

## Metodi elettroforetici bidimensionali applicati allo studio di diversi sistemi membranali

Il progredire delle metodiche scientifiche e delle tecnologie nelle ultime decadi, ha catalizzato un'estensione degli scopi connessi agli studi in campo biologico spostando l'attenzione dalle riduttive analisi biochimiche a carico delle singole proteine ad un esame attento ed approfondito esteso all'intero proteoma. La proteomica nasce come naturale evoluzione della chimica delle proteine che rappresentava uno dei capisaldi nello studio della biologia durante gli anni ottanta. L'analisi proteomica implica la necessità di separare le proteine prima della loro caratterizzazione. Così tutta la qualità dell'intera analisi molto dipende dalle *performance* dei metodi di separazione adottati. Questo lavoro di tesi nasce dal condensamento di diverse pubblicazioni e vuole proporsi come un saggio delle diverse metodiche di elettroforesi bidimensionale applicabili allo studio di proteine di membrana. Utilizzando differenti tecniche elettroforetiche bidimensionali e di rivelazione sono state affrontate due tematiche di ricerca diverse su differenti sistemi biologici: nel capitolo 2 con una proteomica differenziale di tipo "classico" (2D IEF-SDS-PAGE) è stata studiata la degradazione delle proteine della membrana eritrocitaria durante la conservazione del sangue ad uso trasfusionale, nel capitolo 3 invece, prendendo come modello le proteine delle membrane fotosintetiche tilacoidali, è stato proposto un nuovo sistema elettroforetico bidimensionale nativo, sia in prima che in seconda dimensione (2D N-LP-IEF-SDS-PAGE), accoppiabile con una terza dimensione denaturante.

## Different methods for two-dimensional electrophoresis of membrane proteins

Developments in methods and technologies have resulted in an expansion of the purpose of biological studies from the reductionist biochemical analysis of single proteins to proteome-wide measurements. Proteomics and other complementary analysis methods are essential components of the emerging 'systems biology'. Proteome analysis implies the ability to separate proteins as a first step prior the characterization. Thus, the overall performance of the analysis strongly depends on the performance of the separation tool, usually two dimensional electrophoresis. This thesis gives an introduction to the proteomic technique and shows how two-dimensional electrophoresis works with membrane proteins. Different subjects and biological systems were investigated using different separative two-dimensional electrophoresis techniques. In chapter one, two-dimensional gel electrophoresis (2D IEF-SDS-PAGE) and mass spectrometry were used to identify protein profile changes in red blood cell membranes stored over time under atmospheric oxygen, in the presence or absence of protease inhibitors. In chapter two, a new 3D native electrophoretic protocol is proposed for an exhaustive separation and identification of membrane proteins. This method is based on native liquid phase isoelectrofocusing (N-LP-IEF) of protein complexes in the first dimension, followed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) in the second dimension, where both the pI and the molecular masses of protein complexes (2D N-LP-IEF-BN) were used to separate them in their native form.



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA  
DI VITERBO**

**Dipartimento di Scienze Ambientali**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
“GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE”- XX CICLO**

**Metodi elettroforetici bidimensionali applicati allo studio di diversi sistemi  
membranali**

**B11**

**Coordinatore:** Prof. Giorgio Pranterà

Firma

**Tutor:** Prof. Lello Zolla

Firma

**Dottorando:** Gian Maria D'Amici

Firma

*“Dedico questa tesi a tutti i  
politici italiani ..... Grazie.”*

---

**INDICE**

<b>CAPITOLO</b>	<b>LA PROTEOMICA COME STRUMENTO ESSENZIALE</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>PER LO STUDIO DELLE PROTEINE DI MEMBRANA</b>	
SEZIONE 1.1	LA PROTEOMICA	2
1.1.1	<i>Cos'è la proteomica?</i>	2
1.1.2	<i>Potenzialità della Proteomica</i>	4
1.1.3	<i>Proteomica d'espressione</i>	6
1.1.4	<i>Proteomica differenziale semiquantitativa</i>	7
1.1.5	<i>Modificoma: proteomica e studio delle modificazioni post-traduzionali (PTMsoica)</i>	9
SEZIONE 1.2	PROTEOMICA DELLE PROTEINE DI MEMBRANA	11
1.2.1	<i>Le membrane biologiche e le proteine di membrana</i>	11
1.2.2	<i>L'importanza delle proteine di membrana</i>	12
1.2.3	<i>Problematiche connesse all'analisi elettroforetica di proteine di membrana integrali</i>	14
1.2.4	<i>Sistemi elettroforetici comuni nell'analisi di proteine di membrana</i>	16
<b>CAPITOLO</b>	<b>VALUTAZIONE PROTEOMICA DELLE CAUSE</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>RESPONSABILI DELLA DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE DELLA MEMBRANA ERITROCITARIA DURANTE LO STOCCAGGIO DEL SANGUE AD USO TRASFUSIONALE</b>	
	<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>23</b>
SEZIONE 2.1	INTRODUZIONE	26
2.1.1	<i>Il sangue e i suoi componenti.</i>	26
2.1.2	<i>L'eritrocita</i>	26

---

2.1.3	<i>La membrana eritrocitaria</i>	30
2.1.4	<i>Il percorso del sangue donato</i>	32
2.1.5	<i>Il problema dello stoccaggio del sangue</i>	35
<b>SEZIONE 2.2</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>39</b>
2.2.1	<i>Campionamento</i>	39
2.2.2	<i>Estrazione della membrana eritrocitaria</i>	40
2.2.3	<i>Elettroforesi bidimensionale IEF-SDS-PAGE</i>	41
2.2.4	<i>Analisi statistica</i>	42
2.2.5	<i>Digestione triptica in gel</i>	42
2.2.6	<i>Nano RP-HPLC-ESI-MS/MS e sequenziamento peptidico</i>	42
2.2.7	<i>Misure dei livelli di glutatione</i>	43
<b>SEZIONE 2.3</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>45</b>
2.3.1	<i>Cinetica delle lesioni</i>	45
2.3.2	<i>Metodo di campionamento e linee guida concettuali dell'analisi</i>	48
2.3.3	<i>Entità dell'effetto dei ROS nella degradazione proteica</i>	50
2.3.4	<i>Entità dell'effetto delle proteasi nella degradazione proteica</i>	65
2.3.5	<i>Valutazione quantitativa del contributo dei fenomeni degenerativi</i>	67
2.3.6	<i>Conclusioni</i>	69
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>ACCOPPIAMENTO DI IEF NATIVA IN FASE LIQUIDA CON BN-PAGE: UN NUOVO ESEMPIO DI ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE NATIVA PER LA SEPARAZIONE DI COMPLESSI MULTIPROTEICI DI MEMBRANA</b>	<b>71</b>
	<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>72</b>
<b>SEZIONE 3.1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>74</b>

---

3.1.1	<i>Importanza dello studio del proteoma nativo</i>	74
3.1.2	<i>Principali metodi elettroforetici nativi: BN-GEL e CN-GEL</i>	76
SEZIONE 3.2	<b>MATERIALI E METODI</b>	80
3.2.1	<i>Allestimento di colture idroponiche.</i>	80
3.2.2	<i>Estrazione delle membrane tilacoidali.</i>	81
3.2.3	<i>Solubilizzazione delle membrane tilacoidali</i>	81
3.2.4	<i>1D BN-PAGE</i>	82
3.2.5	<i>1 D BN-PAGE con urea</i>	82
3.2.6	<i>2D BN/BN-PAGE</i>	82
3.2.7	<i>2D N-LP-IEF-BN-PAGE</i>	82
3.2.8	<i>3D SDS-PAGE</i>	83
3.2.9	<i>Digestione triptica in gel</i>	83
3.2.10	<i>Nano RP-HPLC-ESI-MS/MS e sequenziamento peptidici</i>	84
SEZIONE 3.3	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	85
3.3.1	<i>BN-PAGE dei complessi multiproteici delle membrane tilacoidali di diverse specie vegetali</i>	85
3.3.2	<i>2D BN/BN-PAGE di complessi multiproteici delle membrane tilacoidali</i>	90
3.3.3	<i>2D N-LP-IEF-BN-PAGE di complessi multiproteici delle membrane tilacoidali</i>	93
3.3.4	<i>N-LP-IEF-BN-PAGE di complessi multiproteici delle membrane tilacoidali con 1.5 M urea</i>	95
3.3.5	<i>3D N-LP-IEF-BN-SDS-PAGE</i>	111
3.3.6	<i>Conclusioni</i>	113
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	115
	<b>PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI AI CONGRESSI</b>	127

**RINGRAZIAMENTI**

132

## **CAPITOLO 1**

# **LA PROTEOMICA COME STRUMENTO ESSENZIALE PER LO STUDIO DELLE PROTEINE DI MEMBRANA**

## SEZIONE 1.1: LA PROTEOMICA

### 1.1.1 Cos'è la proteomica?

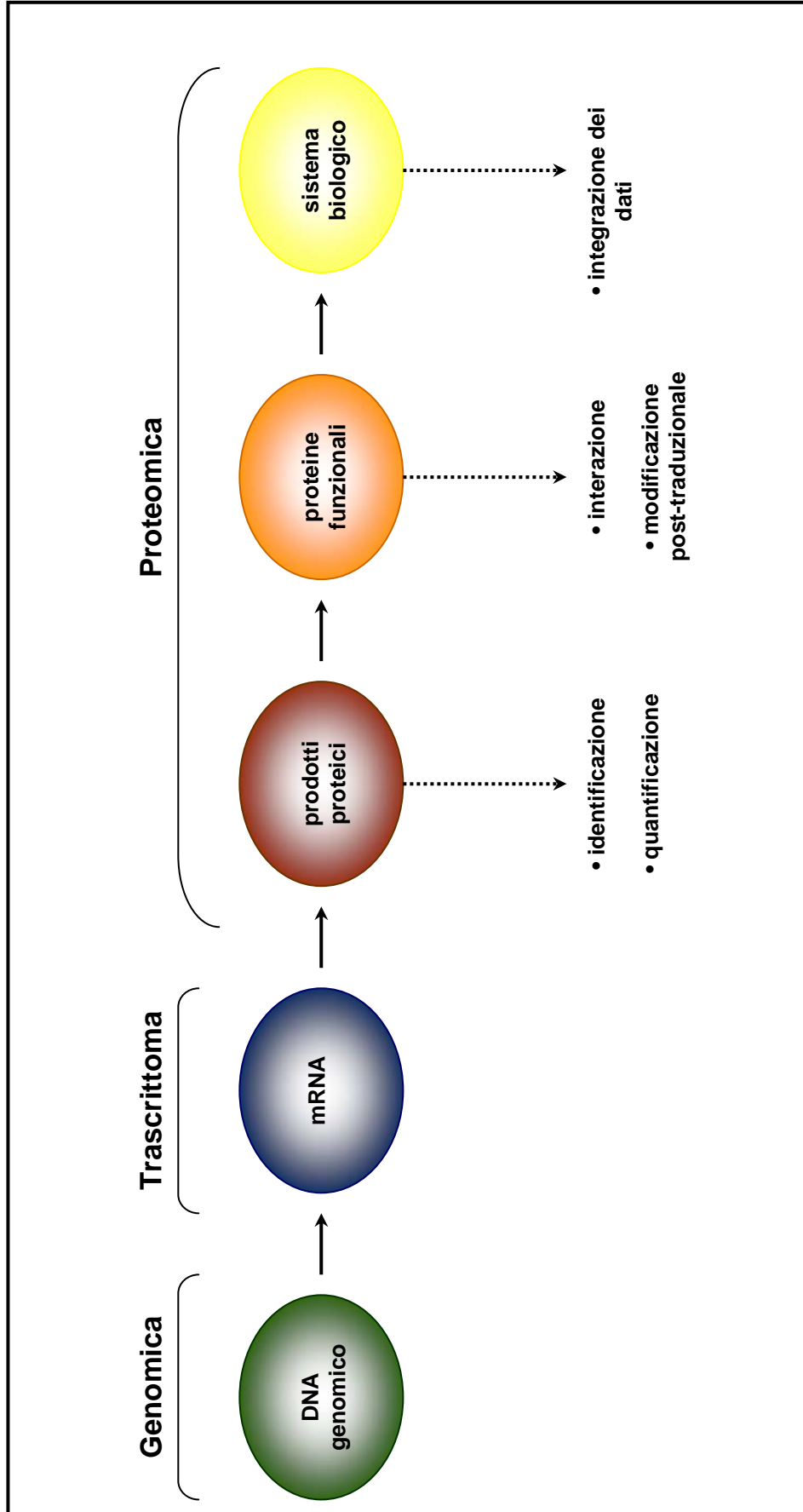
La proteomica è una parola recentemente conosciuta per descrivere lo studio dei complessi proteici che si formano nel tempo in un dato tipo cellulare e che ne causano la specificità d'azione. La straordinaria mole di informazioni che si è ottenuta grazie al sequenziamento del *genoma* umano costituisce una premessa imprescindibile per la conoscenza dei vari geni dell'organismo e delle loro eventuali alterazioni patologiche. Il sequenziamento del genoma umano ha aperto nuove frontiere alla ricerca medica, ma da solo non è sufficiente per descrivere compiutamente le caratteristiche biologiche e i processi molecolari che avvengono nell'organismo né permette di individuarne le ragioni, le cause e di conseguenza le terapie per le patologie umane. Il motivo dipende dal fatto che benché le funzioni degli organismi viventi dipendono dai loro geni, a livello molecolare i giochi si svolgono soprattutto a livello delle proteine. Infatti, conoscere la sequenza del DNA umano è indispensabile perché è da questa che le proteine sono prodotte, ma non basta in quanto la relazione tra i geni e le proteine non è né semplice né diretta. Spesso, del resto, la sequenza di una proteina non è scritta nel DNA in modo continuo e lineare, ma è spezzettata e distribuita in punti diversi e i polipeptidi che derivano da ciascun tratto possono entrare a far parte di proteine differenti assemblandosi variamente con altri polipeptidi. Frequentemente poi, le sequenze geniche sono sovrapposte e i filamenti di RNA messaggero che ne derivano possono essere tagliati in modo diverso dopo la trascrizione. Le proteine appena sintetizzate possono infine andare incontro a tutta una serie di modificazioni chimiche quali l'aggiunta di propaggini zuccherine o di code lipidiche, di gruppi elettricamente carichi o altamente reattivi che ne influenzano l'attività in modo critico. Se uno qualsiasi di questi passaggi non avviene come dovrebbe l'organismo ne riceve un danno, da cui ne consegue che le malattie che si manifestano come espressione diretta di una modificazione genetica sono in realtà molto poche rispetto all'universo di quelle possibili. Per poter capire come funzionano effettivamente le cose a livello cellulare si devono prendere in esame le proteine e non soltanto una o poche per volta come è stato fatto finora, ma tutte quelle presenti

