscano allo sviluppo della *winter stress syndrome*.

Gene	0h		6h		24h		21d	
	Fegato	Branchia	Fegato	Branchia	Fegato	Branchia	Fegato	Branchia
<b>C1QC</b>			0,5		0,29	0,5	0,41	0,2
<b>C2</b>							0,39	
<b>C3</b>	1,18	3,12			0,07		0,13	
<b>C5</b>							0,41	0,4
<b>C7</b>					3,86			
<b>C8G</b>			0,72				0,44	
<b>MASP1</b>			0,58	0,5		0,33	0,29	
<b>CD59</b>					0,28		0,28	0,3
<b>lysozyme</b>			3,34		3,9	0,38		

**Tabella14.** *Fold change* di alcuni componenti del sistema del complemento nei due tessuti ai quattro tempi analizzati dalla diminuzione della temperatura.

GENE FUNCTIONS	
C1QC	Yield first component of complement system C1
C2	Part of the classical pathway; combines with factor 4b to generate the C3 or C5 convertase
C3	Central role in the activation of the complement system in classical and alternative pathways
C5	Role in assembly the membrane attack complex
C7	Constituent of the membrane attack complex
C8G	Constituent of the membrane attack complex
MASP1	Functions in the lectin pathway of complement
CD59	Potent inhibitor of the complement membrane attack complex action

**Tabella15.** Descrizione delle funzioni dei geni riportati in tabella coinvolti nel sistema del complemento

(<http://www.uniprot.org/>).

#### 4.2.2.4 Angiogenesi

Dati in letteratura riportano che l'esposizione al freddo induce il fenomeno di neo-angiogenesi (Herbert et al., 2009). Alcune specie aumentano la propria rete vascolare per minimizzare gli effetti della ridotta diffusione di ossigeno e dell'aumentata viscosità del sangue, associate alle basse temperature. Sono stati identificati numerosi geni definiti angiogenetici, in particolare HIF1 (*hypoxia inducible factor1*), MAPK1 (*mitogen-activated protein kinase 1*), angiopoietin, apolipoprotein E, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) (Herbert et al., 2009).

Si ritiene che l'attivazione dell'angiogenesi avvenga durante gli stadi iniziali dell'abbassamento delle temperature, prima che gli animali inizino ad acclimatarsi. E' stato dimostrato che nei ratti esposti a 4°C si ha un aumento di espressione del gene VEGF (f.c.=2,7), un attivatore chiave del processo di angiogenesi (Asano et al., 1997, 1999).

Durante l'angiogenesi, viene attivato MAPK1 nelle cellule endoteliali (EC). Tale gene ha il compito di indurre la loro proliferazione, importante per la costituzione di nuovi vasi (Bullard et al., 2003), di bloccare l'apoptosi e promuovere la trascrizione di VEGF. Anche il gene HIF1A (*hypoxia-inducible factor 1 alpha*), come MAPK1, può mediare la

trascrizione di VEGF (Pages et al., 2000; Berra et al., 2000) e il suo coinvolgimento nell'angiogenesi indotta dal freddo si adatta bene con la ridotta diffusione di ossigeno e l'aumentata viscosità del sangue che possono determinare l'ipossia dei tessuti.

Il profilo di espressione genica del fegato ha rivelato la sovra-espressione di alcuni geni angiogenetici a 6h, 24h e 21d, in particolare VEGFR2, *angiopoietin related protein 3* (ANGPTL3), apolipoprotein E e HIF1 *prolyl hydroxylase2*. Quest'ultimo catalizza la reazione che porta alla formazione di HIF- $\alpha$  *protein* nella forma attiva; è considerato un sensore cellulare dell'ossigeno che, in condizioni di normossia, lega HIF per degradarlo attraverso la via del proteasoma (Epstein et al., 2001).

Si può ipotizzare, pertanto, che l'attivazione del fenomeno di angiogenesi a livello epatico sia dovuta alla necessità di neovascolarizzazione del tessuto, causata dall'ipossia presente a livello cellulare dopo la diminuzione di temperatura.

### **4.3 Differenze nella risposta al freddo rispetto alle origini geografiche**

#### **4.3.1 Analisi di branchie di esemplari di *S. aurata* provenienti da due diverse regioni italiane**

L'idea che l'espressione genica sia almeno in parte ereditabile suggerisce che in determinate popolazioni sia il risultato di diversi regimi di selezione a livello locale. Le interazioni tra genotipo e ambiente costituiscono, quindi, l'essenza dell'adattamento locale.

Nel presente studio è stato ipotizzato che le diverse condizioni di temperatura esistenti nelle regioni geografiche di provenienza dei campioni analizzati (Sicilia e Veneto) abbiano selezionato differenze nella capacità di regolazione genica in risposta ai diversi regimi termici incontrati dalle due popolazioni di *S. aurata*.

#### 4.3.1.1 ANOVA a due vie nelle branchie di *S. aurata*

L'analisi della varianza a due vie (origine geografica vs trattamento) effettuata per i quattro tempi (0h, 6h, 24h, 21d) ha permesso di comprendere alcuni aspetti fondamentali dei diversi profili di espressione delle due popolazioni prese in esame. All'inizio dell'esperimento (0h dalla diminuzione di temperatura) si identificano notevoli differenze nel profilo di base rispetto alla geografia. Le primissime fasi della risposta acuta sono caratterizzate da notevoli differenze nella reattività di risposta all'abbassamento delle temperature tra gli individui provenienti dalle due regioni. In particolare, le orate venete, probabilmente per una maggiore abitudine a trovarsi in acque con temperature basse, rispondono alla diminuzione di temperatura in modo più rapido rispetto alle siciliane, che si ritrovano, invece, in condizioni ambientali inconsuete per l'organismo. Nei tempi immediatamente successivi alla diminuzione di temperatura (6 e 24h) le differenze tra le due popolazioni si riducono, lasciando ipotizzare che i meccanismi fisiologici alla base della risposta al freddo convergano in una risposta comune, con tempi di attivazione diversi. Dopo 21 giorni di esposizione a  $6,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  la risposta fisiologica si differenzia nuovamente in base all'origine geografica, probabilmente perché la temperatura dell'acqua inferiore ai  $10^{\circ}\text{C}$ , nonché la prolungata esposizione alla bassa temperatura, sono condizioni assolutamente inusuali per le popolazioni provenienti dal Sud Italia. Ciò probabilmente determina l'attivazione di meccanismi fisiologici e, quindi, di regolazione genica, diversi da quelli attivati nella risposta cronica delle orate autoctone di Valle Bonello. La componente geografica è costituita principalmente da *pathway* coinvolti nel metabolismo energetico e nello sviluppo di organi e tessuti (Appendice E). In particolare, il GO:0006091: *generation of precursor metabolites and energy* identifica tutti quei geni che partecipano a reazioni chimiche determinanti la formazione di metaboliti precursori da cui deriva l'energia, e a qualunque processo coinvolto nella liberazione di energia da queste sostanze (*ATP*

*synthase, ATPase, cytochrome c oxidase, NADH dehydrogenase, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, glucose-6-phosphatase, hexokinase, lactate dehydrogenase B, malate dehydrogenase 1B*). Tale risultato può essere correlato ad un diverso utilizzo delle riserve energetiche da parte degli individui siciliani rispetto ai veneti, o ad una diversa composizione di partenza in termini di grasso periviscerale e tessuto adiposo.

Sempre a 0h dalla diminuzione di temperatura si nota un effetto marcato del trattamento rispetto ad uno dei due gruppi (Veneto), lasciando ipotizzare che la risposta nelle branchie di orate venete sia più rapida, poiché meglio adattate a climi più freddi. A 6h dalla discesa della temperatura le differenze geografiche sembrano ridursi o sono, comunque, meno visibili, perché l'interazione tra le due variabili è minima. Ciò è ancora più evidente a 24h, in quanto le differenze tra i due gruppi si annullano quasi del tutto, lasciando immaginare che la "direzione" della risposta al freddo tra i due gruppi geografici sia la stessa. Le differenze geografiche si riscontrano, invece, nella velocità di tale risposta, più lenta nella popolazione siciliana, poiché meno abituata ad affrontare simili condizioni in natura. Dopo 21 giorni di esposizione a  $6,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , i profili di espressione delle due popolazioni si modificano nuovamente: aumenta il numero di geni differenzialmente espressi in base al trattamento e in base all'interazione tra le due componenti. La risposta al freddo a lungo termine è chiaramente diversa tra le orate venete e quelle siciliane.

Riassumendo, quindi, la risposta acuta si divide in due fasi: in una prima fase (0h) il numero di geni significativamente espressi nell'interazione tra le due variabili è elevato, mentre nella seconda fase (6 e 24h) è quasi nullo. Si può ipotizzare, perciò, che ci sia una risposta acuta comune al freddo nelle due popolazioni di *S. aurata*, che si attiva in ritardo nella popolazione siciliana. Tale situazione si modifica quando gli animali sono sottoposti ad uno stress da freddo prolungato per cui, a 21 giorni, la componente geografica è nuovamente molto evidente, assieme a quella del trattamento e

dell'interazione tra le due componenti trattamento-origine geografica. Ciò avviene probabilmente perché la capacità di sostenere lo stress di esposizione prolungata al freddo non è la stessa tra le popolazioni, ciò determina diverse risposte croniche negli individui delle due regioni anche in termini di meccanismi fisiologici attivati dai due gruppi.

#### 4.3.1.2 SAM nelle branchie dei trattati di *S. aurata* provenienti da Sicilia e Veneto

L'analisi di SAM tra i trattati di Veneto e Sicilia a 21d evidenzia una sofferenza maggiore delle orate siciliane rispetto a quelle venete per la diminuzione della temperatura. Il profilo di espressione della risposta cronica ha infatti rivelato numerosi geni sovra-espresi negli individui della popolazione meridionale, coinvolti nella risposta allo stress e all'ipossia (*heat shock protein*, *DNA damage-binding protein 2*, *apoptosis regulator Bcl-2-like 1 protein*, *nuclear factor erythroid 2-related factor 1 -- Nrf2-*).

#### **4.4. Confronto tra tessuti: fegato e branchia**

I risultati ottenuti per le branchie riflettono ampiamente quelli osservati nel fegato, eccetto che per il metabolismo di lipidi e carboidrati, per cui il fegato ha un ruolo chiave.

Dopo 21d di esposizione al freddo, si sono identificati 700 geni differenzialmente espressi in comune tra i due tessuti analizzati. I *pathway* sovra-espresi nei trattati rispetto ai controlli sono quelli del proteasoma, dello spliceosoma e del metabolismo del glutatione (Appendice F), che permettono di asserire che parte della risposta cronica al freddo, in entrambi i tessuti, è costituita da fenomeni antiossidanti e, principalmente, di catabolismo proteico. La parte restante, sotto-espresa, coinvolge numerosi *pathway* e processi biologici della risposta immunitaria (*Natural killer cell mediated cytotoxicity*,

*leukocyte transendothelial migration*, GO:0045321~*leukocyte activation*, GO:0046649~*lymphocyte activation*, GO:0042110~*T cell activation*), confermando le attese iniziali e i dati presenti in letteratura, che considerano l'immunodepressione una delle principali conseguenze della risposta degli organismi al freddo e uno dei fattori determinanti per l'insorgenza della *winter disease*.

## 5 Conclusioni

Negli ultimi dieci anni si sono sviluppate e affermate tecnologie sempre più all'avanguardia nel campo della genomica funzionale, che permettono di investigare sulle interazioni tra i geni e l'ambiente con un respiro sempre più ampio. La tecnologia *microarray*, permettendo l'analisi sistematica di interi trascrittomi, ha segnato l'inizio dell'era genomica; negli ultimi anni si è diffusa per molteplici tipi di studi anche su specie non modello di cui non sono ancora totalmente sequenziati i genomi.

Come le popolazioni e le specie reagiscono ai cambiamenti climatici è una questione di importanza centrale per diverse discipline. Un approccio di genetica molecolare può dare nuove conoscenze degne di rilievo. Il profilo di espressione genica può servire come strumento per legare il genotipo alla fisiologia e al fenotipo. Ne consegue che più popolazioni di una stessa specie che vivono in ambienti con condizioni termiche diverse dovrebbero rivelare le basi genetiche dell'adattamento termico (Whithead e Crawford 2006). Inoltre, poiché l'induzione dei geni associati allo stress può aver luogo molto tempo prima delle variazioni fisiologiche (Hoffman & Daborn, 2007), si possono identificare dei geni stress-inducibili come indicatori di allarme precoci.

In questo studio, la tecnologia *microarray* ha permesso di analizzare il profilo d'espressione di più di 19.000 geni in fegato e branchia di individui di *S. aurata* esposti alle basse temperature e provenienti da due regioni italiane (Sicilia e Veneto) con condizioni termiche differenti. I risultati hanno rivelato una risposta complessa al freddo, con molti *pathway* molecolari e processi biologici coinvolti, tra cui la risposta allo stress ossidativo, il metabolismo lipidico e dei carboidrati, la regolazione di HSP (*heat shock protein*), la degradazione e la riparazione proteica, il metabolismo di RNA e DNA, l'apoptosi e la risposta immunitaria.

La nostra ipotesi che le popolazioni di Veneto e Sicilia, provenienti rispettivamente dal Nord e dal Sud Italia, mostrino differenze nella loro tolleranza al freddo coerentemente con le previsioni di adattamento locale, ha trovato conferme nell'analisi dei profili di espressione genica.

Il confronto dei profili trascrizionali tra gli animali esposti al freddo provenienti da due regioni distinte geograficamente identifica differenze significative nell'espressione genica. Di sicuro, le abitudini alimentari e la temperatura dell'acqua negli esemplari provenienti dalla laguna di Marsala, sono diverse da quelle degli individui autoctoni di Valle Bonello. Dal momento che tutti i pesci sono stati acclimatati per due mesi alle stesse condizioni prima dell'inizio dell'esperimento, differenze genetiche o epigenetiche tra le due popolazioni, o perlomeno adattamenti fisiologici di lunga durata ai rispettivi ambienti di origine (es. lo stato nutrizionale) sembrano costituire almeno in parte la risposta trascrizionale alle basse temperature.

Mentre la risposta a breve termine (entro le 24h) allo stress da freddo delle due popolazioni risulta pressoché identica, seppur con tempi di attivazione più lenti nelle orate siciliane, quando lo stress permane per un periodo più lungo (21d), la capacità degli individui di sopportare temperature sub-ottimali si differenzia in base alle origini geografiche, cosicché i meccanismi fisiologici coinvolti nella risposta cronica risultano chiaramente differenti tra le due popolazioni.

## **Bibliografia**

Abdrakhamanova A, Wang QY, Khokhlova L, Nick P: **Is Microtubule Disassembly a Trigger for Cold Acclimation?** *Plant Cell Physiol* 2003, 44(7): 676–686.

Abelli L, Picchiatti S, Romano N, Mastrolia L, Scapigliati G: **Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.)** *Fish Shellfish Immunol* 1997, 7: 235-245.

Alves NR, Cordeiro O, Silva TS, Richard N, de Vareilles M, Marino G, Di Marco P, Rodrigues MP, Conceicao ECL: **Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics.** *Aquaculture* 2010, 299:57–66.

Aoki T, Takano T, Santos MD, Kondo H and Hirono I: **Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives Fisheries for Global Welfare and Environment.** 5th World Fisheries Congress 2008, 263–276.

Aquafirst: **Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance marker assisted selection in fish and shellfish.** Research Project, EU Contribution SSP8-CT-513692. IMBG, Greece. Scientific Responsible: Dr. G. Kotoulas. <http://aquafirst.vitamib.com>.

Ariyama Y, Tanaka Y, Shimizu H, Shimomura K, Okada S, Saito T, Yamada E, Oyadomari S, Mori M: **The role of CHOP messenger RNA expression in the link between oxidative stress and apoptosis.** *Metabolism* 2008, 57:1625–1635.

Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T, Saito M: **Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold induced angiogenesis.** *Biochem J* 1997, 328(Pt 1):179-183.

Asano A, Kimura K, Saito M: **Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue.** *J Vet Med Sci* 1999, 61(4):403-409.

Barnabé G: **Rearing bass and gilthead sea bream.** *Aquaculture* 1990, (ed. G. Barnabé), Ellis Horwood, London, 2:647–686.

Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, Iwama GK: **Heat shock proteins genes and their functional significance in fish.** *Gene* 2002, 295:173–183.

Bayne C J, Gerwick L, Fujikia K, Nakaoa M, Yanoa T: **Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization.** *Dev Comp Immunol* 2001, 25: 205-217.

Beg MU, Al-Subiai S, Beg KR, Butt SA, Al-Jandal N, Al-Hasan E, Al-Hussaini M: **Seasonal Effect on Heat Shock Proteins in Fish from Kuwait Bay.** *Bull Environ Contam Toxicol* 2010, 84:91–95.

Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ: **Intracellular lipid binding proteins and their genes.** *Annu Rev Nutr* 1997, 17: 277–303.

Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G, Pouyssegur J: **Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia.** *Biochem Pharmacol* 2000 60(8):1171-1178.

Bly JE, Clem LW: **Temperature-mediated processes in teleost immunity: in vitro immunosuppression induced by in vivo low temperature in channel catfish.** *Vet Immunol Immunopathol* 1991, 28: 365–377.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP: **A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.** *Bioinformatics* 2003, **19**: 185-193.

Bouchard P, Guderley H: **Time course of the response of mitochondria from oxidative muscle during thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** *J Exp Biol* 2003, 206: 3455-3465.