in una cellula in un dato momento o perlomeno tutte quelle coinvolte nel fenomeno molecolare che si intende studiare. Questo insieme di proteine viene indicato con il termine di *proteoma* e la *proteomica* è la scienza che se ne occupa [1]. Si tratta di termini piuttosto giovani conati poco più di un decennio fa per dare un nome a un concetto che era chiaro da tempo a tutti i biologi ovvero che i fenomeni cellulari sono eventi complessi che possono essere compresi solo se si tiene conto di tutti i fenomeni coinvolti. La proteomica, quindi, nasce come scienza che mira ad indagare e stabilire l'identità, la quantità, la struttura e le funzioni biochimiche e cellulari di tutte le proteine in un organismo, organo od organello, descrivendo come queste proprietà varino nello spazio, nel tempo o in un determinato stato fisiologico (Fig 1.1). Se la proteomica si è poi fatta attendere dipende solo dal fatto che prima mancavano le tecniche analitiche adeguate per affrontare la complessità e soprattutto mancava quello straordinario punto di riferimento che è rappresentato dalla mappa del genoma umano. Diversamente dal genoma infatti che è lo stesso per tutte le cellule del nostro organismo, il proteoma cambia in continuazione [2]. Istante per istante in relazione al tipo di cellula considerata, alla sua specifica attività, alle sue necessità metaboliche, al suo stadio di sviluppo e alla sua età le proteine che la costituiscono sono diverse per qualità e quantità. Studiare il proteoma è quindi un'impresa piuttosto ardua perché si ha a che fare non solo con un numero imprecisato di elementi molti dei quali ignoti, ma anche con un sistema molecolare estremamente dinamico. Come se non bastasse, le diverse proteine possono essere presenti in concentrazioni molto differenti e quindi richiedere una calibrazione molto fine dei protocolli sperimentali in modo da consentire che tutte possano essere risolte ed evidenziate contemporaneamente. Per affrontare simili problematiche si è dovuto cambiare il metodo utilizzato per studiare le proteine sia in termini di approccio concettuale sia soprattutto dal punto di vista tecnologico. È così che negli ultimi dieci anni sempre più ricercatori in tutto il mondo sono passati dall'analisi di una o poche proteine per volta all'analisi di interi proteomi. Parallelamente sono stati sviluppati sistemi sempre più sensibili e sempre più adatti a gestire contemporaneamente un gran numero di elementi. Tra le nuove tecnologie maggiormente utilizzate in laboratorio, la spettrometria di massa, una tecnica nota ai chimici già da tempo, che oggi è stata opportunamente modificata per consentire

l'identificazione, la caratterizzazione e il parziale sequenziamento delle proteine [3]. Ad affiancarla e integrarla contribuiscono tecniche ormai consolidate quali l'elettroforesi su gel bidimensionale (2DE) [4, 5] e la cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) [6]. Avere poi banche dati di riferimento che contengano tutte le possibili sequenze geniche espresse è fondamentale per correlare ogni nuova proteina individuata al gene corrispondente ma servirebbe a poco se non si avessero a disposizione contemporaneamente strumenti bioinformatici ed algoritmi capaci di eseguire le ricerche, i confronti e le elaborazioni complesse in tempi rapidi [7]. Combinando sistemi di analisi proteica complessa e di bioinformatica è possibile stabilire quali proteine sono presenti nella cellula o in una sua parte in un determinato momento e quindi darne una prima caratterizzazione. Con le tecniche di proteomica quantitativa è possibile avere un'idea delle quantità relative delle diverse proteine di un singolo proteoma e confrontarle con quelle presenti nella stessa cellula in stadi cellulari diversi o dopo il trattamento con un particolare farmaco, oppure valutare le differenze tra i proteomi di cellule sane o malate. Benché non esista ancora una tecnologia ideale per gli studi di proteomica, con quelle disponibili si riesce già oggi ad ottenere un buon numero di risultati. Conoscere l'insieme delle proteine di una cellula è indispensabile quando ci si confronta con delle malattie sia dal punto di vista diagnostico, ovvero dalla capacità di riconosce con la maggiore rapidità ed efficienza possibile la presenza di una patologia, sia da quello terapeutico, per metter a punto approcci specifici ed effettivamente curativi.

### **1.1.2 Potenzialità della Proteomica**

Lo studio della proteomica, attraverso l'utilizzo delle tecniche elettroforetiche, cromatografiche e di spettrometria di massa, ha permesso nel corso del suo sviluppo di poter affrontare in maniera ottimale tre rilevanti tipi di problematiche biologiche:



**Figura 1.1** Dalla genomica alla proteomica. Integrazione delle informazioni dal genoma al proteoma per una comprensione migliore dei sistemi biologici.

- a. identificazione delle proteine,
- b. quantificazione ed analisi dei profili di espressione proteici,
- c. studio delle modifiche post-traduzionali (PTMs) a carico dei prodotti genici.

### **1.1.3 Proteomica d'espressione**

La proteomica d'espressione rappresenta l'analisi su larga scala dell'espressione genica condotta a livello proteico. La nascita di questo approccio di studio è il risultato dello sviluppo crescente delle tecnologie analitiche volte all'identificazione delle molecole proteiche preventivamente separate, del successo dei programmi di sequenziamento e del boom evolutivo che ha investito il settore della bioinformatica. Tradizionalmente, la proteomica d'espressione è caratterizzata da una procedura consecutiva che prevede due step principali: la separazione delle catene polipeptidiche mediante elettroforesi bidimensionali (2D E) o cromatografia liquida (HPLC, *high performance liquid chromatography*) e l'analisi delle stesse via spettrometria di massa. In questo scenario l'elettroforesi bidimensionale, nelle sue molteplici forme e applicazioni, è ad oggi sicuramente la tecnica di elezione per la risoluzione di miscele proteiche complesse, ma presenta diversi limiti che ne riducono l'utilizzo sostanzialmente a proteine solubili (vedi dopo).

La consapevolezza dell'esistenza di tali limitazioni ha spinto la ricerca, concernente le tecnologie applicate alla proteomica, a cercare di sviluppare delle metodiche alternative che non siano basate sull'applicazione dell'elettroforesi bidimensionale. I primi risultati promettenti si ebbero quando Hunt e collaboratori [8] dimostrarono la capacità della cromatografia liquida combinata con la spettrometria di massa (LC-MS/MS) di poter analizzare complesse miscele peptidiche attraverso un approccio che non prevedeva l'utilizzo di gel. Poco dopo, Yates ed i suoi colleghi [9] svilupparono una sistema di separazione multidimensionale in fase liquida interfacciato con uno spettrometro di massa definendolo con il nome di *Multidimensional Protein Identification Technology*, o MudPIT. Tale metodica, alla quale ci si riferisce anche con il termine di *shotgun proteomics* [10], mostra la capacità di rendere possibile la catalogazione di centinaia di migliaia di componenti generate da un singolo esperimento. Tutto questo è esemplificato dall'identificazione di 1.484 proteine di lievito, realizzata

utilizzando una strategia automatizzata in cui le proteine sono separate attraverso un sistema 2-D LC capillare (scambio ionico/fase inversa) accoppiato on line con uno sistema che permette di realizzare analisi di MS<sup>2</sup> [11].

Le performance di questo tipo di approccio sono di lunga superiorità a quelle che si possono ottenere utilizzando invece un tipo di approccio 2D E mediato; dalla letteratura si evince infatti che nel migliore dei casi si sono identificate 502 proteine appartenenti al batterio *Haemophilus influenzae* [12].

Un ulteriore approccio per lo studio del proteoma è stato sviluppato da Smith e collaboratori [13-17] i quali analizzarono un digerito proteolitico *in toto*, utilizzando un sistema di cromatografia capillare ad altissima risoluzione (ultra-high), in combinazione con uno spettrometro di massa a risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR-MS). L'uso delle apparecchiature FT-ICR permette di raggiungere un'accuratezza di massa di poche femtomoli. Tutto questo consente di identificare le proteine basandosi sulla massa di un singolo frammento proteolitico, evitando il bisogno di esperimenti di massa tandem che determinano un notevole aumento dei tempi di analisi. Un ben determinato frammento proteolitico può, in quest'ottica, essere considerato come un *biomarker* o come alternativamente si è soliti dire, un *mass-tag* che indica la presenza in un campione della sua proteina di origine. L'accoppiamento on-line di cromatografia liquida ad alta risoluzione con la spettrometria FT-ICR, potenzialmente, determina le desiderate alte prestazioni, sensibilità e range dinamico per un'identificazione su larga scala delle proteine. D'altro canto, occorre però considerare che seppure la *shotgun proteomics* ha notevoli vantaggi, presenta però il limite di non consentire il più delle volte la rivelazione e l'analisi di tutti i peptidi presenti nel campione preso in esame.

#### **1.1.4 Proteomica differenziale semiquantitativa**

L'analisi quantitativa e il confronto dell'espressione proteica tra un sistema biologico in condizioni normali ed uno in condizioni patologiche, o il monitoraggio delle stesse caratteristiche durante le diverse fasi di sviluppo del sistema stesso, rappresenta uno degli obiettivi principali perseguiti dall'indagine proteomica [18]. La metodica correntemente più usata per monitorare i cambiamenti di espressione

proteica è la 2-DE, attraverso la quale le catene polipeptidiche sono visualizzate e quantificate per mezzo delle procedure di colorazione [19]. Il *blue Coomassie* è stato di gran lunga il colorante maggiormente utilizzato a causa della semplicità d'uso e per la sua compatibilità con altre tecniche analitiche come il sequenziamento di Edman e la spettrometria di massa. Sfortunatamente, la sua relativa sensibilità (approssimativamente 1 µg) limita la sua applicazione per lo studio del proteoma. Le altre tecniche di colorazione a disposizione, con il più elevato grado di sensibilità, sono il *silver-staining* ed i coloranti fluorescenti i quali permettono di rilevare nanogrammi di proteine presenti nel gel. Ad ogni modo, il *silver-staining* presenta un ristretto range dinamico e proteine differenti mostrano diverse caratteristiche di colorazione compromettendo in questo modo l'accuratezza durante la quantificazione delle molecole proteiche. Diversa è la situazione quando si esaminano i coloranti fluorescenti come il *Sypro Ruby* ed il *Sypro Orange* che offrono invece ulteriori vantaggi. Il *Sypro Ruby* ha un ampio range dinamico (oltre i tre ordini di grandezza), permettendo una migliore quantificazione relativa delle catene polipeptidiche separate quando lo si confronta con il *silver-staining*. In aggiunta, si osserva una scarsa variabilità nella capacità di colorare le diverse proteine, dovuta al fatto che il *Sypro* interagisce con le molecole di SDS e non con la catena proteica.

Un approccio per una quantificazione differenziale è invece quello che prevede l'uso della *Difference Gel Electrophoresis* (DIGE) che utilizza la formazione di legami covalenti tra gli ε ammino-gruppi della lisina con differenti coloranti fluorescenti. Quando si esegue questa procedura, le proteine di due o tre popolazioni di campioni sono marcate differentemente con dei coloranti fluorescenti (succimidil esteri o diversi coloranti derivati dalla cianina Cy2, Cy3, Cy5). Questo, rende possibile utilizzare un solo gel per la separazione proteica e per la quantificazione delle differenze tra i campioni. Il grande vantaggio di tale tecnica è quello di minimizzare le variazioni degli spot da gel a gel [20, 21].

Poichè la quantificazione attraverso la 2 DE si basa sull'assunzione che in ciascuno spot sia presente una proteina, i fenomeni di comigrazione possono compromettere quest'analisi. Inoltre, occorre ricordare che una rappresentazione completa del proteoma è comunque impossibile. Quindi, seppur considerando

l'elevato grado di "maturità" della tecnica e le ineguagliate performance per la separazione di complessi pattern di proteine differenzialmente modificate e processate, e seppur la 2 DE sia in continua evoluzione, si è fatta sentire la necessità da parte della comunità scientifica internazionale di cercare delle metodiche alternative.

### **1.1.5 Modificoma: proteomica e studio delle modificazioni post-traduzionali (PTMsoica)**

La struttura primaria di una molecola proteica e conseguentemente la sua funzionalità possono essere alterate se le proteine sono soggette a delle modifiche post-traduzionali (PTMs). *In primis* un singolo gene può dare origine attraverso il processo di splicing alternativo a molteplici mRNA che sono tradotti in proteine simili ma ben distinte. La creazione del carattere individuale di una proteina prosegue durante il processo di sintesi, secrezione o localizzazione nel suo sito target specifico, tutti steps durante i quali la molecola può essere ulteriormente modificata. Alcune PTMs, come ad esempio la fosforilazione o la metilazione, possono essere transienti od avere una natura permanente, altre restano invece immutate una volta apportate come nel caso del processamento proteolitico o del processo ossidativo. Tra tutte le possibili modifiche che oggi si conoscono [22, 23], solo alcune sono state studiate in maniera sistematica [24]. La 2 DE si è ben adattata allo studio delle PTMs perchè permette di avere una visualizzazione delle modifiche e allo stesso tempo di ottenere una stima semiquantitativa dell'ammontare delle stesse.

Nei processi di mappatura su larga scala, esistono due modi per valutare le PTMs. Il primo metodo, può essere definito come "globale" e prevede la preventiva identificazione delle proteine in base ai peptidi non modificati, seguita dalla ricerca per tali molecole dei possibili peptidi modificati [25]. La seconda metodica, che invece si può indicare come "orientata", focalizza l'attenzione su uno specifico tipo di PTM che può essere a carico di tutte le proteine del campione in esame. Ciò che spesso complica l'analisi relativa alle PTMs è la bassa stechiometria, il basso fattore di risposta dei peptidi portanti la modificazione o la natura labile della stessa [26]. È per queste ragioni che le tecniche impiegate si basano per lo più su una selezione

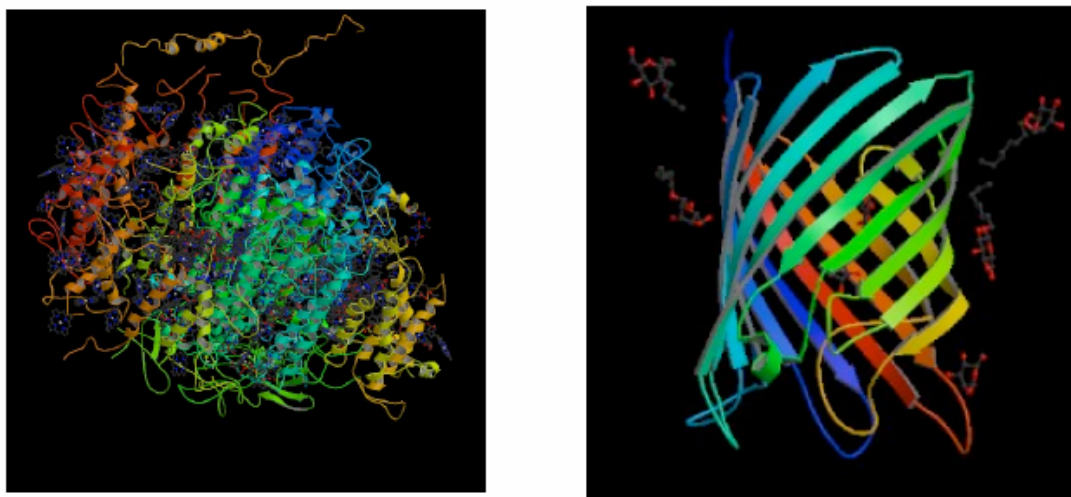
d'affinità per la modificazione di interesse. È anche possibile analizzare modificazioni a carico di proteine solo attraverso la spettrometria di massa tandem senza realizzare nessun processo di derivatizzazione o arricchimento. Questo approccio è basato sul fatto che diverse modificazioni danno origine a frammenti ionici marker dopo dissociazione indotta da collisione (*collision-induced dissociation* CID). I frammenti modificazione-specifici possono essere utilizzati per esperimenti selettivi come *neutral loss* o *precursor scanning*.

## SEZIONE 1.2: PROTEOMICA DELLE PROTEINE DI MEMBRANA

### 1.2.1 Le membrane biologiche e le proteine di membrana

Le membrane biologiche sono costituite da doppi strati di molecole lipidiche corredate da gruppi o teste polari. La parte idrofoba (comprendente molecole lipidiche quali fosfolipidi, colesterolo e glicolipidi) delle membrane biologiche ha uno spessore medio di 30 Å, lo strato polare ha invece uno spessore di 5-10 Å per lato. Il sistema membranoso di sistemi biologici come i mitocondri, i cloroplasti e la cellula rappresentano un'interfaccia tra l'ambiente esterno ed interno giocando un ruolo chiave nei processi di trasduzione, adesione, endocitosi, esocitosi, trasporto di ioni e molecole. Tutte queste attività biologiche vengono svolte da un elevato numero di proteine di membrana. Dal sequenziamento genomico si stima, infatti, che circa il 30% delle ORFs (*Open Reading Frame*) codifichino proteine transmembrana [27, 28]. Le proteine di membrana possono essere suddivise in due principali categorie strutturali: le proteine integrali e quelle periferiche. Alla prima classe appartengono quelle proteine che attraversano la membrana biologica una o più volte per mezzo di domini transmembrana (TDMs) che li ancorano saldamente alla struttura lipidica, alla seconda classe appartengono tutte quelle proteine che realizzano con il doppio strato lipidico delle associazioni covalenti o non ma non sono immerse nella membrana. Le proteine intrinseche di membrana sono molecole anfipatiche, con regioni idrofobiche e regioni idrofiliche esposte a solventi acquosi su ciascun lato della membrana. La natura idrofoba del doppio strato lipidico limita la natura dei TDMs a segmenti peptidici costituiti prevalentemente da amminoacidi con catene laterali idrofobiche (alti valori d'idropatia). La natura comunque polare del legame peptidico contribuisce però in modo energeticamente sfavorevole all'alloggiamento delle proteine nel doppio strato lipidico, costringendo le stesse ad organizzarsi in strutture secondarie altamente ordinate, quali le  $\alpha$ -eliche e i foglietti  $\beta$ . Tali strutture secondarie sono stabilizzate da una vasta rete di legami idrogeno che contribuiscono alla stabilità della proteina e permettono l'esistenza di gruppi polari all'interno della membrana biologica. Le alfa eliche sono l'elemento di struttura secondaria più comune nelle

membrane biologiche, ricorrendo tipicamente con TDMs di 15-25 amminoacidi che attraversano il doppio strato lipidico. Anche dei foglietti beta ricorrono nelle proteine di membrana, solitamente come foglietti antiparalleli con brevi turni polari. Tutte le strutture a foglietto beta ricorrenti formano dei barili chiusi con il primo e l'ultimo filamento impegnati in legami idrogeno l'uno con l'altro (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Rappresentazione di due proteine di membrana. a) Struttura del supercomplesso PSI delle piante superiori (file PDB 2o01). b) Porina batterica (file PDB 2IWW).

Esternamente al barile beta si ritrovano residui a carattere idrofobico, internamente a carattere idrofilico. Non sono state finora rivelate proteine integrali di membrana contenenti elementi di struttura secondaria misti. Proteine integrali di membrana possono essere riconosciute mediante analisi di sequenza attraverso software basati su motivi strutturali noti (disponibili su [www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Il riconoscimento di motivi ad alfa elica è più facile rispetto a motivi a foglietto beta che sono codificati da un minor numero di residui. Alla seconda classe strutturale di proteine plasmatiche appartengono quelle che, in una varietà di modi, stabiliscono associazioni con la membrana, ma non sono incluse nella stessa. Le principali modalità di interazioni principali sono: modifiche post-traduzionali (poliisoprenilazione, acilazione, glicosilazione) che mediano ancoraggio alla membrana, alla componente lipidica o ai fosfatidilinositoli, o associazioni non covalenti con altre proteine di membrana.

### 1.2.2 L'importanza delle proteine di membrana.

La struttura lipidica delle membrane plasmatiche rappresenta l'organizzazione di base delle membrane biologiche servendo principalmente da barriera al passaggio delle molecole solubili. Sono le proteine di membrana a svolgere tutte le funzioni specifiche delle membrane, conferendo caratteristiche proprietà funzionali. L'abbondanza delle proteine all'interno delle membrane biologiche è variabile tra i diversi tipi cellulari. Le principali funzioni delle proteine di membrana sono:

- a. funzioni di trasporto di molecole o ioni tra ambiente cellulare e ambiente esterno;
- b. funzioni recettoriali: le proteine di membrana riconoscono segnali chimici provenienti dall'ambiente cellulare o direttamente da altre cellule partecipando attivamente a fenomeni di induzione, comunicazione e trasduzione del segnale;
- c. funzioni di ancoraggio: le proteine possono funzionare come siti di attacco per altre molecole;
- d. funzioni di filtro: le proteine di membrana riescono a riconoscere e a discriminare le diverse sostanze con cui la cellula entra in contatto funzionando insieme al fluido lipidico come un buon sistema di filtro;
- e. funzioni energetiche: i sistemi di produzione dell'ATP si compiono all'interno di organelli (mitocondri e cloroplasti) che convertono l'energia mediante sistemi complessi di proteine di membrana comprendenti molecole trasportatrici.

Quindi, sebbene il numero relativamente limitato di proteine di membrana codificate dai genomi rispetto alle proteine solubili, (valori prossimi al 20%-30%) esse sono molto importanti per lo sviluppo ed il mantenimento della vita degli organismi. A causa della loro centralità nella vita cellulare le proteine di membrana giocano un ruolo importante nell'azione farmacologia rappresentando circa il 70% dei target farmaceutici. Si capisce quindi come un loro studio sia di indubbio valore. In tale contesto la proteomica si inserisce come un valido strumento, che permette non solo una inequivocabile identificazione delle proteine analizzate, ma garantisce anche uno studio agevole dei supercomplessi nei quali spesso queste sono organizzate in seno alle diverse membrane. Le proteine di membrana formano infatti con i lipidi dei complessi proteina-lipidi che in alcuni casi mostrano un livello di complessità superiore mediante l'assemblaggio di complessi proteici

multisubunità. Molte proteine di membrana esercitano le loro funzioni in forma di complessi multimerici attraverso interazioni più o meno stabili, come esempio, le proteine dei fotosistemi nelle piante superiori. È noto, infatti, che tutti i complessi fotosintetici (fotosistemi I e II, citocromo  $b_6/f$  e l'ATP sintasi) sono funzionalmente collegati da un flusso di elettroni che permette a tali sistemi di lavorare in sinergia per un'efficiente fotosintesi. Le membrane tilacoidali dei cianobatteri e dei cloroplasti delle piante superiori e delle alghe verdi contengono, infatti, complessi multimerici che realizzano la fotosintesi clorofilliana. Essi sono costituiti di un elevato numero di proteine idrofobiche. In questo lavoro di tesi la membrana tilacoidale delle piante superiori verrà presa come modello per la separazione in forma nativa e per l'identificazione delle proteine di membrana dei complessi multimerici considerando la familiarità e l'esperienza maturata dal laboratorio dove è stato svolto questo lavoro.

### **1.2.3 Problematiche connesse all'analisi elettroforetica di proteine di membrana integrali**

L'analisi delle proteine e in modo particolare dei complessi proteici di membrana rappresenta una delle sfide più importanti nel campo dei metodi separativi e d'analisi. Nelle membrane proteine e lipidi sono a stretto contatto e ciò influenza non poco le caratteristiche chimico-fisiche della componente proteica. Inoltre subunità proteiche diverse possono interagire, anche con l'ausilio di uno o più cofattori, nella formazione di complessi multiproteici. La piattaforma funzionale di tali complessi rimane comunque la membrana la quale, come per le loro subunità, ne condizionerà inevitabilmente struttura e funzioni. Le proteine di membrana sono, infatti, difficili da separare, identificare e quindi sottorappresentate nei sistemi d'analisi. Va da sé che l'analisi delle proteine, ed in modo particolare dei complessi proteici di membrana, rappresenta una delle sfide più importanti nel campo dei metodi separativi e d'analisi. Le difficoltà nella separazione dei complessi proteici di membrana sono per lo più imputabili al fatto che:

- a. sono proteine altamente idrofobe che hanno uno o più domini transmembrana che le rendono sostanzialmente insolubili in qualsiasi tampone a base acquosa privo di un opportuno detergente;
- b. nelle loro forme funzionali molti complessi proteici comprendono diverse subunità polipeptidiche;
- c. la loro bassa abbondanza biologica richiede spesso l'uso di metodi di arricchimento;
- d. alcune proteine di membrana contengono molti cofattori e inevitabilmente lipidi;
- e. molte proteine integrali di membrana si associano a proteine periferiche funzionalmente importanti, ma che si staccano facilmente durante i processi di isolamento [29].

Una tecnica di analisi vincente deve essere quindi scelta considerando tutti i fattori elencati congiuntamente agli obiettivi preposti. Fortunatamente negli ultimi anni è stata sviluppata tutta una serie di tecniche elettroforetiche che permettono di abbattere in maniera più o meno complementare gli ostacoli che si incontrano durante l'analisi di proteine altamente idrofobiche. L'impiego di tecniche elettroforetiche bidimensionali è largamente utilizzato in proteomica a causa dell'alta risoluzione offerta dal sistema ma difficilmente riscontrabile per proteine idrofobiche di membrana. Bisogna comunque sottolineare che il successo di un'analisi proteomica di questo tipo, molto dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del campione in esame, dalla eterogeneità dello stesso, dalla disponibilità strumentale e dall'esperienza dell'operatore. Per quest'ultimo punto, il parametro più critico sembra essere proprio la riproducibilità delle analisi, che nel caso delle proteine di membrana risulta essere il più delle volte molto bassa. I metodi di separazione delle proteine rientrano in due categorie: metodi preparativi ed analitici, dove i primi differiscono dai secondi per la richiesta di mantenimento dei complessi proteici in forma intatta. Come osserveremo, il mantenimento della corretta struttura ha ovvie implicazioni e vantaggi nella biochimica clinica, prospettando il disegno di nuovi farmaci a partire dalla struttura. Allo stesso modo la separazione analitica riveste importanza nella biochimica clinica, permettendo l'identificazione, l'analisi e lo studio dei linkage funzionali tra le diverse proteine.

### 1.2.4 Sistemi elettroforetici comuni nell'analisi di proteine di membrana

Il primo importante step comune a tutte le tipologie di analisi elettroforetica di proteine di membrana, è l'estrazione dei sistemi proteici dal doppio strato fosfolipidico membranale. La scelta del detergente e del rapporto di solubilizzazione detergente/proteina (g/g), rappresentano un punto critico, specialmente se si lavora su complessi multiproteici in forma nativa. Infatti una bassa concentrazione di detergente potrebbe risultare inefficace nello sfaldamento membranale, mentre alte concentrazioni potrebbero indurre una degradazione dei complessi multiproteici nelle loro sub-unità costituenti. L'azione del detergente non si limita poi solo al processo di delipidazione, infatti esso attraverso la formazione di strutture micellari rende le proteine (o i complessi multiproteici) solubili nel tampone di estrazione a base acquosa. Buoni detergenti possono quindi permettere il mantenimento delle organizzazioni multimeriche lasciando alcuni lipidi in contatto con i complessi. Per i complessi proteici tilacoidali, in modo particolare per il PSII, sono stati utilizzati con successo oltre al Triton X-100 e al  $\beta$ -DM anche l'*n* eptil- $\beta$ -d-glucoside (HTG) e l'*n*-octil- $\beta$ -d-glucoside (OG). Va comunque tenuto in considerazione non solo il tipo di detergente ma anche la concentrazione dello stesso con valori dell'1%-2% durante la solubilizzazione, abbassata a valori dello 0.03% fino all'1% dopo la solubilizzazione [29]. Molti studi riportano comunque che tra i detergenti non ionici e zwitterionici il migliore per la solubilizzazione delle proteine di membrana e la loro visualizzazione in elettroforesi bidimensionale risulta essere il  $\beta$ -DM.

I sistemi elettroforetici su gel di poliacrilammide adottati per l'analisi di proteine membranali sono sostanzialmente 4 :

- a. separazione elettroforetica monodimensionale (1D) sulla base della massa molecolare apparente (1D SDS-PAGE , *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*),
- b. separazione elettroforetica bidimensionale (2D) sulla base del punto isoelettrico in prima dimensione e della massa molecolare apparente in seconda dimensione (2D IEF-SDS-PAGE, *isoelectrofocusing -sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*),

- c. separazione elettroforetica bidimensionale (2D) sulla base della massa molecolare apparente sia in prima che in seconda dimensione (2D d-SDS-PAGE, *double-sodiododecilsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*),
- d. separazione elettroforetica bidimensionale (2D) sulla base della massa molecolare apparente nativa in prima dimensione e della massa molecolare apparente denaturata in seconda dimensione (2D BN-SDS-PAGE, *blue native sodiododecilsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

L'analisi elettroforetica monodimensionale è, tra tutte, la tecnica più datata e in un certo senso, se non fosse per la sua scarsa capacità risolutiva, anche la più efficace. Il sistema di analisi più comunemente adottato è quello che si basa sul protocollo proposto da Laemmli [30]. Nell'analisi delle proteine di membrana i suoi grandi vantaggi risiedono nella versatilità, nella semplicità di esecuzione e nella grande riproducibilità dei risultati. Il suo più grande svantaggio, che poi è quello che ne limita l'utilizzo, è come già detto la scarsa capacità risolutiva. Tale sistema elettroforetico discrimina tutte le specie proteiche presenti in un estratto cellulare solo sulla base del loro peso molecolare (o meglio della loro massa molecolare apparente). Da ciò deriva l'uso dell'aggettivo monodimensionale, ad indicare che il criterio utilizzato nella risoluzione delle proteine è unico. Ne consegue che la scelta di una opportuna concentrazione di acrilammide sarà il parametro che più di tutti influenzerà la risoluzione finale. L' SDS-PAGE, come preannuncia il suo nome, sfrutta quello che forse può essere definito come il detergente per eccellenza; appunto il sodio dodecilsolfato. Questo tensioattivo è una molecola anfipatica costituita da una lunga coda idrofobica di 12 atomi di carbonio legata covalentemente ad un gruppo solfato molto più idrofilico. L' SDS è sicuramente il surfatante anionico più utilizzato dato che è quello che in assoluto permette sia in termini quantitativi che qualitativi la migliore solubilizzazione di specie proteiche idrofobiche, basiche e ad alto peso molecolare. Come tutti i tensioattivi, a livello membranale esso agisce inducendo lo sfaldamento del doppio strato fosfolipidico, per poi indurre la formazione di micelle che rendono le proteine idrofobiche solubili nell'ambiente acquoso. Essendo comunque le micelle cariche negativamente in tal modo viene a generarsi anche un *charge shift* tale da conferire a tutte le proteine la stessa carica negativa per unità di massa. Spesso il protocollo di casting di un gel

SDS-PAGE per l'analisi di proteine idrofobiche prevede l'aggiunta di un agente caotropico come l'urea in concentrazioni comprese tra 2 e 6 M. L'urea è infatti grado di contrastare le interazioni deboli che possono nascere tra le diverse specie proteiche durante la corsa elettroforetica, migliorando così di molto la capacità risolutiva del gel. Nonostante il "potere" dell' SDS, l' SDS-PAGE è una tecnica che ad oggi non trova più un grande applicazione, se non come seconda dimensione per tecniche bidimensionali. Questo perché a causa della sua ridotta capacità risolutiva, induce la comigrazione di più specie proteiche nella stessa banda di un gel. Tutto ciò riduce notevolmente la possibilità di identificare, mediante spettrometria di massa, le proteine isolate.