Bovo G, Borghesan F, Comuzzi M, Ceschias G, Giorgetti G: **“Winter disease” in orata di allevamento: osservazioni preliminari.** *Boll Soc Ital Patol* 1995, 17: 2–11.

Bridgemap: **Bridging genomes: an integrated genomic approach towards the improvement of aquacultured fish species.** Research Project, EU Contribution QLRT-2000-01797, IMBG, Greece. Scientific Responsible: Dr. G. Kotoulas. <http://www.bridgemap.tuc.gr>.

Bullo G: **Le valli da pesca e la vallicultura.** Officine Grafiche Carlo Ferrari, Venezia, 1940.

Bullard LE, Qi X, Penn JS: **Role for extracellular signal-responsive kinase-1 and -2 in retinal angiogenesis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44(4):1722-1731.

Calduch-Giner JA, Davey G, Saera-Vila A, Houeix B, Talbot A, Prunet P, Cairns MT, Pérez-Sánchez J: **Use of microarray technology to assess the time course of liver stress response after confinement exposure in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.).** *BMC Genomics*. 2010, 22;11:193.

Cataudella S, Tancioni L, Cannas A: **L'acquacoltura estensiva**. In: Acquacoltura Responsabile. Verso le produzioni acquatiche del terzo millennio. *Unimar-Uniprom Eds. Roma* 2001, 283-308 pp.

Chen Z, Cheng CHC, Zhang J, Cao L, Chen L, Zhou L, Jin Y, Ye H, Deng C, Dai Z, Xu Q, Hu P, Sun S, Shen Y, Chen L: **Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish**. *PNAS* 2008, 105; 35: 12944–12949.

Churchill GA: **Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays**. *Nature Genetics*, 2002 **32**, 490–495.

Clark MS, Smith SF, Elgar G: **Use of the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) in comparative genomics**. *Mar Biotechnol* 2001, 3:S130-40.

Contessi B, Volpatti D, Gusmani L, Galeotti M: **Evaluation of immunological parameters in farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., before and during outbreaks of “winter syndrome”**. *J Fish Dis* 2006, 29: 683–690.

Cossins AR, Murray PA, Gracey AY, Logue J, Polley S, Caddick M, Brooks S, Postle T, Maclean N: **The role of desaturases in cold-induced lipid restructuring**. *Biochem Soc T* 2002, 30; 6: 1082-1086.

Crollius HR: **The tetraodon genome**. *Genome Dyn* 2006, **2**:154-64.

Demers NE, Bayne CJ: **The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout**. *Dev Comp Immunol* 1997, 21; 4: 363-373.

Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. **DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery.** *Genome Biol.* 2003; 4(5):P3.

Detrich HW, Parker SK, Williams RC Jr, Nogales E, Downing KH: **Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics. Structural interpretation of primary sequence changes present in the alpha- and beta-tubulins of Antarctic fishes.** *J Biol Chem.* 2000 275:37038-47.

Domenech A, Fernandez-Garayzabal JF, Lawson P, Garcia JA, Cutili MT, Blanco MT, Gibello A, Moreno M, Collins MD, Dominguez L: **Winter disease outbreak in sea bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection.** *Aquaculture* 1997, 156: 251– 259.

Donaldson MR, Cooke SJ, Patterson DA, Macdonald JS: **Cold shock and fish.** *J Fish Biol* 2008, 73:1491–153.

Dutta A & Popel AS: **A theoretical analysis of intracellular oxygen diffusion.** *J theor Biol* 1995, **176**: 433–445.

Ellis AE: **Non specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes.** *Dev Biol Stand* 1981, 49: 337-52.

Engelsma MY, Hougee S, Nap D, Hofenk M, Rombout JHWM, van Muiswinkel WB, Verburg-van Kemenade BML: **Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L.** *Fish Shellfish Immun* 2003, 15: 397–410.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ: **C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.** *Cell* 2001, 5;107(1):43-54.

Feidantsis K, Pörtner HO, Lazou A, Kostoglou B, Michaelidis B: **Metabolic and molecular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata* during long-term exposure to increasing temperatures.** *Mar Biol* 2009, 156: 797–809.

Ferraresso S, Vitulo N, Mininni AN, Romualdi C, Cardazzo B, Negrisolo E, Reinhardt R, Canario AV, Patarnello T, Bargelloni L: **Development and validation of a gene expression oligo microarray for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** *BMC Genomics*. 2008, 3; 9: 580.

Franch R, Louro B, Tsalavouta M, Chatziplis D, Tsigenopoulos CS, Sarropoulou E, Antonello J, Magoulas A, Mylonas CC, Babbucci M, Patarnello T, Power DM, Kotoulas G, Bargelloni L. **A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L.** *Genetics* 2006, 174:851-61.

Froese R & Pauly D: **Fish base.** (eds.) 2006, [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)

Gallardo MA, Sala-Rabanal M, Ibarz A, Padros F, Blasco J, Fernandez-Borras J, Sanchez J: **Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)** *Aquaculture* 2003, 223: 15–27.

Ghattas MH, Chuang LT, Kappas A, Abraham NG: **Protective effect of HO-1 against oxidative stress in human hepatoma cell line (HepG2) is independent of telomerase enzyme activity.** *Int J Biochem Cell Biol* 2002, 34(12):1619-28.

Gibson G, Weir B: **The quantitative genetics of transcription.** *Trends in Genetics* 2005, **21**: 616–623.

Glatz JFC, Luiken JJFP, van Bilsen M, van der Vusse GJ: **Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators of lipid metabolism.** *Mol Cell Biochem* 2002, **239**: 3–7.

Gollock MJ, Currie S, Petersen LH, Gamperl AK: **Cardiovascular and haematological responses of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to acute temperature increase.** *J Exp Biol* 2006, **209**:2961-2970.

Gracey AY, Fraser EJ, Li W, Fang Y, Taylor RR, Rogers J, Brass A, Cossins AR: **Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate.** *PNAS* 2004, **101**; **48**: 16970–16975.

Guderley H: **Metabolic responses to low temperature in fish muscle.** *Biol Rev* 2004, **79**: 409–427.

Hacia JG: **Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays.** *Nat Genet* 1999, **21**:42-7.

Hazel JR: **Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation?** *Annu Rev Physiol* 1995, **57**:19-42.

Harris J & Bird DJ: **Modulation of the fish immune system by hormones.** *Vet Immunol Immunopathol* 2000, **77**: 163-176.

Hart S, Wrathmell AB, Harris JE, Grayson TH: **Gut immunology in fish: a review.** *Dev Comp Immunol* 1988, **12**: 453-480.

Herbert MJ, Buffa FM, Vorschmitt H, Egginton S, Bicknell R: **A new procedure for determining the genetic basis of a physiological process in a non-model species, illustrated by cold induced angiogenesis in the carp.** *BMC Genomics* 2009, 10:490.

Hoffmann AA & Daborn PJ: **Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change** *Ecol Letters* 2007, Vol. 10 (1):63–76.

Hori TS, Gamperl AK, Afonso LOB, Johnson SC, Hubert S, Kimball J, Bowman S, Rise ML: **Heat-shock responsive genes identified and validated in Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver, head kidney and skeletal muscle using genomic techniques.** *BMC Genomics* 2010, 11:72.

<http://enne.cribi.unipd.it:5555/biomart/martview/e8d9c9143a310799b0b7f9adca9d34a4>

<http://www.ensembl.org/biomart/martview/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA: **Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources.** *Nature Protoc.* 2009; 4(1):44-57.

Ibarz A, Blasco TJ, Beltrana M, Gallardo MA, Sanchez J, Sala R, Fernandez-Borras J: **Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** *Aquaculture* 2005, 249: 477–486.

Ibarz A, Beltrán M, Fernández-Borràs J, Gallardo MA, Sánchez J, Blasco J: **Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures.** *Aquaculture* 2007, 262: 470–480.

Ibarz A, Martín-Pérez M, Blasco J, Bellido D, de Oliveira E, Fernández-Borràs J: **Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress.** *Proteomics* 2010a, 10: 1-13.

Ibarz A, Padros F, Gallardo MA, Fernandez-Borras J, Blasco J, Tort L: **Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: review of cold-induced alterations and ‘Winter Syndrome’.** *Rev Fish Biol Fisheries* 2010b, DOI: 10.1007/s11160-010-9159-5.

Johnston IA: **Cold adaptation in marine organisms.** *Phil Trans R Soc Lond B* 1990, 326:655-667.

Ju Z, Dunham RA, Liu Z: **Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold acclimation.** *Mol Genet Genomics* 2002, 268: 87–95.

Ju Z, Wells MC, Heater SJ, Walter RB: **Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia.** *Comp Biochem Phys C* 2007, 145:134–144.

Kapoor A, Sanyal AJ: **Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response.** *Clin Liver Dis* 2009, 13:581–590.

Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK: **Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress.** *Free Radical Biol Med* 2009, 47:1304–1309.

Kassahn KS, Crozier RH, Portner HO, Caley MJ: **Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organization.** *Biol Rev* 2009, 84: 277–292.

Kassahn KS, Crozier RH, Ward AC, Stone G, Caley MJ: **From transcriptome to biological function: environmental stress in an ectothermic vertebrate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*.** *BMC Genomics* 2007, 8:358.

Kendziorski CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD: **The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments.** *Biostatistics* 2003, 4, 465–477.

Kendziorski CM, Irizarry RA, Chen K-S, Haag JD, Gould MN: **On the utility of pooling biological samples in microarray experiments.** *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2005, **102**, 4252–4257.

Kerr MK, Churchill GA: **Experimental design for gene microarrays.** *Biostat* 2001, 2: 183–201.

Kiang JG, Tsokos GC: **Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology.** *Pharmacol Ther.* 1998, 80; 2: 183-201.

Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M: **Heme oxygenase and heme degradation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 338 (1): 558–67.

Krasnov A, Koskinen H, Pehkonen P, Rexroad III CE, Afanasyev S, Mölsä H: **Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress.** *BMC Genomics* 2005, 6:3.

Kyprianou TD, Pörtner HO, Anestis A, Kostoglou B, Feidantsis K, Michaelidis B: **Metabolic and molecular stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: an analysis of mechanisms underlying the winter syndrome.** *J Comp Physiol B* 2010, 180; 7: 1005-1018.

Lamarre SG, Le François NR, Driedzic WR, Blier PU: **Protein synthesis is lowered while 20S proteasome activity is maintained following acclimation to low temperature in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen).** *J Exp Biol* 2009, 212: 1294-1301.

Le Friec G, Kemper C: **Complement: coming full circle.** *Arch Immunol Ther Exp* 2009, 57 (6): 393–407.

Le Morvan C, Troutaud D, Deschaux P: **Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish.** *J Exp Biol* 1998, 201: 165–168.

Lemly AD: **Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish.** *Aquat Toxicol* 1993, 27: 133-158.

Lemly AD: **Winter Stress Syndrome: An Important Consideration for Hazard Assessment of Aquatic Pollutants.** *Ecotox Environ Safe* 1996, 34: 223–227.

Løvoll M, Johnsen H, Boshra H, Bøgwald J, Sunyer JO, Dalmo RA: **The ontogeny and extrahepatic expression of complement factor C3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Fish Shellfish Immunol* 2007, 23(3): 542–552.

Magnadottir B: **Innate immunity of fish (overview).** *Fish Shellfish Immunol* 2006, 20:137-151.

Marine Genomics Europe: **Implementation of high-throughput genomic approaches to investigate the functioning of marine ecosystems and the biology of marine organisms.** Research Project, NoE, CT 2003-505403. <http://www.marine-genomics-europe.org>.

Marino G, Ingle E, Cataudella S: **A short overview of the status of aquaculture in Italy.** In: Interactions between aquaculture and capture fisheries: a methodological perspective. *General Fisheries Commission for the Mediterranean. Studies and Reviews* No. 78. FAO. Roma 2005, 46-73.

Meiri I, Gothilf Y, Zohar Y, and Elizur A: **Physiological changes in the spawning gilthead seabream, *Sparus aurata*, succeeding the removal of males.** *Journ of Experiment Zool* 2002, **292**:555–564.

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T: **ERAD: the long road to destruction.** *Nat Cell Biol* 2005, 7; 8: 776-772.

Miller KM, Maclean N: **Teleost microarrays: development in a broad phylogenetic range reflecting diverse applications.** *J Fish Biol* 2008, 72: 2039–2050.

Morley SA, Hirse T, Pörtner HO, Peck LS: **Geographical variation in thermal tolerance within Southern Ocean marine ectotherms.** *Compar Biochem Physiol A* 2009, 154–161.

Nakao M, Tsujikura M, Ichiki S, Vo T K, Somamoto T: **The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches.** *Dev Comp Immunol* 2011, doi:10.1016/j.dci.2011.03.003.

Nègre N, Lavrov S, Hennetin J, Bellis M, Cavalli G: **Mapping the distribution of chromatin proteins by ChIP on chip.** *Methods Enzymol* 2006, **410**:316-41.

Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B: **Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics.** *Clin Genet* 2004, **66**:488-95.

Pages G, Milanini J, Richard DE, Berra E, Gothie E, Vinals F, Pouyssegur J: **Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade.** *Ann N Y Acad Sci* 2000, 902:187-200.

Patarnello T, Verde C, di Prisco G, Bargelloni L, Zane L. 2011. **How will fish that evolved at constant sub-zero temperatures cope with global warming? Notothenioids as a case study.** *Bioessays* 33:260-8.

Peck LS, Morley SA, Pörtner HO, Clark MS: **Thermal limits of burrowing capacity are linked to oxygen availability and size in the Antarctic clam *Laternula elliptica*.** *Oecologia* 2007, 154: 479–484.

Perez-Casanova JC, Rise ML, Dixon B, Afonso LOB, Hall JR, Johnson SC, Gamperl AK: **The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature.** *Fish Shellfish Immun* 2008, 24: 600-609.

Place S, Hofmann G. 2005. **Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in phylogenetically distant Antarctic fish.** *Polar Biol* 28: 261–7.

Podrabsky JE, Somero GN: **Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*.** *J Exp Biol* 2004, 207: 2237-2254.

Pörtner HO: **Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals.** *Naturwissenschaften* 2001, 88: 137–146.

Pörtner HO: **Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in**

**muscle design and performance in polar ectotherms.** *J Exp Biol* 2002, 205: 2217–2230.

Pörtner HO: **Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: an integrative analysis.** *Deep-Sea Res. II* 2006, 53: 1071–1104.

Pörtner HO, Peck LS, Somero G: **Thermal limits and adaptation in marine ectotherms: an integrative view.** *Philos Trans R Soc B* 2007, 362: 2233–2258.

Ramsay G: **DNA chips: state-of-the art.** *Nature Biotechnology* 1998, **16**, 40–44.

Ravagnan G: **Allevamento dell'orata** In: *La Vallicultura moderna*. Edagricole. 1988

Ravagnan G: **Vallicultura Integrata.** Edagricole 1992, Bologna.

Ravarotto L, Marin A, Pagan D, Borghesan F, Manfrin A, Selli L, Bovo G: **Chemical and clinical features of serum of sea bream (*Sparus aurata*) during an outbreak of winter disease.** *Ittiopatologia* 2005, 2: 53-61.

Roberts RJ, Agius C, Saliba C, Bossier P, Sung YY: **Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review.** *J Fish Dis* 2010, 33; 10: 789-801.

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J: **TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis** *Biotechniques* 2003 34(2):374-8.

Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J. **TM4 microarray software suite.** *Methods Enzymol* 2006; 411:134-93.

Saera-Vila A, Caldach-Giner JA, Prunet P, Pérez-Sánchez J: **Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement. Differential stress response of growth hormone receptors.** *Comp Biochem Phys A*. 2009, 154: 197–203.

Sanders BM **Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective.** *Crit Rev Toxicol* 1993, 23:49–75.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463-7.

Sarropoulou E, Kotoulas G, Power DM, Geisler R: **Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology.** *Physiol Genomics* 2005, 23: 182–191.

Sarropoulou E, Franch R, Louro B, Power DM, Bargelloni L, Magoulas A, Senger F, Tsalavouta M, Patarnello T, Galibert F, Kotoulas G, Geisler R. **A gene-based radiation hybrid map of the gilthead sea bream *Sparus aurata* refines and exploits conserved synteny with *Tetraodon nigroviridis*.** *BMC Genomics* 2007, 7:8:44.

Sarusic G: **Clinical signs of the winter disease phenomenon in sea bream (*Sparus aurata*, L.).** *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 1999, 19; 3: 113.

Schena M, Heller R A, Theriault T P, Konrad K, Lachenmeier, E & Davis R W: **Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics.** *Trends in Biotechnology* 1998, **16**, 301–306.

Seacase: **Sustainable extensive and semi-intensive coastal aquaculture in southern Europe**. Research Project, EU Contribution 044483. Coordinator: Ms. Ana Ramalho Ribeiro <http://www.seacase.org>

Senger F, Priat C, Hitte C, Sarropoulou E, Franch R, Geisler R, Bargelloni L, Power D, Galibert F: **The first radiation hybrid map of a perch-like fish: the gilthead seabream (*Sparus aurata* L)** *Genomics* 2006, **87**:793-800.

Sidell BD: **Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature**. *J Experim Biol* 1998, 1118–1127.

Smotkin ES, Moy T, Plachy W: **Dioxygen solubility in aqueous phosphatidylcholine dispersions**. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1061: 33–38.

Subczynski WI, Hyde JS, Kusumi A: **Effect of alkyl chain unsaturation and cholesterol intercalation on oxygen transport in membranes: a pulse-ESR spin labeling study**. *Biochemistry* 1991, **30**, 8578–8590.

Somero GN: **The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'**. *J Exp Biol* 2010; 213(6):912-20.