La nascita delle tecniche elettroforetiche bidimensionali ha in parte risolto il grande limite della scarsa capacità risolutiva. Quando si parla di elettroforesi bidimensionale, inevitabilmente si parla di proteomica e spesso di 2D IEF-SDS-PAGE. Nel caso delle proteine di membrana però la 2D IEF-SDS-PAGE non è sicuramente la tecnica di elezione e tecniche come la 2D BN-SDS-PAGE e la d-SDS-PAGE offrono sicuramente dei risultati migliori [31]. Tutte le tecniche elettroforetiche bidimensionali sono così dette, perché permettono di separare le proteine utilizzando due parametri ortogonali. Nel caso della 2D IEF-SDS-PAGE, in prima dimensione, la separazione avviene in base alla carica della molecola attraverso un processo di isoelettrofocalizzazione (Isoelettrofocusing, IEF), per cui i prodotti genici sono distinti grazie alle differenze dei punti isoelettrici (pIs) che li caratterizzano. La seconda dimensione si realizza, come già detto, grazie all'ausilio di un gel di poliacrilammide in presenza di sodiododecilsolfato e garantisce che le proteine siano invece risolte in base alla differenza di peso molecolare. Il risultato finale della tecnica è quella che in gergo viene chiamata "mappa 2D", dove le varie bande di un gel di poliacrilamide monodimensionale sono ora sostituite da delle macchie (più comunemente *spots*), la posizione di ognuna delle quali è definita, come in un diagramma cartesiano, da 2 coordinate: il punto isoelettrico (l'ascissa) e il peso molecolare (l'ordinata). La 2D E possiede molteplici caratteristiche e proprietà che hanno reso difficile la ricerca di una valida alternativa che possa sostituirla negli studi volti alla mappatura del proteoma. A tutt'oggi, non esiste un'altra tecnica che possa fornire informazioni ricche e dettagliate su una

particolare proteina in esame in termini di quantità relativa, PTMs, pI, peso molecolare e solubilità. Nonostante l'efficienza di separazione, fino a 10.000 spot proteici utilizzando gradienti immobilizzati di pH in un range ristretto (IPGs) [5], la 2D E ha le sue limitazioni, particolarmente marcate nel caso dell'analisi di proteine ad alto e basso peso molecolare, basiche e idrofobiche. Queste restrizioni sono legate all'elevata diversità chimica delle molecole proteiche e soprattutto al fatto che in IEF possono essere utilizzati solo detergenti non ionici o zwitterionici. Da ciò ne consegue che la proteomica che si avvale della 2D IEF-SDS-PAGE è in qualche modo prevenuta contro l'identificazione di particolari specie proteiche. Molecole scarsamente solubili in un tampone a base acquosa possono infatti sfuggire ad una rivelazione 2D E per diversi motivi tecnici: per un mancato passaggio in soluzione durante il processo di preparazione del campione, per un mancato ingresso nel gel di isoelettrofocusing o ancora per una precipitazione nel gel di prima dimensione quando si concentrano nel punto di focalizzazione [32, 33]. Nella fattispecie anche se i detergenti non ionici riescono a rendere solubili le proteine dopo la prima dimensione, queste rimangono intrappolate nella matrice di focalizzazione e non passano nel gel di seconda dimensione. Il risultato sarà quello di un mappa bidimensionale orfana delle proteine più idrofobiche precipitate appunto nel gel di prima dimensione. Dallo studio della letteratura si deduce che il limite massimo di idrofobicità per proteine di membrana risolte con 2D IEF-SDS-PAGE è circa 0.3 GRAVY (grand average of hydropathicity) [32].

I limiti della isoelettrofocalizzazione possono essere colmati almeno in parte da tecniche elettroforetiche bidimensionali che sfruttano, sia in prima che in seconda dimensione, la massa molecolare apparente delle proteine, il tutto a discapito di una minore capacità risolutiva e di un'impossibilità di separazione delle isoforme. I sistemi elettroforetici più utilizzati in tal senso sono la 2D d-SDS-PAGE e la 2D BN-PAGE. Nel primo caso si tratta di un sistema elettroforetico bidimensionale in cui i polipeptidi vengono separati sia in prima che in seconda dimensione con una SDS-PAGE [34]. La diversa composizione dei gels di prima e seconda dimensione, per concentrazione di agenti caotropici, per concentrazione di acrilamide, per tipo di ioni di trasporto impiegati (glicina o tricina) permette di ottenere un mappa bidimensionale in cui tutti gli spots andranno a disporsi (con una

certa dispersione) lungo la diagonale del gel. Questa metodica utilizza come detergente l'SDS, ed è quindi in grado di estrarre anche le proteine di membrana più idrofobiche. In un sistema del genere è sfruttata l'evidenza secondo la quale, a parità di massa molecolare, le proteine più idrofobiche migrano più velocemente di quelle più idrofiliche. Nonostante vi sia un indubbio incremento della capacità risolutiva rispetto alla SDS-PAGE monodimensionale, le mappe che si ottengono da una 2D d-SDS-PAGE di norma presentano un numero inferiore di spots rispetto ad una 2D classica IEF-SDS-PAGE o rispetto ad un 2D BN-SDS-PAGE anche se magari gli spots presenti possono essere (soprattutto rispetto alla IEF-SDS-PAGE) di natura ben diversa.

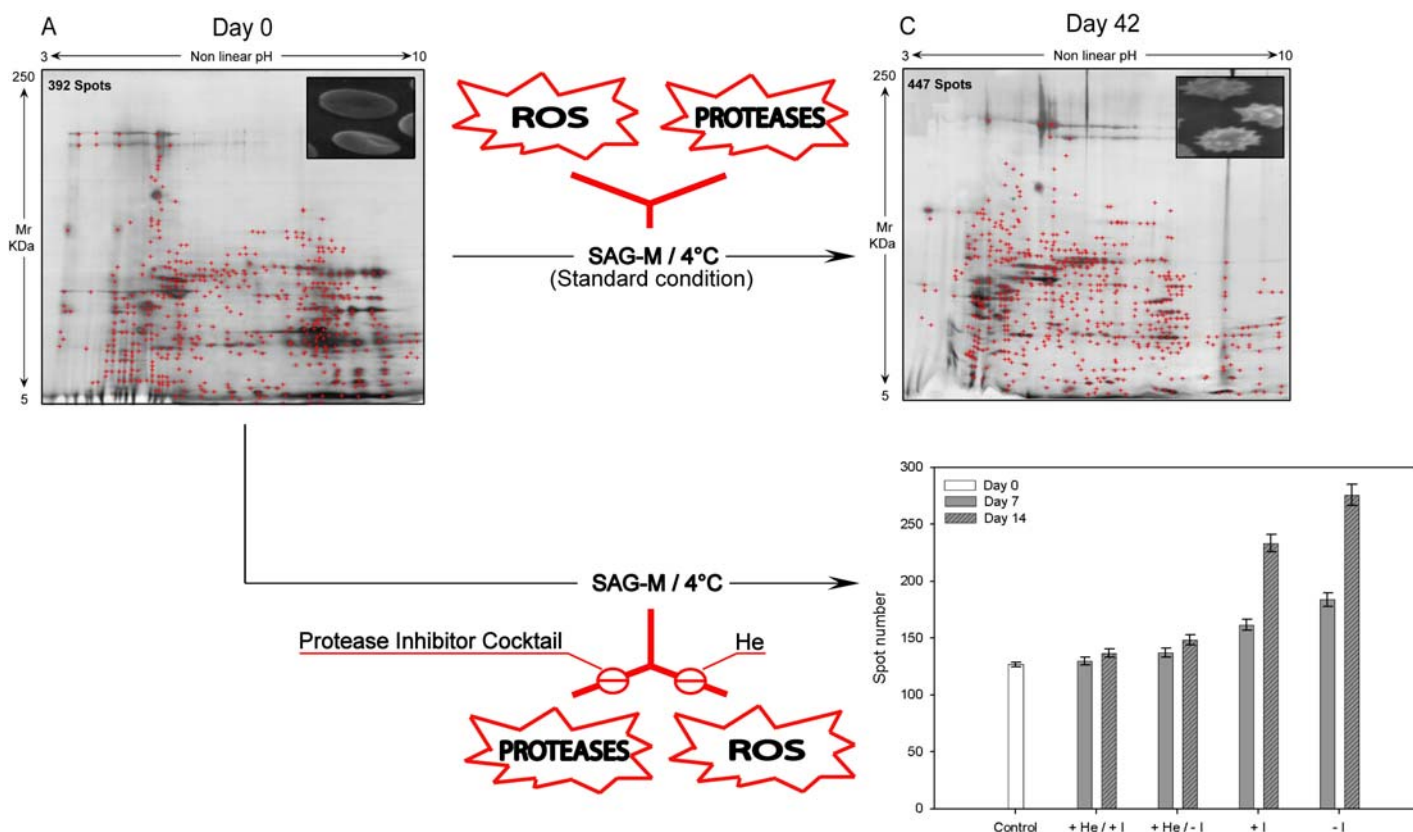
Di una capacità risolutiva intermedia è invece il sistema messo a punto nel 1991 da Schagger *et al.* vale a dire il 2D BN-SDS-PAGE [34]. Questa eccellente metodica in prima dimensione è in grado di risolvere dei complessi multiproteici in accordo alla loro massa molecolare apparente e alla loro forma nativa. Il sistema riesce a separare i complessi con una risoluzione migliore della gel filtrazione e del gradiente di saccarosio. Tutto ciò è possibile grazie all'uso combinato di un detergente non ionico (es. digitonina o l' n-dodecil- $\beta$ -D-maltoside che ha la doppia azione di sfaldare la membrana e rendere solubili i complessi multiproteici) e del Coomassie G250, un colorante cationico che, in analogia a quanto fatto dall'SDS in una SDS-PAGE, conferisce a tutti i complessi una carica negativa netta. Il risultato è una elettroforesi monodimensionale in cui ad ogni banda corrisponde un complesso multiproteico. Dopo un opportuno processo di denaturazione, l'applicazione di una *strip* di BN-PAGE monodimensionale al top di un gel di seconda dimensione SDS-PAGE, produce una mappa 2D in cui sono risolte tutte le subunità di ciascun complesso multiproteico isolato nella prima dimensione (anche le più idrofobiche). Il risultato è una elettroforesi bidimensionale che in prima dimensione sfrutta la massa molecolare apparente dei complessi multiproteici, mentre in seconda dimensione la massa delle subunità costituenti gli stessi. Tali prerogative fanno sì che il BN sia il metodo di elezione per l'analisi elettroforetica bidimensionale di proteine di membrana. Il sistema è stato applicato per la prima volta sulle proteine della catena respiratoria della membrana mitocondriale, ma poi il suo utilizzo si è rapidamente diffuso allo studio di molti altri sistemi membranali.

Il grande limite di una 2 DE basata su BN resta comunque l'impossibilità di risolvere le diverse isoforme di una specie proteica.

Come sottolineato tutte le tecniche presentate hanno, delle mancanze più o meno accentuate in termini di risoluzione elettroforetica e/o di solubilizzazione del campione. Questo fa sì che la complementarità e la sinergia delle 4 tecniche è l'unico mezzo valido nell'analisi elettroforetica di proteomi idrofobici.

CAPITOLO 2

VALUTAZIONE PROTEOMICA DELLE CAUSE RESPONSABILI DELLA  
DEGRADAZIONE DELLE PROTEINE DELLA MEMBRANA ERITROCITARIA  
DURANTE LO STOCCAGGIO DEL SANGUE AD USO TRASFUSIONALE



## SCOPO DEL LAVORO

La proteomica, rappresenta lo studio sistematico delle molteplici e differenti proprietà delle proteine, utilizzando una varietà di approcci che sinergicamente hanno lo scopo di permettere una descrizione dettagliata della struttura, della funzione e dei meccanismi di controllo dei sistemi biologici. Il progredire delle metodiche scientifiche e delle tecnologie nelle ultime decadi, ha catalizzato un'estensione degli scopi connessi agli studi in campo biologico spostando l'attenzione dalle riduttive analisi biochimiche a carico delle singole proteine, ad un esame attento ed approfondito esteso all'intero proteoma. La proteomica, nasce come naturale evoluzione della chimica delle proteine che rappresentava uno dei capisaldi nello studio della biologia durante gli anni ottanta. La proteomica ed altre metodologie di indagine complementari (genomica, microarray, metabolomica), costituiscono i componenti essenziali di una nuova ed emergente tipologia di studio che viene oggi indicata con il termine *systems biology*. In quest'ottica, la *systems biology* si interessa di studiare un determinato sistema biologico attraverso delle analisi sistematiche e quantitative di tutte le componenti che concorrono alla definizione dello stesso sistema preso in esame. Questo approccio mira alla descrizione estensiva di un sistema biologico attraverso l'integrazione di dati di tipo differente.

I globuli rossi possono essere conservati, in condizioni standard, per un periodo limitato durante il quale vanno incontro ad una serie di cambiamenti biochimici e chimicofisici, che possono influire sull'efficacia trasfusionale e determinare eventuali complicazioni legate ad essa. Quando gli eritrociti conservati sono trasfusi ad un ricevente alcuni di essi rimangono in circolo, con una emivita mediamente normale, mentre altri sono rimossi dal circolo entro poche ore. Questo è dovuto a ciò che in letteratura viene comunemente indicato con il termine di *storage lesions* di cui, ad oggi, si sa ancora molto poco. Nel processo di invecchiamento e di conseguente lisi degli eritrociti lo stress ossidativo e la degradazione proteolitica sembrano giocare un ruolo di primo piano. Sembra infatti che, nelle condizioni di stoccaggio, l'eritrocita non è in grado di contrastare l'aumentata produzione di radicali liberi i quali, a loro volta, sono liberi di indurre

uno stress ossidativo su lipidi e proteine del globulo rosso. Questo processo porta all'attivazione di enzimi proteolitici ed a una più generica frammentazione proteica che generano, in ultima analisi, dei danni irreversibili a carico delle proteine del citoscheletro. Tutto ciò si traduce in modificazioni morfologiche con variazioni importanti a carico della permeabilità, dell'antigenicità e delle proprietà reologiche dell'eritrocita generando così un invecchiamento precoce delle emazie che le rende inadeguate per la terapia trasfusionale.

In questo lavoro di tesi, applicando un approccio proteomico differenziale, si valuterà il tipo e l'entità dei danni subiti dalle proteine del membrano scheletro delle emazie, durante i tempi di conservazione. Sino ad oggi nessuno studio ha infatti indagato gli effetti delle *storage lesions* sulle proteine della membrana eritrocitaria sfruttando metodiche proteomiche. Nel far ciò saranno sfruttate delle tecniche di nuova generazione [61,62] per l'isolamento, il frazionamento e la caratterizzazione strutturale proteica che permetteranno di valutare le modificazioni ossidative post-traduzionali subite dalle proteine. Questo tipo di approccio darà la possibilità di ottenere una panoramica generale dei cambiamenti subiti dal proteoma membranale.