Takeda H: **Draft genome of the medaka fish: a comprehensive resource for medaka developmental genetics and vertebrate evolutionary biology**. *Dev Growth Differ*. 2008, 1:S157-66.

Teh C, Parinov S, Korzh V: **New ways to admire zebrafish: progress in functional genomics research methodology**. *Biotechniques* 2005, **38**:897-906.

**The R Project for Statistical Computing**: <http://www.r-project.org/>

**The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Rome, FAO. 2010, p. 197

Tort L, Rotllant J, Liarte C, Acerete L, Hernandez A, Ceulemans S, Coutteau P, Padros F: **Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet.** *Aquaculture* 2004, 229: 55–65.

Tort L, Rotllant J, Rovira L: **Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of north-west Mediterranean at low temperatures.** *Comp Biochem Physiol* 1998, 120:175-179.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:5116-5121.

Varo I, Serrano R, Pitarch E, Amat F, Lopez FJ, Navarro JC: **Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish.** *Arch Environ Contam Toxicol* 2002, 42:229–235.

Walport MJ: **Complement. First of two parts.** *N Engl J Med* 2001, 344 (14): 1058–1066.

Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, Chan F, Gonzalez C, Zhang L, Samaha RR: **Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays.** *BMC genomics* 2006, 7:59.

Werner I, Viant MR, Rosenblum ES, Gantner AS, Tjeerdema RS, Johnson ML: **Cellular responses to temperature stress in steelhead trout (*Onchorynchus mykiss*) parr with different rearing histories.** *Fish Physiol Biochem* 2006, 32:261–273.

Whithead A & Crawford D L: **Variation within and among species in gene expression: raw material for evolution.** *Molecular Ecol* 2006, 15: 1197–1211.

Yin JQ, Zhao RC, Morris KV: **Profiling microRNA expression with microarrays.**  
*Trends Biotechnol* 2008, **26**:70-6.

# Appendici

## APPENDICE A

Coppie di *primer* usati per amplificare i geni *target* e il gene *reference* (RPL13a) in real time RT-PCR per la validazione dei risultati microarray.

<b>Gene</b>	<b>SAPD ID</b>	<b>Sequenza Primer</b>
KAT	SAPD20246	For_CCAGCAATCACaGAAGCTCTTA Rev_CTTTGCcACaGCCAGgTACT
GAPT	SAPD10252	For_GATCCAgTAcGGAGTTCTCTACG Rev_AAAGGGGCTCgGGaAACT
MDH	SAPD02236	For_CCGTCTGGACCACAACAGA Rev_GCCCCAGATGATCACATTCT
26S	SAPD23647	For_CAACTGGGATGATGACAAtG Rev_cGTcAGCCGtTAtGAtGTCTC
FAS	SAPD21212	For_TGTGTGCCTTCaTCCAGCA Rev_AGTGCAGtaAGTCtCGGCTGAT
PKC	SAPD23278	For_AACAGGTCGGCAAGTTCAAG Rev_CAGATCCCGaTACACGATGC
ILF2	SAPD18820	For_CaTACAAGAAGGGCACCATGA Rev_TGGACAGCACTTCaGTAGGG
CD59	SAPD20810	For_gCAGGAGTGCACGTATGAAG Rev_TGGGtGAGGCGaGAGTTATC
SOD	SAPD22939	For_ACtCTCAGTGGgCccttgT Rev_CGTTGCCcGTCTTTAGACTC
ACP	SAPD11592	For_TTGGACCAGGTGGAGATCAT Rev_AaACGTCCTTCTTGTCTGCaA
RPL13a	SAPD01017	For_TTCTACCGCAACAAGCTGAA Rev_CCCTGACAGTCCTCCAGAAG

## APPENDICE B

Confronto del *database* SAPD con i *database* delle cinque specie di pesci per i quali è disponibile il  
genoma completo.

<b>CARATTERISTICA</b>	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Takifugu rubripes</i>
N° di SAPD con <i>match</i> in Ensembl Genome Browser <i>database</i>	6,186	5,338	5,274	3,986	5,491
N° di SAPD annotate con almeno una specie	7,295				
N° di SAPD con il gene omologo umano	6,835				
N° di proteine omologhe umane	6,879				
N° di proteine omologhe uniche umane	5,896				
N° di Ensembl Gene ID unici umani	5,625				
N° di ID inseriti come “background” in DAVID	5,503				

## APPENDICE C

Termini di GO, associati ai trascritti unici di orata, maggiormente rappresentati all'interno delle categorie Biological Process (BP), Pathway, Up tissue nei profili di espressione del fegato, per le liste ottenute con ANOVA e con SAM. I processi biologici con FDR > 25 sono stati eliminati dall'elenco.

<b>ANOVA a due vie (tempo vs trattamento)</b>				
<b>Interazione</b>				
<b>Category</b>	<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR</b>
GOTERM_BP_5	GO:0009069~serine family amino acid metabolic process	6	4.514916	12.72291
GOTERM_BP_5	GO:0030163~protein catabolic process	16	2.063961	14.11054
GOTERM_BP_5	GO:0043632~modification-dependent macromolecule catabolic process	13	2.173848	21.38034
GOTERM_BP_5	GO:0045454~cell redox homeostasis	7	3.269422	24.9643
GOTERM_BP_5	GO:0044257~cellular protein catabolic process	13	2.121466	25.12529
GOTERM_BP_5	GO:0006621~protein retention in ER	3	10.15856	39.55453
GOTERM_BP_5	GO:0007346~regulation of progression through mitotic cell cycle	4	5.417899	42.3926
GOTERM_BP_5	GO:0016071~mRNA metabolic process	18	1.693093	43.46627
GOTERM_BP_5	GO:0019318~hexose metabolic process	11	2.013408	51.98453
GOTERM_BP_5	GO:0006396~RNA processing	21	1.554315	54.15642
<b>UP_TISSUE</b>	<b>Cajal-Retzius cell</b>	<b>20</b>	<b>2.343661</b>	<b>0.938417</b>
UP_TISSUE	Liver	57	1.349973	17.1846
UP_TISSUE	B-cell lymphoma	11	2.003196	47.72165
KEGG_PATHWAY	hsa00051:Fructose and mannose metabolism	6	2.976	42.60619
KEGG_PATHWAY	hsa03050:Proteasome	5	3.306667	51.48739
KEGG_PATHWAY	hsa00480:Glutathione metabolism	5	3.132632	57.85157
<b>Tempo</b>				
<b>Category</b>	<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR</b>
<b>GOTERM_BP_5</b>	<b>GO:0042744~hydrogen peroxide catabolic process</b>	<b>4</b>	<b>11.52649</b>	<b>3.986671</b>
<b>GOTERM_BP_5</b>	<b>GO:0042542~response to hydrogen peroxide</b>	<b>5</b>	<b>6.403606</b>	<b>7.932065</b>
GOTERM_BP_5	GO:0045454~cell redox homeostasis	8	3.179721	15.58121
GOTERM_BP_5	GO:0030728~ovulation	3	11.52649	30.30615
GOTERM_BP_5	GO:0006508~proteolysis	34	1.440811	35.42471
GOTERM_BP_5	GO:0008202~steroid metabolic process	10	2.134535	49.58648
GOTERM_BP_5	GO:0006621~protein retention in ER	3	8.644868	49.72222
UP_TISSUE	Fibroblast	10	2.2505	34.76642
UP_TISSUE	Liver	63	1.245883	48.14538
UP_TISSUE	B-cell lymphoma	12	1.82473	58.49924

<b>Trattamento</b>				
<b>Category</b>	<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR</b>
<b>GOTERM_BP_4</b>	<b>GO:0043285~biopolymer catabolic process</b>	<b>63</b>	<b>1.597183</b>	<b>0.039732</b>
<b>GOTERM_BP_4</b>	<b>GO:0044265~cellular macromolecule catabolic process</b>	<b>64</b>	<b>1.546309</b>	<b>0.112641</b>
<b>GOTERM_BP_4</b>	<b>GO:0030163~protein catabolic process</b>	<b>48</b>	<b>1.645714</b>	<b>0.185733</b>
GOTERM_BP_4	GO:0051090~regulation of transcription factor activity	10	2.117647	33.06652
GOTERM_BP_4	GO:0065004~protein-DNA complex assembly	20	1.565217	41.0871
GOTERM_BP_4	GO:0012501~programmed cell death	83	1.190438	51.28594
GOTERM_BP_4	GO:0031497~chromatin assembly	13	1.733333	53.664
GOTERM_BP_4	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	65	1.212435	58.03651
GOTERM_BP_4	GO:0007005~mitochondrion organization and biogenesis	13	1.671429	64.12679
GOTERM_BP_4	GO:0045449~regulation of transcription	158	1.110938	65.01824
GOTERM_BP_4	GO:0009110~vitamin biosynthetic process	8	2.057143	65.94572
GOTERM_BP_4	GO:0016070~RNA metabolic process	213	1.084583	72.409
GOTERM_BP_4	GO:0019219~regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	163	1.100938	72.97625
GOTERM_BP_4	GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	29	1.321519	74.48271
GOTERM_BP_4	GO:0000302~response to reactive oxygen species	7	2.1	76.47839
GOTERM_BP_4	GO:0006749~glutathione metabolic process	7	2.1	76.47839
<b>UP_TISSUE</b>	<b>Cajal-Retzius cell</b>	<b>52</b>	<b>1.632105</b>	<b>0.111442</b>
<b>UP_TISSUE</b>	<b>Liver</b>	<b>188</b>	<b>1.192582</b>	<b>2.901964</b>
<b>UP_TISSUE</b>	<b>Hepatoma</b>	<b>20</b>	<b>1.851007</b>	<b>5.626417</b>
<b>UP_TISSUE</b>	<b>Urinary bladder</b>	<b>27</b>	<b>1.651788</b>	<b>6.699193</b>
UP_TISSUE	B-cell lymphoma	30	1.463296	25.41387
UP_TISSUE	Platelet	56	1.287452	29.7276
UP_TISSUE	Skin	178	1.127166	36.65483
UP_TISSUE	Ovarian carcinoma	9	2.165678	36.71704
UP_TISSUE	Pancreas	86	1.198509	39.99736
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa03050:Proteasome</b>	<b>14</b>	<b>2.843571</b>	<b>0.104623</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa00480:Glutathione metabolism</b>	<b>12</b>	<b>2.309065</b>	<b>5.57486</b>
KEGG_PATHWAY	hsa00310:Lysine degradation	12	1.754889	48.89476
KEGG_PATHWAY	hsa00220:Urea cycle and metabolism of amino groups	9	1.93554	55.92858
KEGG_PATHWAY	hsa00650:Butanoate metabolism	11	1.748531	58.72479
KEGG_PATHWAY	hsa00903:Limonene and pinene degradation	6	2.437346	58.73663
KEGG_PATHWAY	hsa00071:Fatty acid	12	1.687394	59.18464

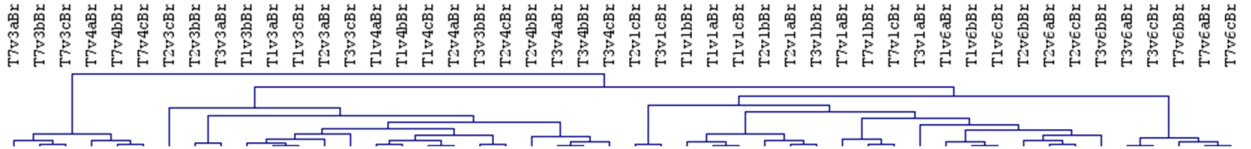
	metabolism			
KEGG_PATHWAY	hsa01510:Neurodegenerative Diseases	8	1.949877	66.91717
KEGG_PATHWAY	hsa00640:Propanoate metabolism	8	1.949877	66.91717

SAM 0h				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_4	GO:0043067~regulation of programmed cell death	7	5,630502	1,466663
	GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	5	8,807205	3,015523
	GO:0042981~regulation of apoptosis	6	4,882591	8,533787
	GO:0012501~programmed cell death	7	3,880785	9,411531
GOTERM_MF_4	GO:0003700~transcription factor activity	5	4,534231	21,57764
SAM 6h				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	31	2,028047	0,282696
GOTERM_BP_3	GO:0006082~organic acid metabolic process	36	1,761799	1,212909
	GO:0006629~lipid metabolic process	33	1,788264	1,661038
	GO:0009308~amine metabolic process	28	1,822342	3,311613
	GO:0044270~nitrogen compound catabolic process	9	3,156557	8,36684
	GO:0009611~response to wounding	19	1,790286	22,25302
	GO:0007596~blood coagulation	9	2,642699	22,89543
GOTERM_BP_4	GO:0019752~carboxylic acid metabolic process	36	1,735622	1,705726
	GO:0009310~amine catabolic process	9	3,097603	10,16148
	GO:0006631~fatty acid metabolic process	14	2,282444	10,41406
GOTERM_CC_4	GO:0042579~microbody	9	2,970487	11,76393
KEGG PATHWAY	hsa00071:Fatty acid metabolism	7	3,230769	18,66325
SAM 24h				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_3	GO:0008380~RNA splicing	41	1,798713	0,138865
	GO:0006397~mRNA processing	42	1,680436	0,603597
	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	57	1,477067	1,899594
	GO:0008610~lipid biosynthetic process	27	1,687938	7,444555
	GO:0006066~alcohol metabolic process	37	1,529323	8,417391
	GO:0006629~lipid metabolic process	62	1,330818	14,64285
GOTERM_CC_4	GO:0044424~intracellular part	649	1,045011	1,282728
	GO:0005681~spliceosome	26	1,757751	4,687881
	GO:0005634~nucleus	284	1,117706	8,873477
	GO:0044428~nuclear part	102	1,230789	15,1881

<b>GOTERM_MF_4</b>	<b>GO:0016775~phosphotransferase activity, nitrogenous group as acceptor</b>	<b>7</b>	<b>3,523988</b>	<b>8,0643</b>
	<b>GO:0042578~phosphoric ester hydrolase activity</b>	<b>35</b>	<b>1,545609</b>	<b>8,298403</b>
	GO:0016616~oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	17	1,78297	23,15626
	GO:0050661~NADP binding	6	3,356179	23,17363
<b>KEGG_PATHWAY</b>	hsa04660:T cell receptor signaling pathway	14	1,934801	19,85841
	hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	12	2,045361	22,57692
<b>UP_TISSUE</b>	<b>Cord blood</b>	<b>7</b>	<b>4,973481</b>	<b>0,536818</b>
<b>SAM 21d</b>				
<b>Category</b>	<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR</b>
<b>GOTERM_BP_4</b>	<b>GO:0019752~carboxylic acid metabolic process</b>	<b>107</b>	<b>1,441461</b>	<b>0,011218</b>
	<b>GO:0006520~amino acid metabolic process</b>	<b>60</b>	<b>1,527442</b>	<b>0,2661</b>
	<b>GO:0043285~biopolymer catabolic process</b>	<b>61</b>	<b>1,487284</b>	<b>0,560204</b>
	<b>GO:0044265~cellular macromolecule catabolic process</b>	<b>62</b>	<b>1,440647</b>	<b>1,352867</b>
	<b>GO:0030163~protein catabolic process</b>	<b>46</b>	<b>1,516774</b>	<b>2,118048</b>
	<b>GO:0044255~cellular lipid metabolic process</b>	<b>76</b>	<b>1,363354</b>	<b>2,176165</b>
	GO:0009309~amine biosynthetic process	21	1,7311	11,35781
	GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	22	1,655835	16,45203
<b>GOTERM_CC_4</b>	<b>GO:0000502~proteasome complex (sensu Eukaryota)</b>	<b>26</b>	<b>2,424572</b>	<b>0,002025</b>
	<b>GO:0044432~endoplasmic reticulum part</b>	<b>76</b>	<b>1,424942</b>	<b>0,441736</b>
<b>GOTERM_MF_4</b>	<b>GO:0003755~peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity</b>	<b>11</b>	<b>2,351323</b>	<b>7,61287</b>
	GO:0016616~oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	23	1,638801	13,34344
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>Hsa03050:Proteasome</b>	<b>15</b>	<b>2,890443</b>	<b>0,025858</b>
	<b>hsa00480:Glutathione metabolism</b>	<b>15</b>	<b>2,738314</b>	<b>0,072596</b>
	<b>hsa00591:Linoleic acid metabolism</b>	<b>8</b>	<b>2,774825</b>	<b>9,5998</b>
	hsa00260:Glycine, serine and threonine metabolism	13	1,878788	24,06361
	hsa00562:Inositol phosphate metabolism	11	2,119658	17,1764
	hsa00251:Glutamate metabolism	10	2,167832	21,24242
	hsa00590:Arachidonic acid metabolism	10	2,167832	21,24242
	<b>Cajal-Retzius cell</b>	<b>52</b>	<b>1,658708</b>	<b>0,07007</b>
<b>UP_TISSUE</b>	<b>Platelet</b>	<b>62</b>	<b>1,448627</b>	<b>1,208215</b>
	Lymph	78	1,260472	17,85477
	Lung	222	1,126365	21,28833

## APPENDICE D

*Hierarchical cluster analysis*: i campioni che costituiscono l'*outgroup* sono quelli esposti al freddo per 21 d (T7v3 e T7v4), provenienti sia dal Veneto che dalla Sicilia. I campioni trattati a 0h, 6h, 24h vengono raggruppati insieme, in parte distinti rispetto all'origine geografica (T1v3, T2v3, T3v3 per la Sicilia e T1v4, T2v4, T3v4 per il Veneto), nettamente separati dai campioni di controllo (T1v1, T2v1, T3v1, T7v1 per la Sicilia e T1v6, T2v6, T3v6, T7v6 per il Veneto) .



## APPENDICE E

Termini di GO, associati ai trascritti unici di orata, maggiormente rappresentati all'interno delle categorie Biological Process (BP) e Pathway nei profili di espressione delle branchie, per le liste ottenute con ANOVA (origine geografica vs trattamento) e SAM.

ANOVA 0h origine geografica				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0006414~translational elongation	36	3.223219	4.78E-07
GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	960	1.135243	7.71E-07
GOTERM_BP_ALL	GO:0055086~nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process	64	1.831478	0.003965
GOTERM_BP_ALL	GO:0009056~catabolic process	190	1.371233	0.005242
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	381	1.225232	0.005777
GOTERM_BP_ALL	GO:0016070~RNA metabolic process	147	1.417174	0.014707
GOTERM_BP_ALL	GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	60	1.733467	0.048746
GOTERM_BP_ALL	GO:0007517~muscle organ development	40	1.714298	1.581659
GOTERM_BP_ALL	GO:0006082~organic acid metabolic process	87	1.404882	1.70965
GOTERM_BP_ALL	GO:0019318~hexose metabolic process	37	1.742646	1.876654
GOTERM_BP_ALL	GO:0042180~cellular ketone metabolic process	87	1.387538	2.490913
GOTERM_BP_ALL	GO:0006641~triglyceride metabolic process	13	2.733906	3.391847
GOTERM_BP_ALL	GO:0051246~regulation of protein metabolic process	82	1.358094	6.164984
GOTERM_BP_ALL	GO:0015980~energy derivation by oxidation of organic compounds	28	1.758346	7.32622
GOTERM_BP_ALL	GO:0032774~RNA biosynthetic process	49	1.49697	7.394491
GOTERM_BP_ALL	GO:0007507~heart development	38	1.598284	7.397403
GOTERM_BP_ALL	GO:0030163~protein catabolic process	90	1.308461	10.58289
GOTERM_BP_ALL	GO:0006511~ubiquitin-dependent protein catabolic process	41	1.532065	10.6073
GOTERM_BP_ALL	GO:0051347~positive regulation of transferase activity	40	1.507154	15.09049
GOTERM_BP_ALL	GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	76	1.324204	15.32006
GOTERM_BP_ALL	GO:0048002~antigen processing and presentation of peptide antigen	9	2.906653	15.3918
GOTERM_BP_ALL	GO:0031324~negative regulation of cellular metabolic process	101	1.268521	15.50964
GOTERM_BP_ALL	GO:0034656~nucleobase, nucleoside and nucleotide catabolic process	14	2.182774	16.2049
GOTERM_BP_ALL	GO:0006892~post-Golgi vesicle-mediated transport	14	2.182774	16.2049
GOTERM_BP_ALL	GO:0042692~muscle cell differentiation	23	1.718902	21.21511
GOTERM_BP_ALL	GO:0042254~ribosome biogenesis	23	1.704813	23.02137
GOTERM_BP_ALL	GO:0051604~protein maturation	23	1.704813	23.02137
GOTERM_BP_ALL	GO:0022613~ribonucleoprotein complex biogenesis	31	1.557392	23.25948
GOTERM_BP_ALL	GO:0006090~pyruvate metabolic process	11	2.368384	23.35519
GOTERM_BP_ALL	GO:0031331~positive regulation of cellular catabolic process	10	2.511923	23.42681
GOTERM_BP_ALL	GO:0040014~regulation of multicellular organism growth	14	2.075425	23.68579
GOTERM_BP_ALL	GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	101	1.244326	24.36789
GOTERM_BP_ALL	GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	50	1.391219	24.42627
GOTERM_BP_ALL	GO:0034101~erythrocyte homeostasis	12	2.214593	26.06735
GOTERM_BP_ALL	GO:0000375~RNA splicing, via transesterification reactions	27	1.59581	27.14192
GOTERM_BP_ALL	GO:0030097~hemopoiesis	38	1.456064	28.54082
GOTERM_BP_ALL	GO:0042113~B cell activation	16	1.903773	28.59963
GOTERM_BP_ALL	GO:0009308~amine metabolic process	59	1.333831	29.23481

GOTERM_BP_ALL	GO:0045333~cellular respiration	19	1.771294	29.65576
GOTERM_BP_ALL	GO:0044419~interspecies interaction between organisms	44	1.405967	29.8999
GOTERM_BP_ALL	GO:0008610~lipid biosynthetic process	49	1.371836	31.50377
GOTERM_BP_ALL	GO:0016485~protein processing	21	1.695548	31.85854
GOTERM_BP_ALL	GO:0022904~respiratory electron transport chain	14	1.978139	32.84484
GOTERM_BP_ALL	GO:0008015~blood circulation	31	1.507154	33.37208
GOTERM_BP_ALL	GO:0003013~circulatory system process	31	1.507154	33.37208
GOTERM_BP_ALL	GO:0051439~regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	15	1.910476	33.79302
GOTERM_BP_ALL	GO:0048522~positive regulation of cellular process	231	1.130977	34.23714
GOTERM_BP_ALL	GO:0006629~lipid metabolic process	109	1.212397	34.65577
GOTERM_BP_ALL	GO:0006364~rRNA processing	18	1.769267	34.85226
GOTERM_BP_ALL	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	74	1.272198	35.7385
GOTERM_BP_ALL	GO:0009058~biosynthetic process	425	1.085048	36.73534
GOTERM_BP_ALL	GO:0051444~negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity	14	1.889566	43.30202
GOTERM_BP_ALL	GO:0046486~glycerolipid metabolic process	27	1.507154	45.9223
GOTERM_BP_ALL	GO:0060537~muscle tissue development	22	1.591554	46.45818
GOTERM_BP_ALL	GO:0016072~rRNA metabolic process	18	1.695548	46.57441
GOTERM_BP_ALL	GO:0043353~enucleate erythrocyte differentiation	4	5.167384	46.90746
GOTERM_BP_ALL	GO:0030183~B cell differentiation	11	2.072336	47.92003
GOTERM_BP_ALL	GO:0010629~negative regulation of gene expression	70	1.255961	48.14351
GOTERM_BP_ALL	GO:0019216~regulation of lipid metabolic process	20	1.614807	51.05062
GOTERM_BP_ALL	GO:0044106~cellular amine metabolic process	45	1.334201	52.19915
GOTERM_BP_ALL	GO:0044085~cellular component biogenesis	129	1.165371	53.15037
GOTERM_BP_ALL	GO:0007018~microtubule-based movement	20	1.600517	53.90747
GOTERM_BP_ALL	GO:0044262~cellular carbohydrate metabolic process	55	1.28517	55.08661
GOTERM_BP_ALL	GO:0006575~cellular amino acid derivative metabolic process	27	1.470837	55.18502
GOTERM_BP_ALL	GO:0002520~immune system development	41	1.343332	56.97679
GOTERM_BP_ALL	GO:0010467~gene expression	359	1.082497	57.54181
GOTERM_BP_ALL	GO:0051438~regulation of ubiquitin-protein ligase activity	15	1.739023	57.79078
GOTERM_BP_ALL	GO:0046649~lymphocyte activation	31	1.408696	60.02667
GOTERM_BP_ALL	GO:0044249~cellular biosynthetic process	409	1.074537	60.4253
GOTERM_BP_ALL	GO:0034984~cellular response to DNA damage stimulus	4	4.521461	60.89374
GOTERM_BP_ALL	GO:0009166~nucleotide catabolic process	11	1.950434	61.38789
GOTERM_BP_ALL	GO:0006094~gluconeogenesis	7	2.532018	61.97978
GOTERM_BP_ALL	GO:0045445~myoblast differentiation	6	2.855659	62.12268
GOTERM_BP_ALL	GO:0042219~cellular amino acid derivative catabolic process	6	2.855659	62.12268
GOTERM_BP_ALL	GO:0051276~chromosome organization	66	1.230583	66.84138
GOTERM_BP_ALL	GO:0031325~positive regulation of cellular metabolic process	113	1.161193	66.98337
GOTERM_BP_ALL	GO:0045834~positive regulation of lipid metabolic process	10	1.965852	69.40867
GOTERM_BP_ALL	GO:0005975~carbohydrate metabolic process	71	1.21141	70.73895
GOTERM_BP_ALL	GO:0000187~activation of MAPK activity	15	1.654193	71.1304
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa03010:Ribosome</b>	<b>32</b>	<b>2.931575</b>	<b>2.49E-05</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa00520:Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</b>	<b>13</b>	<b>2.354838</b>	<b>7.588075</b>
KEGG_PATHWAY	hsa00380:Tryptophan metabolism	11	2.19181	24.71242
KEGG_PATHWAY	hsa00500:Starch and sucrose metabolism	11	2.087438	32.54268
KEGG_PATHWAY	hsa04670:Leukocyte transendothelial migration	23	1.553517	35.24597
KEGG_PATHWAY	hsa04530:Tight junction	25	1.486981	41.88516
KEGG_PATHWAY	hsa00561:Glycerolipid metabolism	11	1.948276	45.76266
KEGG_PATHWAY	hsa00190:Oxidative phosphorylation	24	1.471425	48.84274
KEGG_PATHWAY	hsa04120:Ubiquitin mediated proteolysis	25	1.45442	49.4121
KEGG_PATHWAY	hsa05212:Pancreatic cancer	15	1.660462	53.78455
KEGG_PATHWAY	hsa04330:Notch signaling pathway	11	1.865371	54.95537
KEGG_PATHWAY	hsa00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	13	1.726881	56.8982

KEGG_PATHWAY	hsa04910:Insulin signaling pathway	24	1.416928	61.85696
KEGG_PATHWAY	hsa04610:Complement and coagulation cascades	14	1.617146	66.44098
KEGG_PATHWAY	hsa00250:Alanine, aspartate and glutamate metabolism	8	2.056831	66.49657
KEGG_PATHWAY	hsa04130:SNARE interactions in vesicular transport	9	1.887684	70.88476
KEGG_PATHWAY	hsa00052:Galactose metabolism	7	2.145828	72.04835
SP_PIR_KEYWORDS	<b>Acetylation</b>	<b>442</b>	<b>1.627909</b>	<b>2.09E-25</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>protein biosynthesis</b>	<b>46</b>	<b>2.374589</b>	<b>7.64E-05</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>Ribosoma</b>	<b>25</b>	<b>3.323577</b>	<b>2.12E-04</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>mitochondrion inner membrane</b>	<b>41</b>	<b>2.061651</b>	<b>0.019094</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>alternative splicing</b>	<b>859</b>	<b>1.113309</b>	<b>0.0227</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>muscle protein</b>	<b>19</b>	<b>3.0732</b>	<b>0.031922</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>respiratory chain</b>	<b>18</b>	<b>2.460383</b>	<b>1.070225</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>Proteasome</b>	<b>15</b>	<b>2.599512</b>	<b>1.961529</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>atp-binding</b>	<b>171</b>	<b>1.25153</b>	<b>2.013919</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>skeletal muscle</b>	<b>9</b>	<b>3.639316</b>	<b>3.034513</b>
SP_PIR_KEYWORDS	<b>mrna processing</b>	<b>42</b>	<b>1.567706</b>	<b>5.626989</b>
SP_PIR_KEYWORDS	lipid binding	7	3.774106	10.66692
SP_PIR_KEYWORDS	Spliceosome	21	1.698348	27.26255
SP_PIR_KEYWORDS	phospholipid binding	7	3.087905	27.3385
SP_PIR_KEYWORDS	Microtubule	35	1.470431	27.64105
SP_PIR_KEYWORDS	carbohydrate metabolism	15	1.91543	28.82289
SP_PIR_KEYWORDS	DNA binding	48	1.370096	29.32297
SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	91	1.238627	31.42048
SP_PIR_KEYWORDS	Vldl	5	4.043685	35.33975
SP_PIR_KEYWORDS	Ubiquinone	8	2.587958	36.81179
SP_PIR_KEYWORDS	complement alternate pathway	5	3.732632	44.14576
SP_PIR_KEYWORDS	lipid synthesis	17	1.683493	48.16811
SP_PIR_KEYWORDS	blood coagulation	9	1.985082	70.81462
SP_PIR_KEYWORDS	immune response	31	1.343081	72.44923

**ANOVA 0h trattamento**

Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	682	1.203575	8.46E-11
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238~primary metabolic process	615	1.198839	7.01E-08
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237~cellular metabolic process	592	1.203914	1.54E-07
GOTERM_BP_ALL	GO:0009987~cellular process	855	1.094622	2.20E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0006396~RNA processing	74	1.825679	9.67E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0016070~RNA metabolic process	107	1.539433	0.010592
GOTERM_BP_ALL	GO:0008380~RNA splicing	42	1.995772	0.050617
GOTERM_BP_ALL	GO:0016071~mRNA metabolic process	48	1.750731	0.33992
GOTERM_BP_ALL	GO:0044267~cellular protein metabolic process	218	1.249239	0.348931
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	250	1.199788	1.299047
GOTERM_BP_ALL	GO:0044265~cellular macromolecule catabolic process	78	1.4519	1.391507
GOTERM_BP_ALL	GO:0006629~lipid metabolic process	85	1.410939	1.885824
GOTERM_BP_ALL	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	58	1.488066	4.094372
GOTERM_BP_ALL	GO:0044248~cellular catabolic process	101	1.331071	4.098046
GOTERM_BP_ALL	GO:0042542~response to hydrogen peroxide	12	2.891833	4.211939
GOTERM_BP_ALL	GO:0019432~triglyceride biosynthetic process	5	7.497344	4.96056
GOTERM_BP_ALL	GO:0000302~response to reactive oxygen species	14	2.519108	5.657068
GOTERM_BP_ALL	GO:0006749~glutathione metabolic process	8	3.855777	6.303713
GOTERM_BP_ALL	GO:0006641~triglyceride metabolic process	10	3.138423	6.500464
GOTERM_BP_ALL	GO:0006259~DNA metabolic process	54	1.440201	10.98212
GOTERM_BP_ALL	GO:0030163~protein catabolic process	64	1.388576	11.2662
GOTERM_BP_ALL	GO:0005975~carbohydrate metabolic process	55	1.400447	16.89854
GOTERM_BP_ALL	GO:0051603~proteolysis involved in cellular protein catabolic process	61	1.372014	16.93992
GOTERM_BP_ALL	GO:0006974~response to DNA damage stimulus	41	1.483389	18.39191
GOTERM_BP_ALL	GO:0044257~cellular protein catabolic process	61	1.365188	18.56328
GOTERM_BP_ALL	GO:0012501~programmed cell death	61	1.347313	23.31128
GOTERM_BP_ALL	GO:0008610~lipid biosynthetic process	36	1.504111	23.66791
GOTERM_BP_ALL	GO:0008219~cell death	70	1.31386	24.16567

GOTERM_BP_ALL	GO:0042180~cellular ketone metabolic process	57	1.356662	25.44723
GOTERM_BP_ALL	GO:0051493~regulation of cytoskeleton organization	18	1.786132	34.66635
GOTERM_BP_ALL	GO:0033554~cellular response to stress	55	1.311373	44.5888
GOTERM_BP_ALL	GO:0042770~DNA damage response, signal transduction	12	2.024283	45.9251
GOTERM_BP_ALL	GO:0006979~response to oxidative stress	20	1.645759	47.13965
GOTERM_BP_ALL	GO:0032446~protein modification by small protein conjugation	17	1.738021	47.38352
GOTERM_BP_ALL	GO:0006511~ubiquitin-dependent protein catabolic process	27	1.505665	48.13887
GOTERM_BP_ALL	GO:0006986~response to unfolded protein	11	2.090809	48.34716
GOTERM_BP_ALL	GO:0034976~response to endoplasmic reticulum stress	7	2.778428	49.36776
GOTERM_BP_ALL	GO:0044262~cellular carbohydrate metabolic process	39	1.359983	56.42309
GOTERM_BP_ALL	GO:0044419~interspecies interaction between organisms	30	1.430589	57.70285
GOTERM_BP_ALL	GO:0006631~fatty acid metabolic process	22	1.499469	68.08639
GOTERM_BP_ALL	GO:0032956~regulation of actin cytoskeleton organization	12	1.81958	69.93267
GOTERM_BP_ALL	GO:0030968~endoplasmic reticulum unfolded protein response	5	3.213148	70.74251
GOTERM_BP_ALL	GO:0034620~cellular response to unfolded protein	5	3.213148	70.74251
GOTERM_BP_ALL	GO:0034614~cellular response to reactive oxygen species	6	2.699044	71.81073
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa05016:Huntington's disease</b>	<b>30</b>	<b>2.042169</b>	<b>0.299619</b>
KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	19	1.847676	14.58292
KEGG_PATHWAY	hsa04120:Ubiquitin mediated proteolysis	20	1.788761	16.34151
KEGG_PATHWAY	hsa03018:RNA degradation	10	2.149651	38.65554
KEGG_PATHWAY	hsa00480:Glutathione metabolism	9	2.205542	44.53632
KEGG_PATHWAY	hsa03320:PPAR signaling pathway	11	1.953379	47.3835
KEGG_PATHWAY	hsa04660:T cell receptor signaling pathway	15	1.701807	49.32141
KEGG_PATHWAY	hsa05012:Parkinson's disease	17	1.627353	49.735
KEGG_PATHWAY	hsa04142:Lysosome	15	1.570899	69.3028
KEGG_PATHWAY	hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5	2.784775	71.95868
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Acetylation</b>	<b>312</b>	<b>1.72541</b>	<b>5.30E-21</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Phosphoprotein</b>	<b>634</b>	<b>1.272013</b>	<b>4.13E-12</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Mitochondrion</b>	<b>118</b>	<b>2.066698</b>	<b>7.20E-11</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>endoplasmic reticulum</b>	<b>78</b>	<b>1.594129</b>	<b>0.07076</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>mitochondrial inner membrane</b>	<b>7</b>	<b>5.36862</b>	<b>1.893865</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>er-golgi tran sport</b>	<b>15</b>	<b>2.633488</b>	<b>2.134205</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>alternative splicing</b>	<b>566</b>	<b>1.10146</b>	<b>2.253821</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>protein tran sport</b>	<b>52</b>	<b>1.562356</b>	<b>2.270322</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>lipid synthesis</b>	<b>16</b>	<b>2.379097</b>	<b>3.94546</b>
SP_PIR_KEYWORDS	Glycosidase	12	2.213464	24.40178
SP_PIR_KEYWORDS	electron transfer	9	2.622955	25.49703
SP_PIR_KEYWORDS	Nad	22	1.696208	25.61167
SP_PIR_KEYWORDS	Antioxidant	4	6.476431	25.72385
SP_PIR_KEYWORDS	lipid droplet	4	5.298898	41.21111
SP_PIR_KEYWORDS	host-virus interaction	29	1.482762	41.32108
SP_PIR_KEYWORDS	Spliceosome	15	1.821496	41.51989
SP_PIR_KEYWORDS	nucleotide metabolism	5	3.642992	48.9541
SP_PIR_KEYWORDS	Microtubule	24	1.513971	50.55848
SP_PIR_KEYWORDS	protein biosynthesis	20	1.55021	58.87814
SP_PIR_KEYWORDS	phospholipid biosynthesis	7	2.428662	63.32176
SP_PIR_KEYWORDS	DNA repair	20	1.525861	63.67066
SP_PIR_KEYWORDS	glucose metabolism	4	4.16342	64.03502
SP_PIR_KEYWORDS	unfolded protein response	5	3.167819	65.3448
SP_PIR_KEYWORDS	DNA damage	21	1.492738	66.38084
SP_PIR_KEYWORDS	Peroxidase	5	2.914394	74.72079
SP_PIR_KEYWORDS	Apoptosis	34	1.300386	78.8985
<b>ANOVA 0h interazione</b>				
KEGG_PATHWAY	hsa00561:Glycerolipid metabolism	4	3.896552	61.79195
<b>Category</b>	<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR</b>

GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	175	1.187653	0.774122
GOTERM_BP_ALL	GO:0006071~glycerol metabolic process	5	11.28197	1.47137
GOTERM_BP_ALL	GO:0006641~triglyceride metabolic process	6	7.24145	2.21438
GOTERM_BP_ALL	GO:0006639~acylglycerol metabolic process	6	6.354742	3.962153
GOTERM_BP_ALL	GO:0006629~lipid metabolic process	28	1.787353	6.389205
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	71	1.310345	15.68373
GOTERM_BP_ALL	GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	22	1.711747	26.68189
GOTERM_BP_ALL	GO:0006397~mRNA processing	13	2.10175	30.52732
GOTERM_BP_ALL	GO:0008610~lipid biosynthetic process	13	2.088736	31.28413
GOTERM_BP_ALL	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	18	1.775945	35.10881
GOTERM_BP_ALL	GO:0016071~mRNA metabolic process	14	1.963672	36.60874
GOTERM_BP_ALL	GO:0005975~carbohydrate metabolic process	18	1.762542	37.08317
GOTERM_BP_ALL	GO:0006974~response to DNA damage stimulus	13	1.808745	62.85017
SP_PIR_KEYWORDS	lipid synthesis	8	4.659359	2.306072
SP_PIR_KEYWORDS	glycerol metabolism	3	24.46164	8.151522
SP_PIR_KEYWORDS	glucose metabolism	3	12.23082	29.04085
SP_PIR_KEYWORDS	lipid metabolism	7	2.645961	51.07937
SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	19	1.52099	67.16741
ANOVA 6h origine geografica				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237~cellular metabolic process	242	1.286947	6.12E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	267	1.232173	3.10E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0009987~cellular process	339	1.134931	0.001048
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238~primary metabolic process	238	1.213205	0.028048
GOTERM_BP_ALL	GO:0006007~glucose catabolic process	10	6.084483	0.056654
GOTERM_BP_ALL	GO:0055086~nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process	24	2.680253	0.058332
GOTERM_BP_ALL	GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	23	2.593195	0.145995
GOTERM_BP_ALL	GO:0006753~nucleoside phosphate metabolic process	22	2.649761	0.158874
GOTERM_BP_ALL	GO:0009117~nucleotide metabolic process	22	2.649761	0.158874
GOTERM_BP_ALL	GO:0016070~RNA metabolic process	46	1.73064	0.583537
GOTERM_BP_ALL	GO:0019748~secondary metabolic process	10	4.467089	0.647907
GOTERM_BP_ALL	GO:0006006~glucose metabolic process	14	3.22915	0.694851
GOTERM_BP_ALL	GO:0044275~cellular carbohydrate catabolic process	10	4.151765	1.114748
GOTERM_BP_ALL	GO:0044267~cellular protein metabolic process	92	1.378633	1.423456
GOTERM_BP_ALL	GO:0016071~mRNA metabolic process	23	2.193703	1.472004
GOTERM_BP_ALL	GO:0006974~response to DNA damage stimulus	23	2.176059	1.613178
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	106	1.330277	1.733815
GOTERM_BP_ALL	GO:0034654~nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid biosynthetic process	15	2.742746	2.031875
GOTERM_BP_ALL	GO:0006259~DNA metabolic process	28	1.952806	2.066435
GOTERM_BP_ALL	GO:0000398~nuclear mRNA splicing, via spliceosome	13	2.998497	2.302921
GOTERM_BP_ALL	GO:0006098~pentose-phosphate shunt	4	15.68444	2.820342
GOTERM_BP_ALL	GO:0043436~oxoacid metabolic process	29	1.840665	3.854135
GOTERM_BP_ALL	GO:0009165~nucleotide biosynthetic process	14	2.656237	4.132949
GOTERM_BP_ALL	GO:0033554~cellular response to stress	29	1.808145	4.978748
GOTERM_BP_ALL	GO:0006281~DNA repair	18	2.23669	5.070691
GOTERM_BP_ALL	GO:0042180~cellular ketone metabolic process	29	1.804956	5.114681
GOTERM_BP_ALL	GO:0016052~carbohydrate catabolic process	10	3.237615	6.232045
GOTERM_BP_ALL	GO:0005975~carbohydrate metabolic process	27	1.797792	7.57431
GOTERM_BP_ALL	GO:0007017~microtubule-based process	16	2.231779	9.306218
GOTERM_BP_ALL	GO:0044262~cellular carbohydrate metabolic process	21	1.914961	11.56793
GOTERM_BP_ALL	GO:0007249~I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	7	3.921111	13.81954
GOTERM_BP_ALL	GO:0043170~macromolecule metabolic process	186	1.149552	13.97721
GOTERM_BP_ALL	GO:0006739~NADP metabolic process	4	8.8225	15.23684
GOTERM_BP_ALL	GO:0031124~mRNA 3'-end processing	4	8.8225	15.23684
GOTERM_BP_ALL	GO:0051716~cellular response to stimulus	36	1.549317	15.53168
GOTERM_BP_ALL	GO:0006096~glycolysis	6	4.505106	16.17922
GOTERM_BP_ALL	GO:0034641~cellular nitrogen compound	124	1.19236	24.3352

	metabolic process			
GOTERM_BP_ALL	GO:0045333~cellular respiration	8	2.910515	29.36451
GOTERM_BP_ALL	GO:0015980~energy derivation by oxidation of organic compounds	10	2.450694	30.82501
GOTERM_BP_ALL	GO:0006139~nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	115	1.190481	32.32423
GOTERM_BP_ALL	GO:0043281~regulation of caspase activity	7	3.126962	34.44483
GOTERM_BP_ALL	GO:0009056~catabolic process	48	1.351891	38.26354
GOTERM_BP_ALL	GO:0006886~intracellular protein transport	18	1.698449	48.1136
GOTERM_BP_ALL	GO:0031123~RNA 3'-end processing	4	5.228148	50.25145
GOTERM_BP_ALL	GO:0043038~amino acid activation	5	3.83587	50.88977
GOTERM_BP_ALL	GO:0048610~reproductive cellular process	10	2.178395	51.13683
GOTERM_BP_ALL	GO:0051301~cell division	15	1.794407	51.6012
GOTERM_BP_ALL	GO:0006464~protein modification process	53	1.287247	52.50663
GOTERM_BP_ALL	GO:0009110~vitamin biosynthetic process	4	5.041429	53.58861
GOTERM_BP_ALL	GO:0006260~DNA replication	11	2.043105	53.73818
GOTERM_BP_ALL	GO:0051443~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity	6	3.024857	56.9762
GOTERM_BP_ALL	GO:0043412~biopolymer modification	55	1.27192	57.22516
GOTERM_BP_ALL	GO:0009152~purine ribonucleotide biosynthetic process	8	2.412991	57.28363
GOTERM_BP_ALL	GO:0009124~nucleoside monophosphate biosynthetic process	5	3.529	60.38799
GOTERM_BP_ALL	GO:0051351~positive regulation of ligase activity	6	2.900548	62.56927
GOTERM_BP_ALL	GO:0000226~microtubule cytoskeleton organization	9	2.160612	63.78831
GOTERM_BP_ALL	GO:0031396~regulation of protein ubiquitination	7	2.4703	68.01829
GOTERM_BP_ALL	GO:0006457~protein folding	10	1.993785	68.17847
GOTERM_BP_ALL	GO:0006919~activation of caspase activity	5	3.267593	69.1189
GOTERM_BP_ALL	GO:0006351~transcription, DNA-dependent	14	1.691986	72.37309
GOTERM_BP_ALL	GO:0044248~cellular catabolic process	38	1.30959	72.59794
GOTERM_BP_ALL	GO:0006508~proteolysis	39	1.305797	72.71104
GOTERM_BP_ALL	GO:0016458~gene silencing	5	3.150893	73.08476
GOTERM_BP_ALL	GO:0009060~aerobic respiration	4	4.033143	74.13293
GOTERM_BP_ALL	GO:0031023~microtubule organizing center organization	4	4.033143	74.13293
GOTERM_BP_ALL	GO:0032774~RNA biosynthetic process	14	1.669122	75.34039
GOTERM_BP_ALL	GO:0035234~germ cell programmed cell death	2	23.52667	77.30192
GOTERM_BP_ALL	GO:0046950~cellular ketone body metabolic process	2	23.52667	77.30192
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa05016:Huntington's disease</b>	<b>18</b>	<b>2.905714</b>	<b>0.142648</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa00190:Oxidative phosphorylation</b>	<b>14</b>	<b>3.129231</b>	<b>0.530883</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa00280:Valine, leucine and isoleucine degradation</b>	<b>8</b>	<b>5.283117</b>	<b>0.758821</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa05012:Parkinson's disease</b>	<b>13</b>	<b>2.951116</b>	<b>1.556164</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa05010:Alzheimer's disease</b>	<b>14</b>	<b>2.495706</b>	<b>4.202821</b>
KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	11	2.536735	11.93872
KEGG_PATHWAY	hsa04260:Cardiac muscle contraction	8	2.98022	18.14593
KEGG_PATHWAY	hsa04142:Lysosome	9	2.235165	43.09995
KEGG_PATHWAY	hsa00970:Aminoacyl-tRNA biosynthesis	5	3.543554	45.84716
KEGG_PATHWAY	hsa00030:Pentose phosphate pathway	4	4.649143	47.17335
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Acetylation</b>	<b>142</b>	<b>2.177674</b>	<b>3.58E-17</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Phosphoprotein</b>	<b>249</b>	<b>1.385379</b>	<b>9.28E-08</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Cytoplasm</b>	<b>135</b>	<b>1.637246</b>	<b>2.46E-06</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>mrna processing</b>	<b>23</b>	<b>3.574701</b>	<b>8.00E-04</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Mitochondrion</b>	<b>44</b>	<b>2.13705</b>	<b>0.005947</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>respiratory chain</b>	<b>10</b>	<b>5.691502</b>	<b>0.085447</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>protein transport</b>	<b>28</b>	<b>2.332929</b>	<b>0.113453</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>cell cycle</b>	<b>26</b>	<b>2.27907</b>	<b>0.307132</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>mrna splicing</b>	<b>16</b>	<b>3.093563</b>	<b>0.318982</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Spliceosome</b>	<b>11</b>	<b>3.704219</b>	<b>1.108227</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Cytoskeleton</b>	<b>29</b>	<b>1.842579</b>	<b>3.290296</b>
SP_PIR_KEYWORDS	carbohydrate metabolism	7	3.721943	14.68894
SP_PIR_KEYWORDS	DNA damage	12	2.365444	17.10341
SP_PIR_KEYWORDS	Aminoacyl-tRNA synthetase	5	5.180726	19.49209
SP_PIR_KEYWORDS	Methylation	13	2.170767	22.10139

SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	28	1.586915	23.90531
SP_PIR_KEYWORDS	Glycolysis	5	4.592007	27.85015
SP_PIR_KEYWORDS	rna-binding	21	1.571487	49.66448
SP_PIR_KEYWORDS	dna repair	10	2.115689	49.86091
SP_PIR_KEYWORDS	protein biosynthesis	9	1.934505	75.56734
SP_PIR_KEYWORDS	Chaperone	8	2.046059	76.3454
<b>ANOVA 6h trattamento</b>				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0016071~mRNA metabolic process</b>	<b>26</b>	<b>2.77853</b>	<b>0.013452</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0034641~cellular nitrogen compound metabolic process</b>	<b>127</b>	<b>1.368299</b>	<b>0.077899</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006397~mRNA processing</b>	<b>22</b>	<b>2.709949</b>	<b>0.114861</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0016070~RNA metabolic process</b>	<b>44</b>	<b>1.854784</b>	<b>0.173058</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006139~nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process</b>	<b>118</b>	<b>1.368669</b>	<b>0.176859</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006807~nitrogen compound metabolic process</b>	<b>128</b>	<b>1.33965</b>	<b>0.19547</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0044237~cellular metabolic process</b>	<b>201</b>	<b>1.197659</b>	<b>0.471843</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0044238~primary metabolic process</b>	<b>206</b>	<b>1.176566</b>	<b>1.113024</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0015031~protein transport</b>	<b>35</b>	<b>1.81617</b>	<b>1.539343</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0008152~metabolic process</b>	<b>223</b>	<b>1.153074</b>	<b>1.621155</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0008104~protein localization</b>	<b>38</b>	<b>1.703564</b>	<b>2.702127</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006259~DNA metabolic process</b>	<b>24</b>	<b>1.875444</b>	<b>7.919703</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0000375~RNA splicing, via transesterification reactions</b>	<b>11</b>	<b>2.842789</b>	<b>8.932619</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0000398~nuclear mRNA splicing, via spliceosome</b>	<b>11</b>	<b>2.842789</b>	<b>8.932619</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0000377~RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile</b>	<b>11</b>	<b>2.842789</b>	<b>8.932619</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0051276~chromosome organization</b>	<b>22</b>	<b>1.793595</b>	<b>18.05483</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0010467~gene expression</b>	<b>94</b>	<b>1.239352</b>	<b>22.73969</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0034622~cellular macromolecular complex assembly</b>	<b>16</b>	<b>1.989465</b>	<b>23.10594</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006936~muscle contraction</b>	<b>10</b>	<b>2.584354</b>	<b>23.58289</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0012501~programmed cell death</b>	<b>25</b>	<b>1.617865</b>	<b>31.20224</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0010888~negative regulation of lipid storage</b>	<b>3</b>	<b>9.885154</b>	<b>46.12195</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0008219~cell death</b>	<b>27</b>	<b>1.484835</b>	<b>51.24164</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0008654~phospholipid biosynthetic process</b>	<b>7</b>	<b>2.713572</b>	<b>53.93774</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0016265~death</b>	<b>27</b>	<b>1.474581</b>	<b>53.98753</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006944~membrane fusion</b>	<b>5</b>	<b>3.730247</b>	<b>54.01455</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0032446~protein modification by small protein conjugation</b>	<b>8</b>	<b>2.396401</b>	<b>58.32862</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0046486~glycerolipid metabolic process</b>	<b>9</b>	<b>2.196701</b>	<b>60.6884</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006281~DNA repair</b>	<b>13</b>	<b>1.809958</b>	<b>63.22476</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0016044~membrane organization</b>	<b>16</b>	<b>1.660498</b>	<b>65.02569</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0043462~regulation of ATPase activity</b>	<b>3</b>	<b>7.413866</b>	<b>65.58159</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa00150:Androgen and estrogen metabolism</b>	<b>5</b>	<b>5.326838</b>	<b>14.31509</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids</b>	<b>4</b>	<b>7.167019</b>	<b>17.85525</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa04144:Endocytosis</b>	<b>10</b>	<b>2.142315</b>	<b>38.59334</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa03040:Spliceosome</b>	<b>7</b>	<b>2.189922</b>	<b>69.1585</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Acetylation</b>	<b>110</b>	<b>1.800402</b>	<b>6.80E-07</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Mitochondrion</b>	<b>40</b>	<b>2.073452</b>	<b>0.034038</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>mrna splicing</b>	<b>17</b>	<b>3.508003</b>	<b>0.042017</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>mrna processing</b>	<b>18</b>	<b>2.985771</b>	<b>0.173169</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Spliceosome</b>	<b>11</b>	<b>3.953382</b>	<b>0.660462</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Lysosome</b>	<b>11</b>	<b>3.183932</b>	<b>3.398546</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Peroxisome</b>	<b>6</b>	<b>2.875187</b>	<b>56.1455</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>cell cycle</b>	<b>17</b>	<b>1.590396</b>	<b>63.7145</b>
<b>ANOVA 24h origine geografica</b>				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0007517~muscle organ development</b>	<b>11</b>	<b>6.03201</b>	<b>0.021854</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0060537~muscle tissue development</b>	<b>8</b>	<b>7.405115</b>	<b>0.160474</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0022607~cellular component assembly</b>	<b>19</b>	<b>2.478459</b>	<b>0.874417</b>