Con il fine ultimo di dimostrare la compartecipazione di fenomeni di stress ossidativi e di degradazione proteolitica, si confronteranno estratti proteici ottenuti da eritrociti "freschi" (controllo, 0 giorni di stoccaggio), con quelli ottenuti da eritrociti "senescenti" (dopo 7, 14 e 42 giorni di stoccaggio) preservati a 4°C in preparati per trasfusione convenzionali (saline-adenine-glucose-mannitol, SAG-M) con la sola aggiunta di elio (He) e/o inibitori di proteasi. Il gorgogliamento dell'elio nelle sacche di stoccaggio verrà realizzato allo scopo di creare un'atmosfera nella quale non si possano generare specie reattive dell'ossigeno. L'aggiunta di inibitori di proteasi, in presenza o in assenza di elio, sarà invece praticata per inibire tutti gli enzimi, sia intracellulari che extracellulari, coinvolti nella degradazione proteolitica delle specie proteiche. Le proteine estratte dai diversi campioni saranno poi risolte attraverso un'elettroforesi bidimensionale (2 DE) del tipo IEF-SDS-PAGE, nella quale in prima dimensione i polipeptidi verranno discriminati sulla base del loro punto isoelettrico (IEF) ed in seconda dimensione sulla base della loro massa molecolare apparente (SDS-PAGE). L'obiettivo dell'analisi elettroforetica

bidimensionale sarà quello di ottenere delle mappe elettroforetiche bidimensionali di ogni campione, mappe che altro non sono che un'istantanea del proteoma di membrana della cellula eritrocitaria. Dalla comparazione, per mezzo di appositi softwares, delle diverse mappe ottenute, si individueranno gli spots differenziali che saranno successivamente analizzati con l'ausilio della spettrometria di massa (MS). Utilizzando i dati ottenuti con la MS/MS sarà possibile interpellare delle apposite banche dati (MASCOT), grazie alle quali saremo in grado di associare gli spots a delle specie proteiche ben precise; non solo, ma dalla comparazione tra la massa molecolare apparente, ottenuta dalla mappa 2 D, e il peso molecolare teorico, calcolato sulla base della sequenza amminoacidica della proteina identificata, sarà poi possibile capire se lo spot in questione è un frammento del polipeptide identificato o l'intera proteina. Questo ultimo criterio sarà quello che ci permetterà di valutare l'entità dei processi degradativi nelle diverse condizioni sperimentali di stoccaggio da noi generate. In sostanza, comparando il numero totale delle spots ottenute dalle mappe elettroforetiche bidimensionali dei diversi campioni, saremo in grado di concludere se lo stress ossidativo da radicali liberi induce una degradazione maggiore di quello dovuta all'attacco proteolitico o viceversa.

## **SEZIONE 2.1: INTRODUZIONE:**

### **2.1.1 Il sangue e i suoi componenti.**

Il sangue è un tessuto dalla composizione molto complessa, in rapporto con le innumerevoli funzioni da esso svolte. È un liquido corpuscolato di colore rosso, più o meno scuro a seconda del grado di ossigenazione, e con particolari caratteristiche chimico-fisiche ad esso conferite dalle molte sostanze che vi sono contenute. Il sangue rappresenta il 6-8% del peso corporeo totale ed è costituito da un insieme di cellule sospese in un liquido chiamato plasma. Le cellule del sangue possono essere suddivise in tre classi principali: i globuli rossi (eritrociti), i globuli bianchi (leucociti) e le piastrine (trombociti). Normalmente di 100 parti in volume di sangue intero, 45 sono rappresentate dalla parte corpuscolare, 55 dal plasma; è questo il cosiddetto rapporto plasma/globuli o valore ematocrito. Il sangue, circolando nell'organismo, svolge un'importante funzione di trasporto; il plasma contiene circa il 90% di acqua e il 10% di sostanze solide, di cui l'85% è rappresentato da proteine e il rimanente da sostanze inorganiche e altre sostanze azotate. I globuli rossi rimangono sempre all'interno del sistema circolatorio e contengono l'emoglobina, la molecola che trasporta l'ossigeno. I globuli bianchi sono responsabili delle difese dell'organismo e sono trasportati dal sangue ai vari tessuti dove svolgono le loro funzioni. Le piastrine hanno il compito di impedire la perdita di sangue conseguente a emorragia ed esercitano il loro effetto principale a livello delle pareti dei vasi. Le proteine plasmatiche fungono da trasportatori, permettendo a nutrienti e prodotti del metabolismo intermedio di raggiungere gli organi di deposito e di escrezione [35].

### **2.1.2 L'eritrocita**

I globuli rossi (detti anche emazie o eritrociti) sono nell'uomo, cellule anucleate, rotondeggianti e dalla forma di disco biconcavo. Il numero e le caratteristiche morfologiche degli eritrociti variano nelle diverse specie animali. Nella specie umana si rivelano i seguenti valori: 5.000.000/mmc nell'uomo, 4.500.000 nella donna; un diametro globulare medio di 7 micron; uno spessore

globulare medio di 2 micron alla periferia e di 1 micron al centro, e un volume globulare medio di 90 micron cubici.

Essi sono costituiti da una massa spugnosa di citoplasma differenziato e incolore, detto stroma (fase solida), limitata alla superficie da una membrana plasmatica, e contengono nel loro interno una soluzione molto concentrata di emoglobina. Sono dotati di grande elasticità la quale consente loro di allungarsi o di deformarsi variamente, allorché debbano passare dentro dei capillari che abbiano un calibro inferiore al loro diametro. Infine, sono dotati di grande resistenza verso tutti quei fattori chimico-fisici e/o biologici capaci di determinare alterazioni irreversibili della membrana eritrocitaria tali da provocarne la rottura. Tale proprietà, che è della membrana eritrocitaria, dicesi resistenza globulare. Il fenomeno che consegue alla rottura della membrana cellulare consiste nella separazione dell'emoglobina dallo stroma con conseguente dissoluzione nel plasma e prende il nome di emolisi.

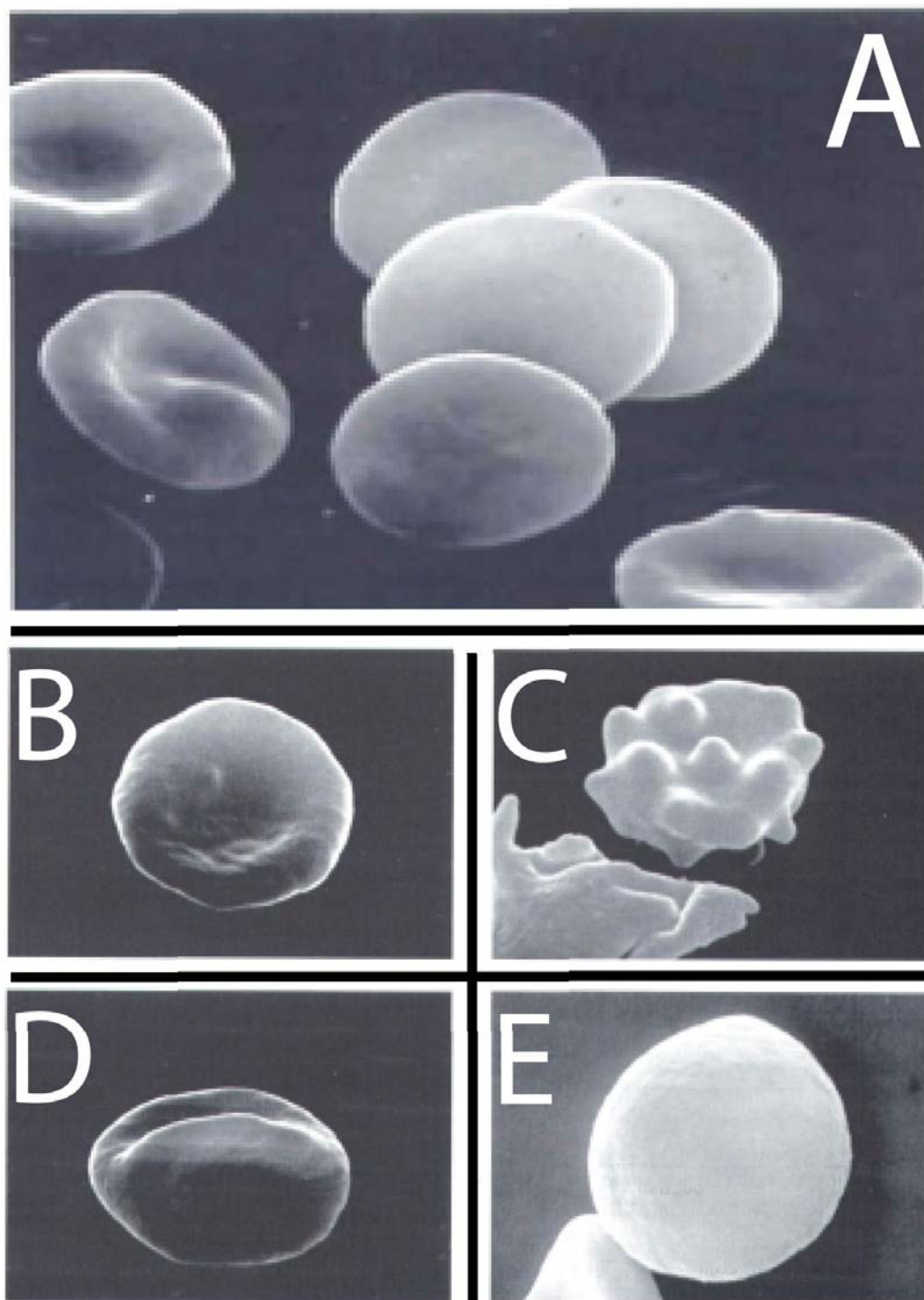
Le funzioni fondamentali degli eritrociti sono tre:

- a. trasporto dell'ossigeno,
- b. intervento nel trasporto della anidride carbonica,
- c. intervento nella regolazione dell'equilibrio acido-base del sangue.

Il trasporto dell'ossigeno è legato alla presenza nell'eritrocita dell'emoglobina, una cromoproteina coniugata formata da una parte proteica (la globina) e da un gruppo prostetico contenente Fe, (il ferroproteome). La possibilità dell'emoglobina di legare labilmente l'ossigeno dipende proprio dalla presenza dell'atomo di ferro posto al centro dell'anello tetrapirrolico dell'eme. Il fine del processo di maturazione eritroide è quello di formare una cellula in grado di mantenere in sospensione concentrazioni elevate di emoglobina in uno stato funzionalmente attivo e di adattarsi alle situazioni di stress meccanico e chimico incontrate nel microcircolo periferico. I principali parametri quantitativi eritrocitari nell'adulto normale sono rappresentati dalla massa eritrocitaria, dal numero di eritrociti (RBC), dall'ematocrito (Hct) e dalla concentrazione di emoglobina (Hb). In condizioni non patologiche un globulo rosso umano resta in circolo circa 120 giorni dei quali 10 all'interno dello stesso midollo osseo e i rimanenti all'interno dell'apparato cardiocircolatorio. La loro distruzione (eritrocitocateresi) avviene ad

opera degli elementi reticolo-istiocitari, particolarmente di quelli localizzati nella milza, nel fegato e nello stesso midollo osseo.

In rapporto ad alterazioni del processo di maturazione o a condizioni patologiche che alterano la struttura di alcune componenti degli eritrociti, questi possono presentare strutture incluse più o meno grossolane che hanno origini diverse. In determinate condizioni gli eritrociti di un soggetto possono avere diverse dimensioni e diverso grado di emoglobinnizzazione: questa condizione si definisce come anisocitosi. Qualora le emazie mostrino all'esame dello striscio forme variabili, spesso bizzarre, si parla di polichilocitosi. L'attuale possibilità di valutare le modificazioni morfologiche degli eritrociti grazie alla microscopia elettronica a scansione (SEM) ha consentito di effettuare un'analisi accurata dei numerosi aspetti assunti dai globuli rossi in condizioni sia normali che patologiche (Fig. 2.1). In realtà le capacità assai ampie di cui è dotata la membrana di modificare la foggia degli eritrociti, per effetto di fenomeni di perdita parziale della struttura e di riarrangiamenti successivi, ha mostrato come i globuli rossi in condizioni fisiologiche normali (discociti) possano andare incontro a due modificazioni distinte e reversibili: la forma cosiddetta "echinocitica" o spiculata e quella "stomatocitica" (a forma di coppa o di scodella). Questi due aspetti sono largamente dipendenti dal pH del microambiente (alcalino per gli echinociti, acido per la forma stomatocitica) e da altri fattori quali la deplezione di ATP, la presenza di ioni calcio e l'esposizione ad alcune sostanze chimiche. La reversibilità di queste modificazioni dell'aspetto dei globuli rossi è condizionata dal persistere delle noxae le quali, se troppo prolungate, possono, attraverso ulteriori deformazioni degli eritrociti (forma sferoechinocitica e sferostomatocitica), condurre a una condizione morfologica irreversibile dell'eritrocito corrispondente allo sferocito. Gli sferociti, in qualità di elementi scarsamente deformabili, male si adattano alla sinuosità della rete circolatoria e vengono facilmente intrappolati in siti di rimozione, quali la milza, ove la loro distruzione si effettua ad opera dei macrofagi. Parallelamente a queste deformazioni morfologiche degli eritrociti, è nota tutta una serie di alterazioni della loro conformazione, che riflette particolari condizioni patologiche [36].



**Figura 2.1** Eritrociti di sangue periferico visti al microscopio elettronico a scansione (SEM): A, eritrociti normali; B, discocito; C, echinocito; D, stomatocito; E, sferocito.

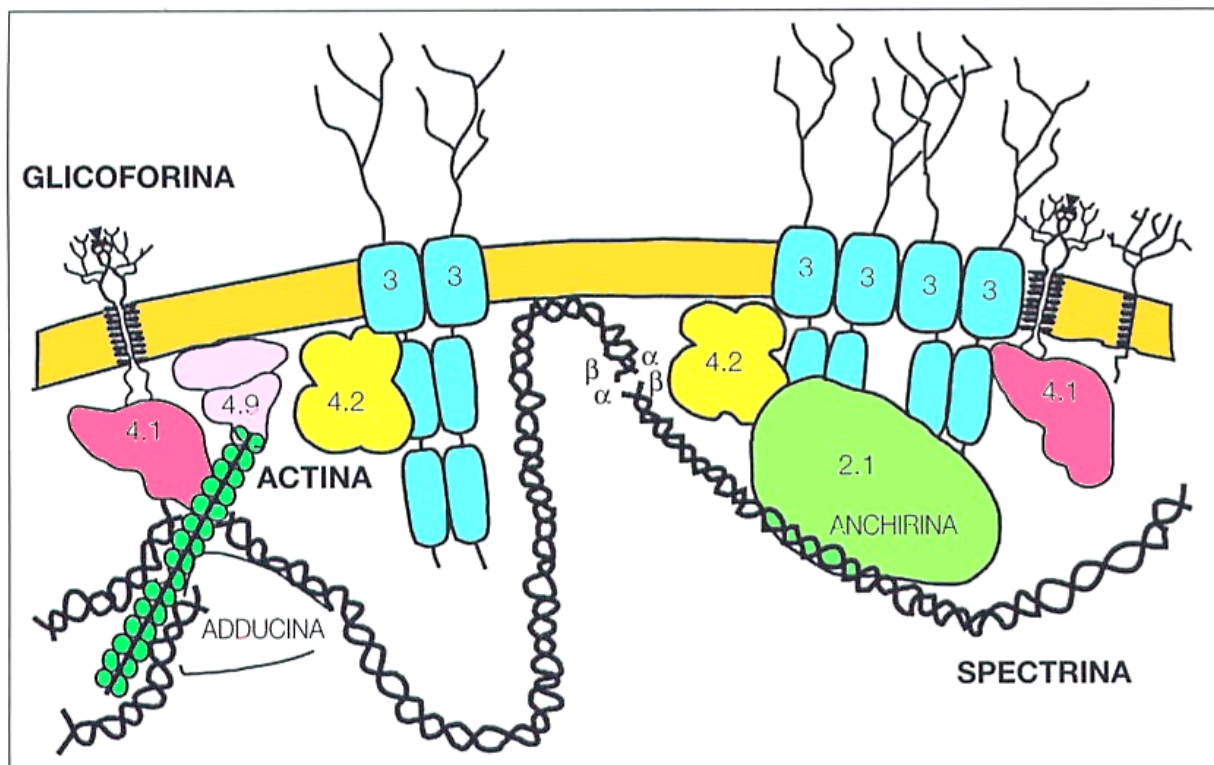
### 2.1.3 La membrana eritrocitaria

Si conosce molto di più la membrana plasmatica degli eritrociti umani di qualsiasi altra membrana eucariotica. I motivi sono svariati: per prima cosa i globuli rossi sono disponibili in grande quantità e sono relativamente poco contaminati da altri tipi di cellule. Inoltre poiché non hanno un nucleo o organelli interni, la membrana plasmatica è la loro sola membrana e la si può isolare facilmente senza contaminazioni da parte di altre membrane interne.

La membrana eritrocitaria (Fig. 2.2) [37] è formata da un doppio strato continuo di lipidi, soprattutto fosfolipidi e colesterolo, e da uno scheletro di supporto, costituito da proteine integrali e periferiche. La struttura lipoproteica è una impalcatura deputata sostanzialmente al mantenimento dell'integrità strutturale dell'intera cellula eritrocitaria. La superficie esterna è relativamente ricca di fosfatidilcolina, sfingomieline e glicolipidi, mentre la superficie interna contiene soprattutto fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, e fosfatidilinositolo. Tutti questi fosfoglicolipidi sono presenti in quantità equimolari con il colesterolo. L'analisi elettroforetica monodimensionale in SDS-PAGE rivela approssimativamente 15 bande principali tra i 250.000 e i 15.000 Da. Tre di queste proteine (*spettrina*, *glicoforina* e *banda 3*) costituiscono, da sole, più del 60% in peso delle proteine totali di membrana. Oltre a *spettrina*, *glicoforina* e *banda 3* altre proteine essenziali nella costituzione del citoscheletro di membrana sono: *anchirina*, *adducina* ( $\alpha$  e  $\beta$ ), *banda 4.1*, *dematina* ( $\alpha$  e  $\beta$ ), *p55*,  $\beta$ -actina, *tropomodulina*, *gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GPDH)*, *stomatina*, *tropomiosina* e *glicoforina (A, B, C, D, E)*.

La maggior parte delle proteine associate alla membrana sono di tipo periferico, rivolte verso il lato citoplasmatico della cellula eritrocitaria. La più abbondante di queste è senz'altro la *spettrina*, che costituisce da sola circa il 25% della massa proteica membranale, risultando così la componente principale del citoscheletro proteico. La *spettrina* può essere di due specie l' $\alpha$  e la  $\beta$ , entrambe molto flessibili e di forma bastoncellare (lunghe circa 100 nm) e differenti solo per peso molecolare (la  $\beta$  è leggermente più corta). L'unità strutturale di base del citoscheletro sono dei tetrameri di *spettrina* lunghi 200 nm. Ogni tetramero è costituito da due eterodimeri che interagiscono spontaneamente con dei legami di tipo testa-testa. A loro volta gli eterodimeri sono costituiti da una catena di  $\alpha$  ed

una di  $\beta$  spettrina, attorcigliate antiparallelamente in modo non stretto e flessibile. La “testa” terminale degli eterodimeri è sempre fosforilata. Le estremità di coda di 4 o 5 tetrameri sono congiunte mediante un complesso giunzionale composto da brevi filamenti di actina (13 monomeri di actina), tropomiosina (che determina probabilmente la lunghezza dei filamenti di actina), banda 4.1 e adducina. Il legame della spettina alla membrana plasmatica, è mediato da una grossa proteina intracellulare chiamata anchirina, che si lega alle subunità  $\beta$  della spettina e al dominio citoplasmatico della proteina trans-membrana a trasporto anionico banda 3



**Figura 2.2** Citoscheletro basato sulla spettina sul lato citoplasmatico della membrana dei globuli rossi umani. Legenda: 2.1, anchirina; 3, banda 3; 4.1, banda 4.1; 4.9, banda 4.9. la disposizione proposta è stata adottata soprattutto da studi di interazione delle proteine purificate *in vitro*.

(costituita da 14 domini transmembrana a doppia elica) in maniera contemporanea. Così facendo l'anchirina connette la banda 3 alla spettina, congiungendo il citoscheletro alla membrana e riducendo contemporaneamente la diffusione della banda 3 nel doppio strato fosfolipidico. Il citoscheletro è unito alla membrana anche da un secondo meccanismo, basato sulla mediazione giunzionale esercitata dalla banda 4.1 tra spettina (o actina) e banda 3 o glicoforina (l'altra proteina

transmembrana principale degli eritrociti) [38]. Il risultato finale è un network deformabile ed elastico localizzato al disotto della superficie membranale dell'eritrocita. Proprio questa struttura, basata per gran parte sulla spettrina, consente al globulo rosso di sopportare le sollecitazioni causate dai vortici della corrente ematica e quelle causate dal passaggio attraverso i capillari più stretti. Individui con anomalie genetiche della spettrina sono anemici e hanno globuli rossi sferici e molto fragili: la gravità dell'anemia aumenta con il grado di carenza della spettrina. La membrana si oppone inoltre ad un ingresso incontrollato di ioni sodio, che sono presenti a concentrazioni elevate nel plasma, e alla fuoriuscita di ioni potassio, che sono invece presenti in alte concentrazioni all'interno delle cellule. Nella membrana è presente la Na/K-ATPasi che trasporta attivamente ioni sodio verso l'esterno e ioni potassio verso l'interno del globulo rosso. Questa attività di trasporto dipende in maniera critica da un'adeguata disponibilità di energia e quindi da un continuo rifornimento di glucosio, metabolismo dal quale il globulo rosso ricava tutta la sua energia in quanto privo di organuli. L'integrità funzionale della membrana richiede quindi un continuo rifornimento energetico sotto forma di ATP. Una difettosa fosforilazione della spettrina è associata a perdita dell'integrità di membrana e a diminuzione della deformabilità: si pensa che questo sia il difetto presente in alcune forme di sferocitosi ereditaria. La perdita di frammenti di membrana cellulare, in conseguenza dell'instabilità del doppio strato lipidico, porta alla formazione di sferociti. Un aumento del calcio intraeritrocitario è responsabile inoltre di una maggiore rigidità di membrana, in questo caso gli sferociti non riescono a superare i piccoli pori dei sinusoidi della milza e sono sequestrati prematuramente. L'ambiente metabolicamente inospitale della milza determina, attraverso il cosiddetto condizionamento splenico, un'ulteriore perdita di frammenti della membrana, il che accentua l'acquisizione della forma sferica da parte degli eritrociti [39].

#### **2.1.4 Il percorso del sangue donato**

In Italia la normativa vigente permette di effettuare donazione di sangue intero, di plasma o di piastrine (queste ultime tramite la metodica dell'aferesi). Ciò

che si ottiene da queste procedure sono: il sangue intero, il plasma da aferesi e le piastrine da aferesi che seguiranno poi strade diverse per utilizzi diversi.

L'unità di sangue intero prelevata viene trasferita nel settore frazionamento/produzione emocomponenti ed in breve tempo lavorata e scomposta negli emocomponenti definiti di primo livello. Il Servizio Trasfusionale utilizza per questa produzione metodiche di tipo "meccanico". Viene effettuata innanzitutto una centrifugazione della sacca di sangue intero tramite l'ausilio di centrifughe di grosse dimensioni. Questo permette che i vari emocomponenti (emazie, plasma, piastrine e globuli bianchi) per gravità (legata al peso di ognuna di queste componenti) si sedimentino in tre strati sovrapposti all'interno della sacca di raccolta. A questo punto utilizzando delle macchine automatiche con sensori ottici si ottiene, mediante un'azione meccanica di spremitura, il passaggio delle varie componenti del sangue dalla sacca di partenza alle sacche satelliti collegate. L'introduzione, ormai da molti anni, delle sacche in plastica ha permesso, partendo da una unità singola, la produzione di diversi emocomponenti consentendo l'effettuazione di una terapia più mirata nei confronti del malato e rispondendo con una sola donazione alle necessità trasfusionali di più pazienti. Gli emocomponenti che si ottengono da tale procedimento sono: emazie concentrate deleucocitate, plasma da scomposizione e buffy-coat ricco in piastrine. Le emazie concentrate deleucocitate (cioè i globuli rossi ottenuti dalla donazione e privati della gran parte dei globuli bianchi) vengono utilizzati nella terapia delle anemie per poter aumentare il trasporto dell'ossigeno. Hanno una durata di 42 giorni grazie alle soluzioni conservanti che vengono aggiunte durante la preparazione e che sono presenti nella sacca satellite. La conservazione deve avvenire a 4 gradi in apposite frigoemoteche termocontrollate automaticamente. Il plasma da scomposizione viene immediatamente immagazzinato in congelatori speciali che abbassano velocemente la temperatura consentendo il congelamento in tempi brevissimi. Il congelamento è indispensabile per mantenere efficaci i fattori della coagulazione presenti nel plasma. La durata di conservazione è teoricamente illimitata anche se viene considerata di un anno. L'indicazione alla trasfusione di plasma è quella di aumentare il livello dei fattori della coagulazione in pazienti con dimostrata carenza degli stessi. I buffy-coat hanno necessità di una ulteriore lavorazione prima

di essere utilizzati. La quantità di piastrine raccolta in un unico buffy-coat (e quindi da un'unica donazione) infatti non è sufficiente per avere un risultato terapeutico; occorre riunire almeno otto unità singole da buffy-coat per avere un preparato che abbia efficacia nella terapia. I buffy-coat singoli o già riuniti in un concentrato di piastrine (definito pool di piastrine) si conservano in una apposita apparecchiatura che mantiene gli emocomponenti a 22 gradi costanti ed in continua agitazione. La durata di questi emocomponenti è di soli 5 giorni. Si trasfondono piastrine per correggere o prevenire emorragie associate a carenza numerica o funzionale delle piastrine.

Mediante l'ausilio di una speciale apparecchiatura (il separatore cellulare) si raccolgono le unità di plasma da aferesi e di piastrine da aferesi. Con questa metodica se le indicazioni ed i modi di conservazione sono identici rispetto agli analoghi plasma da scomposizione e buffy-coat/piastrine, è evidente che diverse sono le quantità raccolte e, soprattutto nel caso della piastrinoafèresi. Questo vuol dire che in caso di terapia il paziente ha un'esposizione alle caratteristiche di un solo donatore e non di otto, aumentando l'efficacia terapeutica in generale e diminuendo uno dei rischi della trasfusione e cioè l'immunizzazione. Bisogna ricordare infatti che la trasfusione ha le caratteristiche di un trapianto e quindi mette a contatto dell'organismo del paziente componenti che sono, per quanto testati e scelti, diversi dai propri.

Finora abbiamo parlato degli emocomponenti che vengono definiti di primo livello. Di questi solo il plasma e la plasmaferesi non necessitano di ulteriori lavorazioni, almeno presso il Servizio Trasfusionale. Va ricordato infatti che gran parte del plasma viene inviato all'industria convenzionata che, tramite lavorazioni più sofisticate estrae dal plasma gli emoderivati (albumina, fattori della coagulazione concentrati, immunoglobuline) che vengono poi restituiti all'Azienda Ospedaliera per le terapie e gli usi necessari ai vari Reparti. Spesso gli altri emocomponenti (emazie, piastrine, piastrinoafèresi) necessitano invece di ulteriori lavorazioni: la filtrazione, l'irradiazione, il lavaggio. Queste procedure si rendono necessarie quando la trasfusione di emocomponenti standard ha causato effetti indesiderati (reazioni trasfusionali, febbrili, allergiche, ecc.) o per prevenire alcune complicanze della trasfusione (infezioni da citomegalovirus, immunizzazione

leucocitaria, ecc.). Si producono così, con una o più lavorazioni associate, gli emocomponenti di secondo livello. Mentre nel settore di produzione degli emocomponenti viene effettuata la preparazione degli stessi con inizio immediato dopo il prelievo al fine di lavorare su unità freschissime e mantenerne così al meglio le caratteristiche, nel settore sierologia si effettuano tutte le indagini necessarie per validare le unità. Per validazione si intende la valutazione di tutti quei parametri necessari (anche per legge) per considerare una donazione trasfondibile. Si intende pertanto la normalità di alcuni parametri (esame emocromocitometrico e transaminasi) e la negatività per la presenza di virus trasmissibili con il sangue (HIV1/2, HCV, HBV ecc.). Nell'attesa di questi risultati tutte le unità preparate vengono immagazzinate secondo le caratteristiche prima descritte in apposite emoteche di quarantena. Solo successivamente alla validazione (ed eliminazione delle unità non risultate idonee) le unità vengono trasferite nelle emoteche di attesa (assegnazione) a disposizione delle necessità trasfusionali dei pazienti.

### **2.1.5 Il problema dello stoccaggio del sangue**

Le emazie concentrate e depleucitate possono essere conservate, in condizioni standard per un periodo massimo di 42 giorni [40], durante i quali subiscono una serie di cambiamenti biochimici, chimico-fisici e metabolici che possono influire sull'efficacia trasfusionale comportando eventuali complicazioni legate ad essa [41]. Tali disagi sono accompagnati da un peggioramento delle proprietà reologiche del sangue, dovuto in gran parte ad una progressiva riduzione della plasticità eritrocitaria, e sono una conseguenza diretta di ciò che nella letteratura scientifica è conosciuto con il termine di *storage lesions*.