GOTERM_BP_ALL	GO:0006941~striated muscle contraction	5	12.57662	1.026896
GOTERM_BP_ALL	GO:0009056~catabolic process	23	2.123873	1.454138
GOTERM_BP_ALL	GO:0008629~induction of apoptosis by intracellular signals	5	10.71342	1.880354
GOTERM_BP_ALL	GO:0055008~cardiac muscle tissue morphogenesis	4	17.14147	2.484445
GOTERM_BP_ALL	GO:0060415~muscle tissue morphogenesis	4	17.14147	2.484445
GOTERM_BP_ALL	GO:0031032~actomyosin structure organization	4	16.52927	2.761612
GOTERM_BP_ALL	GO:0010927~cellular component assembly involved in morphogenesis	4	12.8561	5.646813
GOTERM_BP_ALL	GO:0014706~striated muscle tissue development	6	5.833861	5.658409
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237~cellular metabolic process	73	1.272824	5.920073
GOTERM_BP_ALL	GO:0045214~sarcomere organization	3	28.92623	7.140805
GOTERM_BP_ALL	GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	9	3.326978	8.603839
GOTERM_BP_ALL	GO:0006917~induction of apoptosis	9	3.254201	9.738745
GOTERM_BP_ALL	GO:0044248~cellular catabolic process	18	2.033876	9.871825
GOTERM_BP_ALL	GO:0012502~induction of programmed cell death	9	3.244063	9.909014
GOTERM_BP_ALL	GO:0042771~DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis	3	23.14098	10.95705
GOTERM_BP_ALL	GO:0006096~glycolysis	4	9.847227	11.6221
GOTERM_BP_ALL	GO:0006412~translation	9	3.146055	11.72644
GOTERM_BP_ALL	GO:0043462~regulation of ATPase activity	3	21.69467	12.36199
GOTERM_BP_ALL	GO:0055002~striated muscle cell development	4	8.900378	15.08035
GOTERM_BP_ALL	GO:0051716~cellular response to stimulus	15	2.116553	15.69673
GOTERM_BP_ALL	GO:0055001~muscle cell development	4	8.264637	18.14839
GOTERM_BP_ALL	GO:0048738~cardiac muscle tissue development	4	8.119643	18.95397
GOTERM_BP_ALL	GO:0030036~actin cytoskeleton organization	7	3.583781	19.41506
GOTERM_BP_ALL	GO:0006007~glucose catabolic process	4	7.97965	19.77408
GOTERM_BP_ALL	GO:0044267~cellular protein metabolic process	31	1.52308	20.85242
GOTERM_BP_ALL	GO:0003015~heart process	3	15.09195	23.56173
GOTERM_BP_ALL	GO:0060047~heart contraction	3	15.09195	23.56173
GOTERM_BP_ALL	GO:0030029~actin filament-based process	7	3.360724	25.05041
GOTERM_BP_ALL	GO:0030330~DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	3	13.35057	28.83667
GOTERM_BP_ALL	GO:0008015~blood circulation	6	3.732417	30.29268
GOTERM_BP_ALL	GO:0003013~circulatory system process	6	3.732417	30.29268
GOTERM_BP_ALL	GO:0046365~monosaccharide catabolic process	4	6.518587	31.51955
GOTERM_BP_ALL	GO:0033554~cellular response to stress	11	2.248682	32.13123
GOTERM_BP_ALL	GO:0003007~heart morphogenesis	4	6.339996	33.45951
GOTERM_BP_ALL	GO:0010216~maintenance of DNA methylation	2	77.13661	34.28772
GOTERM_BP_ALL	GO:0000302~response to reactive oxygen species	4	6.170929	35.42125
GOTERM_BP_ALL	GO:0009888~tissue development	12	2.087908	36.42613
GOTERM_BP_ALL	GO:0016070~RNA metabolic process	15	1.850292	38.82017
GOTERM_BP_ALL	GO:0042770~DNA damage response, signal transduction	4	5.785246	40.38842
GOTERM_BP_ALL	GO:0043065~positive regulation of apoptosis	9	2.421731	40.69183
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238~primary metabolic process	71	1.186631	40.7409
GOTERM_BP_ALL	GO:0008630~DNA damage response, signal transduction resulting in induction of apoptosis	3	10.51863	41.42463
GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	77	1.165068	42.48196
GOTERM_BP_ALL	GO:0010942~positive regulation of cell death	9	2.393895	42.55799
GOTERM_BP_ALL	GO:0044419~interspecies interaction between organisms	7	2.861959	43.93925
GOTERM_BP_ALL	GO:0032956~regulation of actin cytoskeleton organization	4	5.200221	49.35345
GOTERM_BP_ALL	GO:0006006~glucose metabolic process	5	3.781206	50.7131
GOTERM_BP_ALL	GO:0006936~muscle contraction	5	3.781206	50.7131
GOTERM_BP_ALL	GO:0048523~negative regulation of cellular process	22	1.533439	51.16996
GOTERM_BP_ALL	GO:0032970~regulation of actin filament-based process	4	5.030649	52.29077
GOTERM_BP_ALL	GO:0051246~regulation of protein metabolic	10	2.119138	52.71655

	process			
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	33	1.357846	55.76801
GOTERM_BP_ALL	GO:0044260~cellular macromolecule metabolic process	55	1.220516	55.85973
GOTERM_BP_ALL	GO:0003012~muscle system process	5	3.443599	61.11998
GOTERM_BP_ALL	GO:0001501~skeletal system development	7	2.538979	61.21681
GOTERM_BP_ALL	GO:0051239~regulation of multicellular organismal process	14	1.728782	62.10536
GOTERM_BP_ALL	GO:0048731~system development	28	1.390445	62.29479
GOTERM_BP_ALL	GO:0016052~carbohydrate catabolic process	4	4.246052	67.68425
GOTERM_BP_ALL	GO:0010467~gene expression	34	1.31176	68.02015
GOTERM_BP_ALL	GO:0048729~tissue morphogenesis	5	3.214026	68.77625
GOTERM_BP_ALL	GO:0001817~regulation of cytokine production	5	3.196268	69.37849
GOTERM_BP_ALL	GO:0048745~smooth muscle tissue development	2	25.7122	71.63239
GOTERM_BP_ALL	GO:0030049~muscle filament sliding	2	25.7122	71.63239
GOTERM_BP_ALL	GO:0070252~actin-mediated cell contraction	2	25.7122	71.63239
GOTERM_BP_ALL	GO:0032781~positive regulation of ATPase activity	2	25.7122	71.63239
GOTERM_BP_ALL	GO:0033275~actin-myosin filament sliding	2	25.7122	71.63239
GOTERM_BP_ALL	GO:0048646~anatomical structure formation involved in morphogenesis	7	2.30095	75.22019
GOTERM_BP_ALL	GO:0042542~response to hydrogen peroxide	3	6.198478	75.64942
GOTERM_BP_ALL	GO:0048856~anatomical structure development	29	1.327836	76.48532
GOTERM_BP_ALL	GO:0042692~muscle cell differentiation	4	3.824956	76.68705
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton</b>	<b>10</b>	<b>3.814704</b>	<b>1.053706</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa04670:Leukocyte transendothelial migration</b>	<b>7</b>	<b>4.865364</b>	<b>3.02333</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa00010:Glycolysis / Gluconeogenesis</b>	<b>5</b>	<b>6.834677</b>	<b>6.120433</b>
KEGG_PATHWAY	hsa04260:Cardiac muscle contraction	5	5.257444	14.62699
KEGG_PATHWAY	hsa05410:Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	5	4.824478	19.06342
KEGG_PATHWAY	hsa05414:Dilated cardiomyopathy	5	4.457398	24.05519
KEGG_PATHWAY	hsa05110:Vibrio cholerae infection	4	5.858295	28.47365
KEGG_PATHWAY	hsa04530:Tight junction	5	3.060303	59.33849
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>muscle protein</b>	<b>9</b>	<b>19.49493</b>	<b>2.32E-05</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Phosphoprotein</b>	<b>89</b>	<b>1.592592</b>	<b>5.55E-05</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Acetylation</b>	<b>46</b>	<b>2.26886</b>	<b>1.12E-04</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Glycolysis</b>	<b>4</b>	<b>11.81511</b>	<b>5.92089</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Methyltransferase</b>	<b>6</b>	<b>5.341077</b>	<b>6.797936</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>ubl conjugation</b>	<b>12</b>	<b>2.652372</b>	<b>7.106029</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Cardiomyopathy</b>	<b>4</b>	<b>10.83052</b>	<b>7.504304</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>host-virus interaction</b>	<b>8</b>	<b>3.648174</b>	<b>8.11911</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Myosin</b>	<b>4</b>	<b>10.19343</b>	<b>8.828365</b>
SP_PIR_KEYWORDS	Gluconeogenesis	3	20.52098	11.39636
SP_PIR_KEYWORDS	Antiviral defense	4	8.384917	14.64464
SP_PIR_KEYWORDS	cardiac muscle	3	16.24578	17.38623
SP_PIR_KEYWORDS	Heart	3	16.24578	17.38623
SP_PIR_KEYWORDS	rna-binding	10	2.406782	26.56221
SP_PIR_KEYWORDS	actin binding	3	9.747466	39.62509
SP_PIR_KEYWORDS	extracellular matrix	6	3.235673	39.96331
SP_PIR_KEYWORDS	protein biosynthesis	5	3.456548	53.87086
<b>ANOVA 24h trattamento</b>				
<b>Category</b>	<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Fold Enrichment</b>	<b>FDR</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006396~RNA processing</b>	<b>40</b>	<b>1.908038</b>	<b>0.243369</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0015031~protein transport</b>	<b>50</b>	<b>1.712101</b>	<b>0.439316</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0016071~mRNA metabolic process</b>	<b>28</b>	<b>1.974562</b>	<b>1.795614</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0016070~RNA metabolic process</b>	<b>55</b>	<b>1.529939</b>	<b>2.899698</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0000398~nuclear mRNA splicing, via spliceosome</b>	<b>15</b>	<b>2.558081</b>	<b>3.843581</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0006944~membrane fusion</b>	<b>8</b>	<b>3.938479</b>	<b>6.59773</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0008152~metabolic process</b>	<b>323</b>	<b>1.102112</b>	<b>8.847702</b>
<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0007049~cell cycle</b>	<b>45</b>	<b>1.513091</b>	<b>9.536984</b>
GOTERM_BP_ALL	GO:0009057~macromolecule catabolic process	45	1.503405	10.60035
GOTERM_BP_ALL	GO:0006461~protein complex assembly	32	1.653381	10.9069
GOTERM_BP_ALL	GO:0070271~protein complex biogenesis	32	1.653381	10.9069
GOTERM_BP_ALL	GO:0006259~DNA metabolic process	32	1.650114	11.20976

GOTERM_BP_ALL	GO:0034613~cellular protein localization	27	1.714101	13.9102
GOTERM_BP_ALL	GO:0006605~protein targeting	17	2.063122	14.14844
GOTERM_BP_ALL	GO:0070585~protein localization in mitochondrion	6	4.604545	14.63506
GOTERM_BP_ALL	GO:0045214~sarcomere organization	4	8.697474	15.42758
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237~cellular metabolic process	282	1.10881	15.68917
GOTERM_BP_ALL	GO:0006213~pyrimidine nucleoside metabolic process	5	5.218484	22.2041
GOTERM_BP_ALL	GO:0044248~cellular catabolic process	54	1.375968	23.18954
GOTERM_BP_ALL	GO:0009056~catabolic process	63	1.311909	31.04924
GOTERM_BP_ALL	GO:0006308~DNA catabolic process	7	3.044116	37.88216
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238~primary metabolic process	287	1.081688	46.49248
GOTERM_BP_ALL	GO:0034976~response to endoplasmic reticulum stress	5	3.837121	50.9949
GOTERM_BP_ALL	GO:0051169~nuclear transport	12	1.981703	51.59383
GOTERM_BP_ALL	GO:0070647~protein modification by small protein conjugation or removal	12	1.956932	54.35403
GOTERM_BP_ALL	GO:0030239~myofibril assembly	4	4.969985	55.07251
GOTERM_BP_ALL	GO:0042254~ribosome biogenesis	10	2.138723	55.0883
GOTERM_BP_ALL	GO:0000718~nucleotide-excision repair, DNA damage removal	4	4.744077	59.4892
GOTERM_BP_ALL	GO:0030163~protein catabolic process	33	1.384325	62.7571
GOTERM_BP_ALL	GO:0034470~ncRNA processing	13	1.813912	63.5911
GOTERM_BP_ALL	GO:0006921~cell structure disassembly during apoptosis	4	4.537812	63.71476
GOTERM_BP_ALL	GO:0042542~response to hydrogen peroxide	6	2.795617	67.81366
GOTERM_BP_ALL	GO:0012501~programmed cell death	32	1.366543	70.47844
GOTERM_BP_ALL	GO:0000302~response to reactive oxygen species	7	2.435293	70.52896
GOTERM_BP_ALL	GO:0042743~hydrogen peroxide metabolic process	4	4.174787	71.4628
GOTERM_BP_ALL	GO:0010819~regulation of T cell chemotaxis	2	26.09242	74.72517
GOTERM_BP_ALL	GO:0010820~positive regulation of T cell chemotaxis	2	26.09242	74.72517
GOTERM_BP_ALL	GO:0030029~actin filament-based process	15	1.62401	76.84794
GOTERM_BP_ALL	GO:0060415~muscle tissue morphogenesis	4	3.865544	78.13655
GOTERM_BP_ALL	GO:0055008~cardiac muscle tissue morphogenesis	4	3.865544	78.13655
GOTERM_BP_ALL	GO:0007005~mitochondrion organization	10	1.890755	78.20195
GOTERM_BP_ALL	GO:0070661~leukocyte proliferation	5	2.965048	79.72927
GOTERM_BP_ALL	GO:0031032~actomyosin structure organization	4	3.727489	81.04726
GOTERM_BP_ALL	GO:0006749~glutathione metabolic process	4	3.727489	81.04726
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids</b>	<b>6</b>	<b>6.541595</b>	<b>2.065013</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa03040:Spliceosome</b>	<b>14</b>	<b>2.665094</b>	<b>2.389019</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa05120:Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection</b>	<b>9</b>	<b>3.174598</b>	<b>7.731493</b>
KEGG_PATHWAY	hsa00140:Steroid hormone biosynthesis	6	3.128589	39.14109
KEGG_PATHWAY	hsa03320:PPAR signaling pathway	7	2.433347	55.62543
KEGG_PATHWAY	hsa00150:Androgen and estrogen metabolism	5	3.241331	55.68986
KEGG_PATHWAY	hsa05010:Alzheimer's disease	12	1.765829	60.8236
KEGG_PATHWAY	hsa03018:RNA degradation	6	2.524826	66.18116
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Acetylation</b>	<b>176</b>	<b>1.827549</b>	<b>6.44E-13</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Mitochondrion</b>	<b>62</b>	<b>2.038944</b>	<b>2.53E-04</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Cytoplasm</b>	<b>170</b>	<b>1.395985</b>	<b>0.003392</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>rna-binding</b>	<b>43</b>	<b>2.178771</b>	<b>0.005157</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>mrna processing</b>	<b>22</b>	<b>2.315188</b>	<b>0.848849</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>endoplasmic reticulum</b>	<b>44</b>	<b>1.688496</b>	<b>1.30057</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>mitochondrion inner membrane</b>	<b>17</b>	<b>2.410063</b>	<b>2.787936</b>
SP_PIR_KEYWORDS	ribosome biogenesis	7	3.990191	10.54658
SP_PIR_KEYWORDS	stress response	8	3.316522	13.6032
SP_PIR_KEYWORDS	Spliceosome	11	2.50812	16.57077
SP_PIR_KEYWORDS	er-golgi transport	8	2.637235	37.2793
SP_PIR_KEYWORDS	nucleotide-binding	74	1.200912	65.5798
SP_PIR_KEYWORDS	acetylated amino end	8	2.188905	66.55888
SP_PIR_KEYWORDS	Cytoskeleton	31	1.333649	74.9141
SP_PIR_KEYWORDS	ATP	14	1.623128	75.48617
<b>ANOVA 21d origine geografica</b>				

Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0006414~translational elongation	20	4.819392	4.14E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0009987~cellular process	483	1.11519	5.28E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	366	1.16486	0.011547
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237~cellular metabolic process	325	1.191957	0.011617
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238~primary metabolic process	332	1.167152	0.068165
GOTERM_BP_ALL	GO:0051186~cofactor metabolic process	22	2.745818	0.092124
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	154	1.332874	0.115463
GOTERM_BP_ALL	GO:0044267~cellular protein metabolic process	131	1.35383	0.265253
GOTERM_BP_ALL	GO:0008015~blood circulation	20	2.616982	0.413916
GOTERM_BP_ALL	GO:0003013~circulatory system process	20	2.616982	0.413916
GOTERM_BP_ALL	GO:0051246~regulation of protein metabolic process	41	1.827574	0.480561
GOTERM_BP_ALL	GO:0035150~regulation of tube size	10	4.592062	0.483179
GOTERM_BP_ALL	GO:0050880~regulation of blood vessel size	10	4.592062	0.483179
GOTERM_BP_ALL	GO:0042311~vasodilation	7	6.55252	0.937351
GOTERM_BP_ALL	GO:0003018~vascular process in circulatory system	10	4.196195	0.965658
GOTERM_BP_ALL	GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	26	2.021681	2.02
GOTERM_BP_ALL	GO:0009060~aerobic respiration	7	4.867586	4.744414
GOTERM_BP_ALL	GO:0032268~regulation of cellular protein metabolic process	33	1.694413	6.75982
GOTERM_BP_ALL	GO:0045454~cell redox homeostasis	9	3.476847	6.965905
GOTERM_BP_ALL	GO:0009308~amine metabolic process	29	1.7645	7.113973
GOTERM_BP_ALL	GO:0045732~positive regulation of protein catabolic process	6	5.408429	7.466746
GOTERM_BP_ALL	GO:0006916~anti-apoptosis	18	2.126615	8.366369
GOTERM_BP_ALL	GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	19	2.064378	8.574501
GOTERM_BP_ALL	GO:0006749~glutathione metabolic process	6	5.215271	8.732647
GOTERM_BP_ALL	GO:0015669~gas transport	5	6.760536	9.209968
GOTERM_BP_ALL	GO:0006520~cellular amino acid metabolic process	19	2.046109	9.354358
GOTERM_BP_ALL	GO:0055086~nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process	24	1.84845	9.551257
GOTERM_BP_ALL	GO:0006518~peptide metabolic process	8	3.67365	9.580836
GOTERM_BP_ALL	GO:0001944~vasculature development	20	1.939277	12.52319
GOTERM_BP_ALL	GO:0005996~monosaccharide metabolic process	18	1.973346	16.32255
GOTERM_BP_ALL	GO:0065008~regulation of biological quality	79	1.308847	16.37662
GOTERM_BP_ALL	GO:0001568~blood vessel development	19	1.887431	19.61014
GOTERM_BP_ALL	GO:0009896~positive regulation of catabolic process	7	3.476847	22.90802
GOTERM_BP_ALL	GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	23	1.722377	23.22501
GOTERM_BP_ALL	GO:0015980~energy derivation by oxidation of organic compounds	13	2.197174	24.15599
GOTERM_BP_ALL	GO:0032506~cytokinetic process	3	14.60276	24.21923
GOTERM_BP_ALL	GO:0006512~ubiquitin cycle	5	5.070402	24.25072
GOTERM_BP_ALL	GO:0046395~carboxylic acid catabolic process	11	2.411867	24.61334
GOTERM_BP_ALL	GO:0016054~organic acid catabolic process	11	2.411867	24.61334
GOTERM_BP_ALL	GO:0006461~protein complex assembly	32	1.542206	25.3011
GOTERM_BP_ALL	GO:0070271~protein complex biogenesis	32	1.542206	25.3011
GOTERM_BP_ALL	GO:0019216~regulation of lipid metabolic process	11	2.390333	25.87536
GOTERM_BP_ALL	GO:0046364~monosaccharide biosynthetic process	6	3.946692	26.03407
GOTERM_BP_ALL	GO:0016072~rRNA metabolic process	10	2.535201	26.15666
GOTERM_BP_ALL	GO:0006396~RNA processing	34	1.512778	26.16696
GOTERM_BP_ALL	GO:0045862~positive regulation of proteolysis	5	4.867586	27.42595
GOTERM_BP_ALL	GO:0006753~nucleoside phosphate metabolic process	21	1.744357	27.67542
GOTERM_BP_ALL	GO:0009117~nucleotide metabolic process	21	1.744357	27.67542
GOTERM_BP_ALL	GO:0006508~proteolysis	58	1.339279	28.87448
GOTERM_BP_ALL	GO:0007010~cytoskeleton organization	28	1.562986	32.41616
GOTERM_BP_ALL	GO:0060548~negative regulation of cell death	24	1.622529	34.62682
GOTERM_BP_ALL	GO:0043161~proteasomal ubiquitin-dependent	10	2.386072	35.23005

	protein catabolic process			
GOTERM_BP_ALL	GO:0008380~RNA splicing	20	1.713939	36.05479
GOTERM_BP_ALL	GO:0042592~homeostatic process	43	1.393517	36.2268
GOTERM_BP_ALL	GO:0000910~cytokinesis	6	3.561648	36.61153
GOTERM_BP_ALL	GO:0022402~cell cycle process	34	1.464583	36.76949
GOTERM_BP_ALL	GO:0044106~cellular amine metabolic process	21	1.675726	37.57914
GOTERM_BP_ALL	GO:0044262~cellular carbohydrate metabolic process	25	1.572218	40.29765
GOTERM_BP_ALL	GO:0005975~carbohydrate metabolic process	32	1.46946	41.21975
GOTERM_BP_ALL	GO:0022607~cellular component assembly	49	1.344485	41.35657
GOTERM_BP_ALL	GO:0009057~macromolecule catabolic process	44	1.371151	41.69299
GOTERM_BP_ALL	GO:0050790~regulation of catalytic activity	47	1.352107	42.25754
GOTERM_BP_ALL	GO:0007093~mitotic cell cycle checkpoint	6	3.39599	42.27666
GOTERM_BP_ALL	GO:0034599~cellular response to oxidative stress	6	3.39599	42.27666
GOTERM_BP_ALL	GO:0019430~removal of superoxide radicals	3	10.43054	42.63648
GOTERM_BP_ALL	GO:0006007~glucose catabolic process	7	2.937337	42.82284
GOTERM_BP_ALL	GO:0051726~regulation of cell cycle	22	1.617627	43.42106
GOTERM_BP_ALL	GO:0016051~carbohydrate biosynthetic process	10	2.274573	43.543
GOTERM_BP_ALL	GO:0031399~regulation of protein modification process	20	1.650029	46.63842
GOTERM_BP_ALL	GO:0051603~proteolysis involved in cellular protein catabolic process	35	1.419713	46.7171
GOTERM_BP_ALL	GO:0016052~carbohydrate catabolic process	10	2.232838	46.97959
GOTERM_BP_ALL	GO:0030163~protein catabolic process	36	1.408626	48.21689
GOTERM_BP_ALL	GO:0044257~cellular protein catabolic process	35	1.412649	48.93219
GOTERM_BP_ALL	GO:0006108~malate metabolic process	3	9.126724	51.54722
GOTERM_BP_ALL	GO:0051438~regulation of ubiquitin-protein ligase activity	8	2.496198	52.16155
GOTERM_BP_ALL	GO:0001525~angiogenesis	12	1.973346	52.72092
GOTERM_BP_ALL	GO:0006164~purine nucleotide biosynthetic process	12	1.973346	52.72092
GOTERM_BP_ALL	GO:0006096~glycolysis	6	3.10697	53.8029
GOTERM_BP_ALL	GO:0001666~response to hypoxia	11	1.99789	59.0843
GOTERM_BP_ALL	GO:0006006~glucose metabolic process	12	1.908857	60.08661
GOTERM_BP_ALL	GO:0048514~blood vessel morphogenesis	15	1.730185	61.73565
GOTERM_BP_ALL	GO:0001569~patterning of blood vessels	4	4.635796	61.85805
GOTERM_BP_ALL	GO:0000303~response to superoxide	3	7.301379	67.22085
GOTERM_BP_ALL	GO:0042176~regulation of protein catabolic process	6	2.808223	67.42215
GOTERM_BP_ALL	GO:0034637~cellular carbohydrate biosynthetic process	7	2.469065	68.73107
GOTERM_BP_ALL	GO:0030198~extracellular matrix organization	9	2.106167	69.03014
GOTERM_BP_ALL	GO:0070482~response to oxygen levels	11	1.898704	69.59914
GOTERM_BP_ALL	GO:0006397~mRNA processing	20	1.516382	72.12486
GOTERM_BP_ALL	GO:0000305~response to oxygen radical	3	6.637618	73.69105
GOTERM_BP_ALL	GO:0006511~ubiquitin-dependent protein catabolic process	16	1.609119	73.8613
GOTERM_BP_ALL	GO:0006979~response to oxidative stress	12	1.780824	74.92637
GOTERM_BP_ALL	GO:0042542~response to hydrogen peroxide	6	2.607635	76.79384
GOTERM_BP_ALL	GO:0015986~ATP synthesis coupled proton transport	5	3.042241	77.38052
GOTERM_BP_ALL	GO:0015985~energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	5	3.042241	77.38052
GOTERM_BP_ALL	GO:0000226~microtubule cytoskeleton organization	11	1.821206	77.55976
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa03010:Ribosome</b>	<b>17</b>	<b>3.896552</b>	<b>0.005501</b>
<b>KEGG_PATHWAY</b>	<b>hsa00480:Glutathione metabolism</b>	<b>10</b>	<b>3.988235</b>	<b>0.836972</b>
KEGG_PATHWAY	hsa04510:Focal adhesion	18	1.785777	23.82033
KEGG_PATHWAY	hsa00630:Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4	5.317647	35.75916
KEGG_PATHWAY	hsa05211:Renal cell carcinoma	8	2.278992	52.0009
KEGG_PATHWAY	hsa00520:Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	6	2.719251	56.50025
KEGG_PATHWAY	hsa04810:Regulation of actin cytoskeleton	17	1.576744	58.33738
KEGG_PATHWAY	hsa00980:Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	7	2.326471	62.23171

KEGG_PATHWAY	hsa00051:Fructose and mannose metabolism	5	2.932526	66.89415
SP_PIR_KEYWORDS	Acetylation	201	1.990857	5.46E-20
SP_PIR_KEYWORDS	Phosphoprotein	374	1.343941	3.66E-10
SP_PIR_KEYWORDS	Ribosoma	18	6.435382	2.33E-06
SP_PIR_KEYWORDS	Cytoplasm	191	1.496074	3.41E-06
SP_PIR_KEYWORDS	Mitochondrion	63	1.97625	5.93E-04
SP_PIR_KEYWORDS	protein biosynthesis	24	3.331794	0.00131
SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	44	1.610601	3.226724
SP_PIR_KEYWORDS	mrna splicing	17	2.122889	9.372955
SP_PIR_KEYWORDS	alternative initiation	7	2.854584	40.78434
SP_PIR_KEYWORDS	Angiogenesis	7	2.768081	44.99338
SP_PIR_KEYWORDS	Antioxidant	3	8.699683	48.12996
SP_PIR_KEYWORDS	Myosin	6	3.070476	48.67947
SP_PIR_KEYWORDS	Chylomicron	3	7.117923	61.85326
SP_PIR_KEYWORDS	Blood	3	7.117923	61.85326
SP_PIR_KEYWORDS	oxygen tran sport	3	6.524763	67.8407
<b>ANOVA 21d trattamento</b>				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	1120	1.233572	2.98E-26
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237~cellular metabolic process	1002	1.271742	4.35E-26
GOTERM_BP_ALL	GO:0009987~cellular process	1414	1.12981	2.08E-21
GOTERM_BP_ALL	GO:0006396~RNA processing	144	2.21724	7.58E-18
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238~primary metabolic process	997	1.212938	3.91E-17
GOTERM_BP_ALL	GO:0016070~RNA metabolic process	201	1.804807	1.02E-14
GOTERM_BP_ALL	GO:0051438~regulation of ubiquitin-protein ligase activity	37	3.995257	8.75E-11
GOTERM_BP_ALL	GO:0043161~proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	43	3.550634	9.36E-11
GOTERM_BP_ALL	GO:0016071~mRNA metabolic process	93	2.11699	3.38E-09
GOTERM_BP_ALL	GO:0044267~cellular protein metabolic process	383	1.369763	5.67E-09
GOTERM_BP_ALL	GO:0042254~ribosome biogenesis	45	3.106636	5.77E-09
GOTERM_BP_ALL	GO:0051437~positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	32	3.963499	7.58E-09
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	443	1.326863	8.54E-09
GOTERM_BP_ALL	GO:0000375~RNA splicing, via transesterification reactions	50	2.75243	5.13E-08
GOTERM_BP_ALL	GO:0045333~cellular respiration	37	3.212681	2.11E-07
GOTERM_BP_ALL	GO:0016072~rRNA metabolic process	36	3.158413	6.75E-07
GOTERM_BP_ALL	GO:0015980~energy derivation by oxidation of organic compounds	43	2.515032	3.02E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0055086~nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process	73	1.945689	4.86E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0044248~cellular catabolic process	180	1.480506	5.15E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0009056~catabolic process	208	1.398138	3.63E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0032268~regulation of cellular protein metabolic process	95	1.688041	5.12E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	535	1.192695	7.77E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0016043~cellular component organization	371	1.25089	0.00108
GOTERM_BP_ALL	GO:0009057~macromolecule catabolic process	137	1.477431	0.003399
GOTERM_BP_ALL	GO:0030163~protein catabolic process	114	1.543662	0.003433
GOTERM_BP_ALL	GO:0022904~respiratory electron transport chain	23	3.026812	0.003927
GOTERM_BP_ALL	GO:0006457~protein folding	43	2.046128	0.013097
GOTERM_BP_ALL	GO:0051603~proteolysis involved in cellular protein catabolic process	108	1.516038	0.015217
GOTERM_BP_ALL	GO:0051247~positive regulation of protein metabolic process	53	1.836992	0.027616
GOTERM_BP_ALL	GO:0042180~cellular ketone metabolic process	102	1.515147	0.028528
GOTERM_BP_ALL	GO:0006082~organic acid metabolic process	100	1.504006	0.047599
GOTERM_BP_ALL	GO:0006839~mitochondrial tran sport	22	2.685414	0.056188
GOTERM_BP_ALL	GO:0006749~glutathione metabolic process	13	3.910416	0.067836
GOTERM_BP_ALL	GO:0006626~protein targeting to mitochondrion	14	3.468061	0.135966
GOTERM_BP_ALL	GO:0006508~proteolysis	166	1.326493	0.150718

GOTERM_BP_ALL	GO:0006518~peptide metabolic process	18	2.860449	0.151831
GOTERM_BP_ALL	GO:0006732~coenzyme metabolic process	36	1.981749	0.164202
GOTERM_BP_ALL	GO:0044106~cellular amine metabolic process	59	1.629258	0.318451
GOTERM_BP_ALL	GO:0070271~protein complex biogenesis	88	1.467672	0.36372
GOTERM_BP_ALL	GO:0019748~secondary metabolic process	22	2.345488	0.480898
GOTERM_BP_ALL	GO:0051726~regulation of cell cycle	62	1.577616	0.532419
GOTERM_BP_ALL	GO:0010467~gene expression	410	1.15145	0.880566
GOTERM_BP_ALL	GO:0042542~response to hydrogen peroxide	17	2.55681	1.063635
GOTERM_BP_ALL	GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	117	1.342541	1.214872
GOTERM_BP_ALL	GO:0030198~extracellular matrix organization	25	2.024624	1.733628
GOTERM_BP_ALL	GO:0000302~response to reactive oxygen species	20	2.245982	1.754032
GOTERM_BP_ALL	GO:0034599~cellular response to oxidative stress	14	2.742188	1.908699
GOTERM_BP_ALL	GO:0012501~programmed cell death	99	1.364682	1.922003
GOTERM_BP_ALL	GO:0006979~response to oxidative stress	34	1.746114	2.840483
GOTERM_BP_ALL	GO:0034614~cellular response to reactive oxygen species	11	3.088226	3.136628
GOTERM_BP_ALL	GO:0006915~apoptosis	95	1.329122	5.467567
GOTERM_BP_ALL	GO:0018130~heterocycle biosynthetic process	16	2.28405	5.496456
GOTERM_BP_ALL	GO:0009451~RNA modification	14	2.456543	5.619055
GOTERM_BP_ALL	GO:0008219~cell death	110	1.28855	6.93374
GOTERM_BP_ALL	GO:0030433~ER-associated protein catabolic process	9	3.158413	8.755843
GOTERM_BP_ALL	GO:0030199~collagen fibril organization	10	2.904288	8.846707
GOTERM_BP_ALL	GO:0016567~protein ubiquitination	25	1.769419	10.82796
GOTERM_BP_ALL	GO:0006259~DNA metabolic process	79	1.314965	15.29807
GOTERM_BP_ALL	GO:0006916~anti-apoptosis	37	1.512767	18.35259
GOTERM_BP_ALL	GO:0009893~positive regulation of metabolic process	133	1.216269	18.39778
GOTERM_BP_ALL	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	80	1.280979	25.33529
GOTERM_BP_ALL	GO:0002520~immune system development	46	1.403739	26.49145
GOTERM_BP_ALL	GO:0043038~amino acid activation	12	2.197157	26.68341
GOTERM_BP_ALL	GO:0006800~oxygen and reactive oxygen species metabolic process	15	1.88562	36.05835
GOTERM_BP_ALL	GO:0022616~DNA strand elongation	4	5.614956	37.79409
GOTERM_BP_ALL	GO:0001666~response to hypoxia	25	1.57135	37.84512
GOTERM_BP_ALL	GO:0010941~regulation of cell death	116	1.198776	38.2799
GOTERM_BP_ALL	GO:0006631~fatty acid metabolic process	34	1.446277	39.92739
GOTERM_BP_ALL	GO:0043067~regulation of programmed cell death	115	1.192832	42.56755
GOTERM_BP_ALL	GO:0043066~negative regulation of apoptosis	55	1.30857	44.46345
GOTERM_BP_ALL	GO:0051881~regulation of mitochondrial membrane potential	5	3.828379	46.12445
GOTERM_BP_ALL	GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	42	1.360547	47.95173
GOTERM_BP_ALL	GO:0051409~response to nitrosative stress	3	8.422434	52.05682
GOTERM_BP_ALL	GO:0009173~pyrimidine ribonucleoside monophosphate metabolic process	3	8.422434	52.05682
GOTERM_BP_ALL	GO:0006222~UMP biosynthetic process	3	8.422434	52.05682
GOTERM_BP_ALL	GO:0043248~proteasome assembly	3	8.422434	52.05682
GOTERM_BP_ALL	GO:0007517~muscle organ development	35	1.397086	52.06237
GOTERM_BP_ALL	GO:0006473~protein amino acid acetylation	12	1.943639	52.14558
GOTERM_BP_ALL	GO:0042176~regulation of protein catabolic process	12	1.943639	52.14558
GOTERM_BP_ALL	GO:0019430~removal of superoxide radicals	4	4.81282	53.43472
GOTERM_BP_ALL	GO:0042744~hydrogen peroxide catabolic process	6	2.972624	55.42983
GOTERM_BP_ALL	GO:0070482~response to oxygen levels	25	1.493339	55.91827
GOTERM_BP_ALL	GO:0030097~hemopoiesis	38	1.356155	58.41967
GOTERM_BP_ALL	GO:0006308~DNA catabolic process	13	1.824861	59.05634
GOTERM_BP_ALL	GO:0042981~regulation of apoptosis	112	1.173274	59.28708
GOTERM_BP_ALL	GO:0006629~lipid metabolic process	113	1.170646	60.25374
GOTERM_BP_ALL	GO:0070301~cellular response to hydrogen peroxide	6	2.807478	63.89972
GOTERM_BP_ALL	GO:0008631~induction of apoptosis by oxidative stress	4	4.211217	67.63372

KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	50	2.850081	1.96E-09
KEGG_PATHWAY	hsa03050:Proteasome	26	3.973134	2.27E-07
KEGG_PATHWAY	hsa05012:Parkinson's disease	45	2.524993	2.98E-06
KEGG_PATHWAY	hsa05016:Huntington's disease	55	2.194562	1.21E-05
KEGG_PATHWAY	hsa00190:Oxidative phosphorylation	43	2.375652	5.51E-05
KEGG_PATHWAY	hsa03018:RNA degradation	21	2.646075	0.052904
KEGG_PATHWAY	hsa00240:Pyrimidine metabolism	28	2.11686	0.181799
KEGG_PATHWAY	hsa04120:Ubiquitin mediated proteolysis	36	1.887294	0.21705
KEGG_PATHWAY	hsa00480:Glutathione metabolism	16	2.298305	2.943314
KEGG_PATHWAY	hsa03430:Mismatch repair	9	2.810427	11.24777
KEGG_PATHWAY	hsa03020:RNA polymerase	10	2.565073	12.58958
KEGG_PATHWAY	hsa00230:Purine metabolism	32	1.50216	19.78037
KEGG_PATHWAY	hsa03010:Ribosome	20	1.651081	29.41186
KEGG_PATHWAY	hsa04260:Cardiac muscle contraction	18	1.657432	37.08861
KEGG_PATHWAY	hsa00270:Cysteine and methionine metabolism	10	2.112413	38.3104
KEGG_PATHWAY	hsa00020:Citrate cycle (TCA cycle)	9	2.085156	51.36251
KEGG_PATHWAY	hsa04110:Cell cycle	25	1.436441	52.94396
KEGG_PATHWAY	hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids	7	2.285247	61.46754
SP_PIR_KEYWORDS	Acetylation	630	2.217397	2.16E-95
SP_PIR_KEYWORDS	Mitochondrion	235	2.619558	5.61E-43
SP_PIR_KEYWORDS	transit peptide	151	2.942073	1.41E-32
SP_PIR_KEYWORDS	mrna splicing	66	2.928742	1.34E-12
SP_PIR_KEYWORDS	Proteasome	30	4.968401	4.41E-11
SP_PIR_KEYWORDS	mrna processing	70	2.49694	1.05E-09
SP_PIR_KEYWORDS	respiratory chain	30	3.918739	8.05E-08
SP_PIR_KEYWORDS	Chaperone	46	2.700127	8.87E-07
SP_PIR_KEYWORDS	Spliceosome	37	2.859591	1.00E-05
SP_PIR_KEYWORDS	protein biosynthesis	44	2.170592	0.001976
SP_PIR_KEYWORDS	endoplasmic reticulum	116	1.50887	0.00903
SP_PIR_KEYWORDS	mitochondrial inner membrane	10	4.881236	0.098296
SP_PIR_KEYWORDS	Antioxidant	7	7.213383	0.148226
SP_PIR_KEYWORDS	cell division	48	1.686245	0.573211
SP_PIR_KEYWORDS	protein degradation	9	4.393113	0.685899
SP_PIR_KEYWORDS	actin binding	12	2.782305	3.942695
SP_PIR_KEYWORDS	amino-acid biosynthesis	9	3.477881	4.016588
SP_PIR_KEYWORDS	Ubiquinone	10	3.09145	4.965692
SP_PIR_KEYWORDS	Lysosome	26	1.618343	22.40703
SP_PIR_KEYWORDS	Apoptosis	55	1.338817	28.73934
SP_PIR_KEYWORDS	muscle protein	13	2.009442	31.53201
SP_PIR_KEYWORDS	GTP binding	14	1.937924	32.00844
SP_PIR_KEYWORDS	Methylation	37	1.417979	35.64013
SP_PIR_KEYWORDS	Hydrogen ion transport	11	2.125372	36.6613
SP_PIR_KEYWORDS	pentose phosphate pathway	4	5.299628	38.27139
SP_PIR_KEYWORDS	muscle contraction	5	3.864312	39.63078
SP_PIR_KEYWORDS	oxygen transport	5	3.864312	39.63078
SP_PIR_KEYWORDS	purine biosynthesis	5	3.864312	39.63078
SP_PIR_KEYWORDS	molecular chaperone	5	3.567057	48.93227
SP_PIR_KEYWORDS	lipid synthesis	17	1.608816	60.46098
SP_PIR_KEYWORDS	extracellular matrix	35	1.346897	61.94828
SP_PIR_KEYWORDS	fatty acid metabolism	12	1.795035	64.25905
SP_PIR_KEYWORDS	phospholipid binding	6	2.529368	71.94867
SP_PIR_KEYWORDS	Fatty acid biosynthesis	9	1.941143	74.29526
SP_PIR_KEYWORDS	polyamine biosynthesis	3	5.564609	77.22809
SP_PIR_KEYWORDS	Angiogenesis	12	1.686245	77.59858
SP_PIR_KEYWORDS	mRNA transport	13	1.629278	78.79307
SP_PIR_KEYWORDS	fatty acid metabolism	12	1.795035	64.25905
SP_PIR_KEYWORDS	phospholipid binding	6	2.529368	71.94867
<b>ANOVA 21d interazione</b>				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0043062~extracellular structure organization	7	7.048937	0.699976
GOTERM_BP_ALL	GO:0030199~collagen fibril organization	4	22.63994	1.07839
GOTERM_BP_ALL	GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	8	4.040358	5.254418

GOTERM_BP_ALL	GO:0006396~RNA processing	9	2.70065	23.74629
GOTERM_BP_ALL	GO:0043589~skin morphogenesis	2	82.06977	31.67274
GOTERM_BP_ALL	GO:0048545~response to steroid hormone stimulus	5	4.274467	36.73192
GOTERM_BP_ALL	GO:0043603~cellular amide metabolic process	3	8.793189	51.40647
GOTERM_BP_ALL	GO:0045745~positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway	2	32.82791	61.41692
GOTERM_BP_ALL	GO:0007155~cell adhesion	9	2.110365	61.99154
GOTERM_BP_ALL	GO:0015849~organic acid transport	4	4.436204	62.23803
GOTERM_BP_ALL	GO:0008033~tRNA processing	3	6.479192	71.59203
GOTERM_BP_ALL	GO:0030204~chondroitin sulfate metabolic process	2	23.4485	73.64438
GOTERM_BP_ALL	GO:0009309~amine biosynthetic process	3	6.079242	75.59887
KEGG_PATHWAY	hsa04512:ECM-receptor interaction	3	5.675223	62.17918
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>extracellular matrix</b>	<b>11</b>	<b>8.28251</b>	<b>0.001035</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Collagen</b>	<b>6</b>	<b>11.46077</b>	<b>0.221804</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Proteoglycan</b>	<b>4</b>	<b>13.44165</b>	<b>4.038105</b>
<b>SP_PIR_KEYWORDS</b>	<b>Acetylation</b>	<b>26</b>	<b>1.790519</b>	<b>4.480662</b>
SP_PIR_KEYWORDS	dermatan sulfate	2	181.4623	13.12029
SP_PIR_KEYWORDS	Skin	2	72.58491	29.64677
SP_PIR_KEYWORDS	Duplication	5	3.979436	37.86215
SP_PIR_KEYWORDS	Cartilage	2	51.84636	38.87956
SP_PIR_KEYWORDS	Bone	2	45.36557	43.03143
SP_PIR_KEYWORDS	rrna processing	3	8.924374	43.78971
SP_PIR_KEYWORDS	chondroitin sulfate proteoglycan	2	21.3485	69.75851

## APPENDICE F

Termini di GO, associati ai trascritti unici di orata, maggiormente rappresentati all'interno delle categorie Biological Process (BP) e Pathway per i geni differenzialmente espressi in comune tra branchia e fegato dopo 21d dalla diminuzione di temperatura.

21d sovra-espressi				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0051438~regulation of ubiquitin-protein ligase activity	11	14.9678	4.11E-06
GOTERM_BP_ALL	GO:0044237~cellular metabolic process	96	1.535412	7.05E-06
GOTERM_BP_ALL	GO:0044238~primary metabolic process	98	1.502421	1.24E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0008152~metabolic process	104	1.443452	1.43E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0006511~ubiquitin-dependent protein catabolic process	15	6.578637	9.15E-05
GOTERM_BP_ALL	GO:0006396~RNA processing	21	4.074666	2.59E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0010498~proteasomal protein catabolic process	10	10.40543	7.06E-04
GOTERM_BP_ALL	GO:0008380~RNA splicing	14	5.232024	0.003953
GOTERM_BP_ALL	GO:0030163~protein catabolic process	20	3.412712	0.007886
GOTERM_BP_ALL	GO:0009057~macromolecule catabolic process	22	2.989728	0.01721
GOTERM_BP_ALL	GO:0051603~proteolysis involved in cellular protein catabolic process	19	3.360952	0.018316
GOTERM_BP_ALL	GO:0016070~RNA metabolic process	24	2.715616	0.027798
GOTERM_BP_ALL	GO:0009056~catabolic process	27	2.287034	0.129408
GOTERM_BP_ALL	GO:0006508~proteolysis	21	2.114651	2.811551
GOTERM_BP_ALL	GO:0050790~regulation of catalytic activity	17	2.132743	8.230946
GOTERM_BP_ALL	GO:0044106~cellular amine metabolic process	9	3.131862	11.56032
GOTERM_BP_ALL	GO:0044267~cellular protein metabolic process	34	1.532315	13.4545
GOTERM_BP_ALL	GO:0007005~mitochondrion organization	6	4.61458	13.7798
GOTERM_BP_ALL	GO:0006259~DNA metabolic process	11	2.30729	27.2391
GOTERM_BP_ALL	GO:0019538~protein metabolic process	37	1.396518	32.38588
GOTERM_BP_ALL	GO:0006633~fatty acid biosynthetic process	4	5.373941	44.86548
GOTERM_BP_ALL	GO:0010467~gene expression	38	1.344829	45.44764
GOTERM_BP_ALL	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	10	2.017782	60.55493
GOTERM_BP_ALL	GO:0006629~lipid metabolic process	13	1.697121	71.61453
KEGG_PATHWAY	hsa03050:Proteasome	8	14.42553	8.33E-04
KEGG_PATHWAY	hsa03040:Spliceosome	10	6.72619	0.011296
KEGG_PATHWAY	hsa00480:Glutathione metabolism	4	6.78	17.56719
SP_PIR_KEYWORDS	Acetylation	67	3.056796	4.58E-15
SP_PIR_KEYWORDS	Proteasome	9	19.32087	2.36E-05
SP_PIR_KEYWORDS	mrna splicing	13	7.477721	2.21E-04
SP_PIR_KEYWORDS	mrna processing	13	6.010938	0.002253
SP_PIR_KEYWORDS	Mitochondrion	20	2.889874	0.075369
SP_PIR_KEYWORDS	Spliceosome	8	8.014583	0.07991
SP_PIR_KEYWORDS	Nadp	8	6.165064	0.407656
SP_PIR_KEYWORDS	Protease	9	2.235473	46.62115
SP_PIR_KEYWORDS	Fatty acid biosynthesis	3	8.387355	47.31616
SP_PIR_KEYWORDS	Antioxidant	2	26.71528	61.31614
21d sotto-espressi				
Category	Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	GO:0002376~immune system process	19	3.277335	0.017036
GOTERM_BP_ALL	GO:0006955~immune response	15	3.742312	0.053515
GOTERM_BP_ALL	GO:0030198~extracellular matrix organization	6	9.93152	0.510816
GOTERM_BP_ALL	GO:0045321~leukocyte activation	8	5.690788	0.743667
GOTERM_BP_ALL	GO:0046649~lymphocyte activation	6	5.190342	8.651869

<b>GOTERM_BP_ALL</b>	<b>GO:0042110~T cell activation</b>	<b>5</b>	<b>6.831204</b>	<b>8.974558</b>
GOTERM_BP_ALL	GO:0006950~response to stress	18	1.838952	19.76971
GOTERM_BP_ALL	GO:0002263~cell activation during immune response	3	14.34553	25.03043
GOTERM_BP_ALL	GO:0002366~leukocyte activation during immune response	3	14.34553	25.03043
GOTERM_BP_ALL	GO:0007155~cell adhesion	10	2.459233	25.65127
GOTERM_BP_ALL	GO:0030098~lymphocyte differentiation	4	6.685295	28.90752
GOTERM_BP_ALL	GO:0006952~defense response	9	2.519215	32.43263
GOTERM_BP_ALL	GO:0044255~cellular lipid metabolic process	8	2.618195	39.35771
GOTERM_BP_ALL	GO:0006954~inflammatory response	6	3.178086	46.57415
GOTERM_BP_ALL	GO:0002521~leukocyte differentiation	4	5.256377	47.09729
GOTERM_BP_ALL	GO:0030097~hemopoiesis	5	3.647168	53.05497
GOTERM_BP_ALL	GO:0030217~T cell differentiation	3	7.945216	58.15262
GOTERM_BP_ALL	GO:0043030~regulation of macrophage activation	2	31.29933	63.24928
GOTERM_BP_ALL	GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	5	3.310507	63.85242
GOTERM_BP_ALL	GO:0051216~cartilage development	3	6.978906	66.80697
GOTERM_BP_ALL	GO:0016044~membrane organization	6	2.710966	67.03836
GOTERM_BP_ALL	GO:0048513~organ development	16	1.584776	67.16026
GOTERM_BP_ALL	GO:0002682~regulation of immune system process	6	2.6828	68.36956
GOTERM_BP_ALL	GO:0032496~response to lipopolysaccharide	3	6.707	69.42002
GOTERM_BP_ALL	GO:0055114~oxidation reduction	8	2.155197	70.16532
GOTERM_BP_ALL	GO:0002520~immune system development	5	3.118593	70.40118
GOTERM_BP_ALL	GO:0006334~nucleosome assembly	3	6.148084	74.96668
GOTERM_BP_ALL	GO:0009888~tissue development	8	2.070933	76.19384
KEGG_PATHWAY	hsa04670:Leukocyte transendothelial migration	4	4.536128	44.39551
KEGG_PATHWAY	hsa00010:Glycolysis / Gluconeogenesis	3	6.690789	53.98219
KEGG_PATHWAY	hsa04650:Natural killer cell mediated cytotoxicity	4	4.024535	54.64067
KEGG_PATHWAY	hsa05416:Viral myocarditis	3	5.654188	65.02806

## **Pubblicazioni su riviste internazionali relative al progetto di ricerca.**

Articolo sottomesso alla rivista *PlosOne*:

Mininni A N, Milan M, Ferraresso S, Petochi T, Livi S, Di Marco P, Marino G, Romualdi C, Bargelloni L, Patarnello T: **Response to cold stress in fish: transcriptome analysis of the gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) exposed to low temperature.**

Lavoro in preparazione:

Mininni A N, Milan M, Ferraresso S, Petochi T, Livi S, Marino G, Romualdi C, Bargelloni L, Patarnello T: **Short- and long-term response to cold shock in *Sparus aurata* (L.): comparison of gill transcriptome in samples of different geographic origin.**

## Ringraziamenti

Vorrei ringraziare prima di tutto il Prof. Patarnello, senza il quale l'attuazione e, soprattutto, la conclusione di questo lavoro non sarebbero state possibili. Un grazie sentito anche al Prof. Bargelloni, per la disponibilità e i consigli.

Un ringraziamento immenso a Maria Elena, Lisa, Massimo e Serena, amici con cui ho condiviso anni di studio e di lavoro, ma soprattutto viaggi, serate, emozioni e sogni. Indimenticabili.

Un grazie di cuore a Raffaele, per la scelta di condividere ogni momento, e a Julie, che ha dormito (QUASI) sempre al momento giusto e ha dettato i tempi della vita.

Un grazie infinito ai miei genitori, per essere un aiuto costante e un punto di riferimento fondamentale, giorno dopo giorno, sempre.