Durante il periodo di stoccaggio in risposta a tali fenomeni la morfologia dell'eritrocita degenera in modo progressivo ed irreversibile [42, 43]. L'eritrocita passa dalla classica forma discocita biconcava ad una sferoidale (sferocita) per poi assumerne una a cellula "spigata" (echinocita). Con il tempo poi le "spighe" si distaccano per esocitosi generando così delle microvescicole ricche di lipidi e di emoglobina (Hb). Alla base di questo processo è stata dimostrata la progressiva perdita di flessibilità da parte della membrana plasmatica. Una volta che gli

eritrociti sono trasfusi ad un ricevente, alcuni di essi rimangono in circolo con una emivita mediamente normale mentre altri sono rimossi entro poche ore, questo perché la perdita di elasticità risulta reversibile solo parzialmente, e ciò riduce la capacità della cellula di passare attraverso il letto microcircolatorio. Ne consegue una riduzione del flusso ematico microvascolare con un'ipossia locale, e in pazienti con complicazioni cardio-circolatorie, gravi disordini emoreologici accompagnati da danni a livello di vari organi [44, 45].

Lo sviluppo di soluzioni preservanti o di modalità di stoccaggio in grado di bloccare e/o ridurre l'entità di tali fenomeni, sembra essere la soluzione più consona a tale problematica. Molti studi hanno testato l'aggiunta nelle soluzioni di mantenimento di opportuni additivi (adenina, glucosio, mannitolo) con le finalità di allungare i tempi di conservazione, aumentare il recupero delle cellule conservate e migliorarne la funzione. Sono state così proposte delle soluzioni di stoccaggio che, in base ai parametri di funzionalità eritrocitaria generalmente considerati (ATP, 2,3 DPG, potassio, indice di deviazione morfologica e la valutazione della percentuale di emolisi), potrebbero prolungare i tempi di conservazione anche fino a 12 settimane [46]. Comunque un protocollo ideale in grado di preservare efficacemente le emazie contrastando tutti i fenomeni degenerativi ancora non è stato proposto, e questo perché non si ha ancora una corretta e profonda conoscenza di tutti i processi compartecipanti nel fenomeno delle storage lesions.

Molti studiosi sono oggi concordi nell'affermare che l'eziologia delle lesioni della membrana eritrocitaria sia multifattoriale. Tra i diversi fattori quelli che sembrano contribuire maggiormente alla degradazione funzionale delle proteine della membrana eritrocitaria, sono due:

- a. l'attacco da parte di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) [47, 48],
- b. l'attacco da parte di enzimi ad attività proteolitica.

Nel processo di invecchiamento e di lisi degli eritrociti (tanto in vivo quanto *in vitro*) lo stress ossidativo svolge un ruolo fondamentale. Essendo esposto continuamente ad ossigeno, ricco di lipidi poliinsaturi e di ferro (un potente catalizzatore per le reazioni dei ROS attraverso la reazione di Fenton) [49], il globulo rosso si trova continuamente a contatto con radicali intra ed extracellulari

[50], dai quali è in grado di proteggersi grazie ad una complessa architettura di membrana e alla presenza di sostanze scavenger (glutazione, GSH) e di sistemi enzimatici (glutazione perossidasi, GSH-PX). In vitro, però durante il periodo dello stoccaggio, l'eritrocita è sostanzialmente impossibilitato alla rigenerazione delle difese antiossidanti, e ciò fa sì che esso non sia più in grado di contrastare la produzione di radicali liberi, che inesorabilmente aumenta nel tempo. Questo innesca una reazione a catena irreversibile che accelera l'invecchiamento del globulo rosso con variazioni importanti a carico della permeabilità, dell'antigenicità e delle sue proprietà reologiche [51, 52]. A sostegno di quanto detto, nel 2000 Dumaswala e collaboratori dimostrarono che l'aggiunta di GSH ridotto alle soluzioni preservanti, riduceva nel tempo l'entità del danno ossidativo [53]. Il bersaglio principale degli insulti ossidativi rimane comunque l'emoglobina che una volta ossidata si lega irreversibilmente alle proteine della membrana determinando gravi alterazioni nell'organizzazione del membrano-scheletro. Oltre alle interazioni tra emoglobina ossidata e proteine del citoscheletro [54, 55], gli aspetti più importanti della denaturazione ossidativa della membrana sono la formazione di emicromi irreversibili legati alla proteina banda 3 [56] e la perossidazione dei lipidi di membrana con riorganizzazione dei fosfolipidi. Tali eventi si associano a modificazioni morfologiche, ad una diminuzione di deformabilità dell'eritrocita con un accumulo di marcatori associati alla membrana per il riconoscimento e la rimozione dal circolo. Wolfe et al. hanno dimostrato un crescente danno ossidativo a carico della spettina [57], mentre altri autori hanno riportato un incremento tempo-dipendente del *clustering* proteico e delle forme carbonilate della proteina 4.1 [52]. Tali studi, in linea con molti altri, non solo dimostrano l'esistenza dello stress ossidativo delle proteine del citoscheletro membranale, ma soprattutto indicano come tale processo sia irreversibile e controllato da una cinetica esponenziale.

Un altro contributo significativo al processo di invecchiamento e lisi eritrocitaria, è dato da enzimi proteolitici di origine intracellulare e/o extra cellulare, che con la loro azione destabilizzano il network proteico alla base del citoscheletro membranale. Studi recenti hanno infatti dimostrato che la spettina e il dominio citoplasmatico N-terminale della banda 3 (CDB3) sono substrati della proteasi

apoptotica caspasi 3 [58], mentre la proteina 4.1 e l'anchirina sembrano essere attaccate più facilmente dalla calpaina I [59]. Sempre su questa linea è stato dimostrato che enzimi di origine leucocitaria come l'elastasi sono in grado di incrementare l'emolisi dei globuli rossi durante lo stoccaggio [60].

## SEZIONE 2.2: MATERIALI E METODI

### 2.2.1. Campionamento

Per i miei studi è stato utilizzato sangue umano prelevato da 10 donatori volontari consenzienti. Nessuno dei donatori scelti (5 donne e 5 uomini di età compresa tra i 18 e i 50 anni) ha sofferto in passato di diabete, ipertensione o qualsiasi altra patologia che possa alterare le proprietà reologiche del sangue. Tutto il sangue dei 10 donatori è stato mescolato in un'unica sacca ottenendo un volume totale di 800 mL. Con il fine di considerare nei processi di degradazione proteica anche il contributo dei leucociti, il sangue non è stato sottoposto ad alcun processo di riduzione del numero delle cellule bianche prima dello stoccaggio (leucofiltrazione). Dopo una centrifugata leggera (300 x g) realizzata su frazioni da 50 ml, tutto il plasma stratificato al di sopra delle cellule rosse è stato aspirato ed eliminato producendo dei concentrati di globuli rossi. Successivamente il concentrato di emazia è stato frazionato in 25 aliquote da 30 ml riposte in sacche di PVC (polyvinyl chloride, Baxter Healthcare) da 150 ml e diluito con la soluzione di stoccaggio SAG-M (0.9% p/v glucosio monoidrato, 0.0215% p/v adenina cloridrato, 0.525% p/v mannitolo, 0.877% p/v NaCl), sino ad un valore di ematocrito pari a 0.50. Le 25 sacche sono state così conservate in condizioni standard a 4°C [40] per un periodo massimo di 42 giorni. Per le analisi sono state prelevate dalle sacche delle aliquote dopo 0, 7, 14 e 42 giorni di stoccaggio.

Per valutare l'entità della degradazione proteolitica, in 10 delle 25 sacche è stato aggiunto un cocktail di inibitori di proteasi (1% v/v, Sigma-Aldrich) specifico per cellule di mammifero contenente: AEBSF, Aprotinina, Cloruro di Bestatina, Pepstatina A, Leupeptina emiosolfato, E-64-[N-(trans-epossisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamide]. Per studiare gli effetti di degradazione proteica dovuti all'azione dei ROS (reactive oxygene species) in 10 sacche è stata invece generata un'atmosfera inerte utilizzando elio. Il gas è stato fatto gorgogliare delicatamente a 4 °C sotto leggera agitazione nella soluzione eritrociti / SAG-M per 2 h. Il processo è stato ripetuto 4 volte e comunque il grado di ossigenazione dell'emoglobina è stato misurato spettrofotometricamente. Tutto il sistema è stato poi sigillato per evitare il contatto con l'O<sub>2</sub> atmosferico.

L'analisi proteomica di un processo *random*, come lo è il processo di frammentazione proteica dovuto all'attività congiunta di ROS e proteasi, ha richiesto l'elaborazione di mappe 2D (IEF-SDS-PAGE) medie, con le quali è stato possibile valutare la deviazione standard dei diversi esperimenti. Si è deciso quindi di considerare delle repliche biologiche dei diversi esperimenti tralasciando le repliche tecniche. Per ogni esperimento sono state fatte 5 repliche ognuna realizzata in una sacca differente. In tutto sono stati considerati 5 esperimenti:

- a. esperimento controllo: eritrociti in SAG-M,
- b. esperimento + He / + I: eritrociti in SAG-M con aggiunta del cocktail di inibitori di proteasi e mantenuti in un'atmosfera inerte da elio,
- c. esperimento + He / - I: eritrociti in SAG-M mantenuti in un'atmosfera inerte da elio,
- d. esperimento + I: eritrociti in SAG-M con aggiunta del cocktail di inibitori di proteasi,
- e. esperimento - I: eritrociti in SAG-M stoccati in assenza di inibitori delle proteasi e in atmosfera ossidante.

I 5 campioni dell'esperimento controllo sono stati prelevati e processati il giorno 0 mentre aliquote da tutti gli altri esperimenti sono state prelevate e processate dopo 7 e 14 giorni di stoccaggio (figura 2.4).

### **2.2.2 Estrazione della membrana eritrocitaria**

L'estrazione delle membrane plasmatiche dalle cellule eritrocitaria è stata realizzata, in accordo con Olivieri et al. [63]. Il sangue stoccato in SAG-M è stato centrifugato a 4°C per 10 min a 1000 x g. Il surnatante è stato quindi scartato e le emazie impaccate lavate in tre volumi di tampone fosfato 5 mM, pH 8.0, contenente 0.9% p/v di NaCl. Dopo una centrifugata a 4°C per 10 min a 600 x g il surnatante è stato scartato e il lavaggio delle emazie è stato ripetuto per tre volte. La lisi cellulare è stata poi realizzata a 4°C per shock osmotico, utilizzando 9 volumi di una soluzione ipotonica di tampone fosfato 5 mM, pH 8.0 contenente EDTA (1mM) PMSF (1mM) come inibitori di proteasi. Le membrane sono state quindi ottenute centrifugando a 4 °C per 20 min a 17000 x g e risospese in tampone fosfato 5 mM, pH 8.0 ad una concentrazione proteica di circa 9 mg / mL.

### 2.2.3. Elettroforesi bidimensionale IEF-SDS-PAGE

Per rimuovere l'eccesso di lipidi, garantendo una buona solubilizzazione delle proteine della membrana eritrocitaria, un volume di membrane è stato precipitato con 4 volumi di una miscela tri-n-butil-fosfato / acetone / metanolo (1:12:1). Dopo un'incubazione di 90 min a 4 °C sotto continua agitazione, le proteine sono state pellettate a 4 °C per 20 min a 6000 x g. Il pellet di proteine ottenuto è stato seccato all'aria e quindi sospeso in una soluzione (cocktail IEF) contenente 7 M urea, 2 M tiourea, 2% (p/v) ASB14, 0.8% (v/v) anfoline (pH 3-10), 40 mM Tris-HCl pH (8.8), 5mM TBP, 10mM acrilamide, 0.1 mM EDTA (pH 8.5), 2% cocktail inibitori di proteasi (Sigma-Aldrich) e 2 mM PMSF. La sospensione è stata lasciata ad incubare, a temperatura ambiente sotto continua agitazione, per 3 h. L'over-alkilazione dovuta all'acrilamide in eccesso è stata evitata con l'aggiunta di una quantità equimolare di DTT al termine del periodo di incubazione. Passate le 3 h la sospensione è stata centrifugata per 30 min a 10000 x g. Il pellet ottenuto è stato scartato e la concentrazione proteica del surnatante è stata misurata con il kit DC Protein Assay (Bio-Rad). Per la prima dimensione sono state utilizzate delle IPG strips 3-10 NL da 13 cm (Amersham Biosciences). Il metodo di caricamento adottato è stato quello della reidratazione passiva e ogni strip è stata reidratata overnight con 250 µL del cocktail IEF contenente il campione estratto. Per ogni strip sono stati caricati 300 µg di proteina totale. Le strips sono state focalizzate a 20 °C per un totale di 40000 Vh, utilizzando un Multiphor II (Amersham Biosciences) con un limite di 50 µA per strip. Per la seconda dimensione ogni strip è stata equilibrata per 30 min con una soluzione contenente 6M urea, 2% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerolo, 375 mM Tris-HCl (pH 8.8) sotto gentile agitazione. Le strips sono state poi caricate su di un SDS gel [64] a gradiente (T 5-16%) e ricoperte con una soluzione contenente 0.5% (p/V) agar disciolto nel tampone di corsa del catodo (192 mM glicina, 0.1% p/v SDS, 0.025M Tris pH 8.3). Il tampone di corsa per l'anodo è un 375 mM Tris-HCl, pH 8.8. La corsa elettroforetica di seconda dimensione è stata realizzata a 30 mA per gel, e la temperatura è stata mantenuta costante a 11 °C per tutta la durata della medesima. La colorazione dei gel è stata realizzata sia con *BlueSilver* [65] che *Silver-stain* [66].

### 2.2.4 *Analisi statistica*

I gels una volta colorati sono stati digitalizzati con un densitometro. Le immagini ottenute sono state quindi comparate ed analizzate con l'ausilio di un software per analisi d'immagine di gels bidimensionali (PDQuest versione 7.3, Bio-Rad). Ogni gel è stato esaminato al fine di identificare il numero totale di spots in esso presenti. Per ogni esperimento è stata così creata una mappa statistica virtuale, il cui numero totale di spots corrispondeva alla media aritmetica  $\pm$  la deviazione standard degli spots identificati nelle 5 repliche biologiche dell'esperimento (figura 1). Per ogni esperimento è stata anche creata una mappa sintetica (*master map*) virtuale contenente solo gli spots presenti in tutte e cinque le repliche biologiche. Le 5 *master maps* sono state poi comparate alla ricerca di spots differenziali. Gli spots differenziali con un valore di ANOVA (analisi della varianza) inferiore a 0.05 sono stati tagliati ed identificati mediante spettrometria di massa (MS/MS).

### 2.2.5. *Digestione triptica in gel*

Gli spots differenziali sono stati ritagliati dai gels e sottoposti a digestione triptica in gel secondo il protocollo di Shevchenko et al. [67]. Dopo una serie di lavaggi ciascun pezzo di gel è stato essiccato e poi reidratato in ghiaccio con una soluzione di digestione contenente  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM e tripsina 12.5 ng/ $\mu\text{L}$  (tripsina porcina modificata, Promega). Dopo 30 minuti il surnatante è stato scartato e sono stati aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. I pezzi di gel sono stati lasciati ad incubare a 37 °C per una notte. L'indomani il trasudato contenente i peptidi digeriti è stato separato dal gel ed essiccato. Prima dell'analisi in massa i peptidi sono stati risospesi in 10  $\mu\text{L}$  di acido formico al 5%.

### 2.2.6 *Nano RP-HPLC-ESI-MS/MS e sequenziamento peptidico*

I peptidi sono stati separati in cromatografia liquida a fase inversa, usando un nano-HPLC (Ultimate, Dionex-LC Packings). 10  $\mu\text{L}$  di campione sono stati iniettati dall'autocampionatore su di una pre-colonna fatta in casa lunga 2 cm (75  $\mu\text{m}$  i.d.; 375  $\mu\text{m}$  o.d.; ResprosilC18-AQ, 3  $\mu\text{m}$ ) ad un flusso di 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ . L'eluizione sequenziale dei peptidi è stata realizzata ad un flusso di 200 nL/min utilizzando una colonna fatta in casa di 15 cm (75  $\mu\text{m}$  i.d.; 375  $\mu\text{m}$  o.d.;

ResprosilC18-AQ, 3  $\mu\text{m}$ ) in linea con la precolonna. Il gradiente utilizzato per la corsa era di tipo lineare, e prevedeva il passaggio da un 100% della soluzione A (2% v/v acetonitrile, 0.1% v/v acido formico) ad un 50% della soluzione B (98% v/v acetonitrile, 0.1% v/v acido formico) in 40 minuti.

I peptidi sono stati eluiti direttamente dentro un spettrometro di massa con trappola ionica ad alta capacità (HTCplus Bruker-Daltonics). Il voltaggio del capillare è stato settato a 1.5 kV. Il range di scansione utilizzato era tra i 300 e i 1800 m/z. L'identificazione delle proteine è stata realizzata per MS/MS Ions Search dei frammenti riconosciuti, ricercando nel database non ridondante del National Center for Biotechnology information (NCBIInr) utilizzando il programma MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). La ricerca all'interno del database è stata compiuta includendo i seguenti parametri: carbamidometilazione delle cisteine, completa e parziale ossidazione delle metionine, tolleranza della massa peptidica di  $\pm 1.2$  Da e tolleranza per la massa del frammento peptidico di  $\pm 0.9$  Da, digestione eseguita con tripsina.

Gli studi e l'identificazione delle modifiche post-traduzionali ossidative sono stati realizzati utilizzando uno spettrometro di massa del tipo quadrupolo a tempo di volo (Q-TOF, modello microTOF-Q, Bruker) equipaggiato con una sorgente *nano*-ESI.

### **2.2.7 Misure dei livelli di glutazione**

Per valutare i livelli delle difese antiossidanti delle emazie durante il periodo di stoccaggio, sono state misurate le concentrazioni di glutatione sul campione controllo dopo 0, 14 e 42 giorni di stoccaggio. Per tale esperimento è stato utilizzato un metodo, descritto da Raththagala et al. [68], che permette di valutare i livelli di glutatione senza manipolazioni del campione. Le emazie sono state isolate da plasma e leucociti con una centrifugata di 500 x g a 4 °C per 10 min. I globuli rossi impaccati sono stati poi risospesi e lavati per tre volte con un tampone a pH 7.4 contenente KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaCl 140.5 mM, Tris 21.0 mM, destrosio 11.1 mM e albumina bovina 5% (p/v). Per l'analisi è stata calcolata una curva di calibrazione mescolando (in eppendorf diverse) 100  $\mu\text{l}$  di emazie controllo (0 giorni di stoccaggio, ematocrito di 1.0%) con quantità variabili

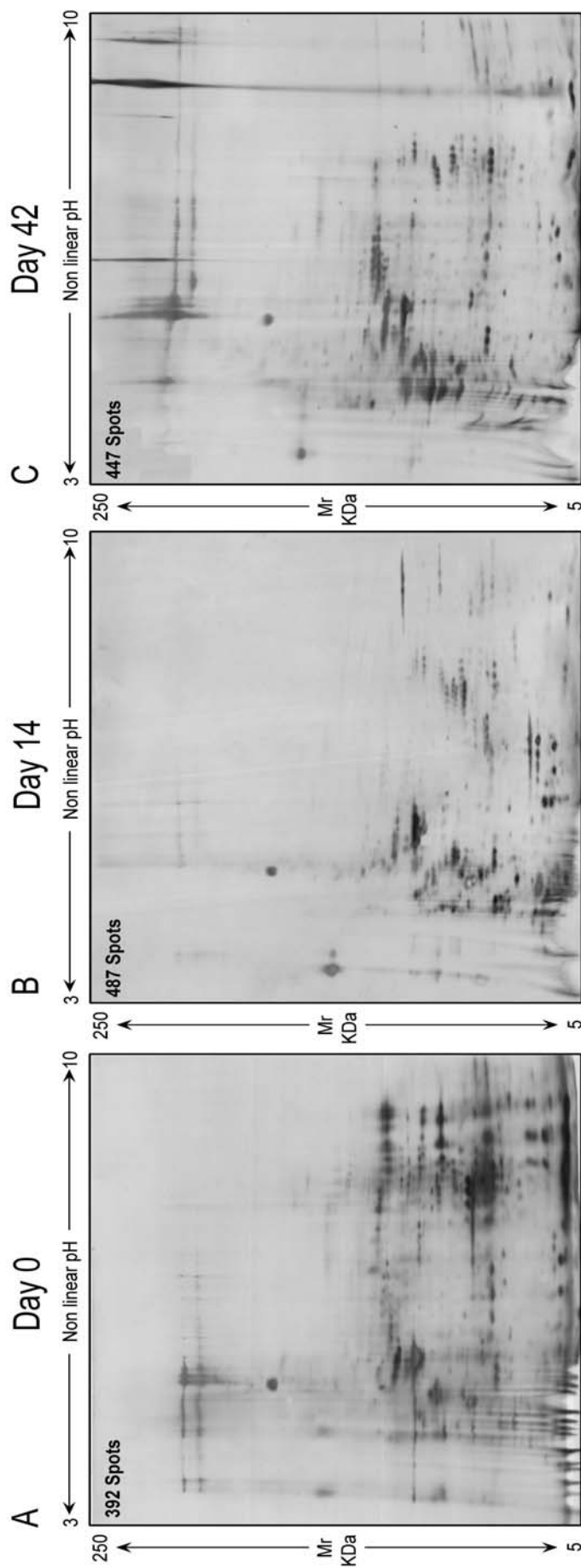
(0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, e 20.0  $\mu$ l) di una soluzione standard 1.0 mM di glutatione. Le soluzioni sono state portate con acqua ad un volume finale di 1.0 mL. Alle soluzioni finali sono stati poi aggiunti 50  $\mu$ L di una soluzione contenente glutatione transferasi ( 50 unità per mL) e 100  $\mu$ L di monoclorobimano 250  $\mu$ M. Dopo un periodo di incubazione di 10 minuti, per ogni standard è stata misurata la fluorescenza del complesso glutatione-monoclorobimano (eccitazione 370 nm, emissione 478 nm). I campioni (dopo 0, 14 e 42 giorni di stoccaggio) sono stati preparati mescolando 100  $\mu$ l di emazie impaccate (ematocrito 0.1%) con 900  $\mu$ l di acqua, 50  $\mu$ l di glutatione transferasi (50 unità per mL) e 100  $\mu$ L di monoclorobimano 250  $\mu$ M.

## SEZIONE 2.3: RISULTATI E DISCUSSIONE

### 2.3.1. *Cinetica delle lesioni*

Lo studio della letteratura sottolinea chiaramente come l'eziologia dei processi degenerativi di *storage lesions* sia multifattoriale. I processi che in maggior misura contribuiscono alla degradazione proteica sono 2: l'attacco di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e la concomitante degradazione proteolitica ad opera di endo ed eso proteasi. Una specie reattiva dell'ossigeno (come ad esempio  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ) può generarsi attraverso diverse vie biochimiche, per poi attaccare e ossidare le catene laterali di diversi amminoacidi. L'attacco ossidativo è un fenomeno irreversibile, casuale e del tutto irriproducibile. Esso può infatti interessare qualsiasi specie proteica contenente almeno un residuo amminoacidico tra i seguenti: cisteina, metionina, triptofano, fenilalanina, tirosina, istidina, arginina, lisina, prolina, treonina. I risultati sono la formazione di *cross-linking* proteina-proteina non naturali e/o la frammentazione delle catene polipeptidiche [69]. Tali mutamenti comportano variazione strutturale e funzionale delle componenti proteiche che portano ad una perdita di funzionalità della complessa struttura del citoscheletro membranale. Vari autori hanno dimostrato come parallelamente allo stress ossidativo, possa esserci un'azione degenerativa della cellula eritrocitaria ad opera sia di proteasi endogene che esogene [70]. I due fenomeni degenerativi sembrerebbero comunque concatenati essendo stato dimostrato che l'attivazione delle proteasi endogene è subordinata a quella dei ROS [71].

Per confermare l'esistenza di una cinetica di degradazione delle proteine della membrana eritrocitaria, si è proceduto con una prima analisi elettroforetica bidimensionale IEF-SDS-PAGE di proteine di membrana di emazie estratte da sangue stoccato in condizioni standard per un periodo massimo di 42 giorni. La figura 2.3 riporta le mappe 2D di proteine di membrana estratte dopo 0, 14 e 42 giorni di stoccaggio. I gel sono stati colorati con la metodica del *Silver-stain*. Il protocollo da noi utilizzato [72, 73] è stato tale da permetterci di visualizzare in un'unica mappa la maggior parte delle proteine presenti nella membrana eritrocitaria, comprese quelle più idrofobiche come la Banda 3. Per ciascuna mappa

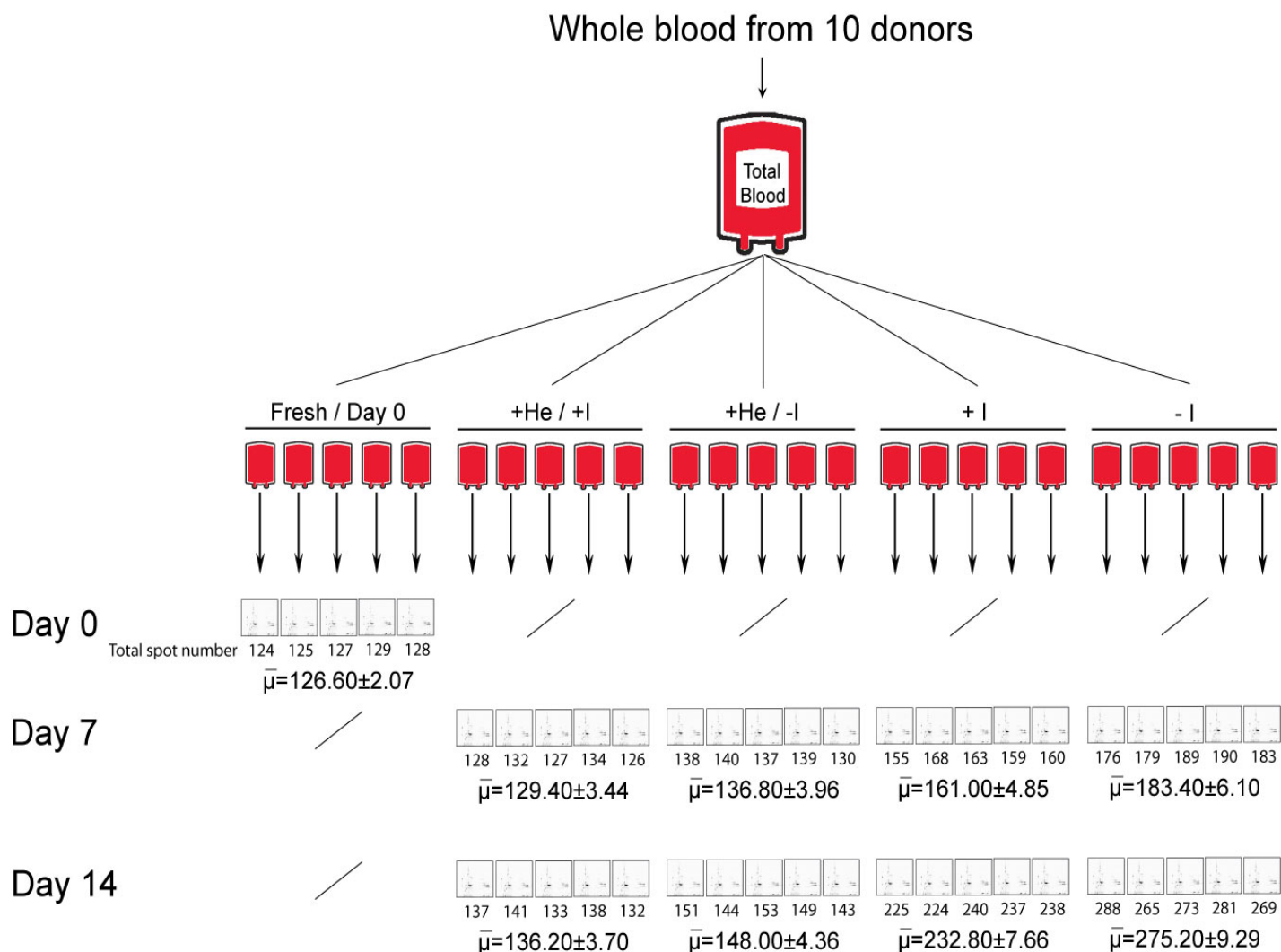


**Figura 2.3** Mappe elettroforetiche bidimensionali IEF-SDS-PAGE di proteine di membrana estratte da emazie dopo 0, 14 e 42 giorni di stoccaggio in condizioni standard (SAG-M, 4 °C). Le mappe sono state colorate con la tecnica del Silver-stain. Sono stati caricati 100 µg di proteine per ogni mappa.

è riportato il numero totale di spots valutato con un software di analisi di immagine. Dopo 0 giorni di stoccaggio (subito dopo il prelievo) la mappa conta 392 spots, tale valore sale a 487 nella mappa che si ottiene dopo 14 giorni per poi scendere di nuovo a 447 dopo 42 giorni di stoccaggio. Molti spots presenti nel campione al giorno 0 presentano dopo 14 e 42 giorni di stoccaggio un decremento dell'intensità di colorazione (riduzione del volume dello spot), mentre altri mostrano una mobilità elettroforetica alterata in prima dimensione. Altre anomalie sono riscontrabili nelle mappe a 14 e 42 giorni, come la presenza di *smearing* verticali, la formazione di aggregati proteici ad alti pesi molecolari e la comparsa di nuovi spots frammento a bassi pesi molecolari. Questi fenomeni, documentati attraverso mappe 2D, dimostrano una massiccia degradazione del proteoma membranale durante il periodo di stoccaggio del sangue, dovuta all'azione di specie reattive dell'ossigeno su componenti proteiche [74, 75]. Tali dati sono perfettamente in linea con il lavoro di Aniss et al. [76] in cui è stato realizzato uno studio cinetico delle variazioni subite dal proteoma del surnatante di stoccaggio dei preparati eritrocitari. Anche in questo caso è stato documentato un graduale incremento del numero di spots durante i primi 14 giorni di stoccaggio, seguito da un declino a 42 giorni. Kriebardis et al. [77] hanno invece dimostrato, utilizzando tecniche differenti dalle nostre, come i prodotti tipici dei processi ossidativi siano già presenti dopo soli 10 giorni di stoccaggio. Si conclude quindi che essendo l'eritrocita una specie cellulare priva di nucleo, il suo proteoma membranale subisce delle alterazioni dovute necessariamente a fenomeni post-traduzionali che in questo caso, sulla base delle mappe in figura 2.3 sembrano essere di tipo degenerativo. L'iniziale aumento del numero di spots, tra 0 e 14 giorni, può essere spiegato attraverso un processo che, degenerando irreversibilmente le proteine membranali, genera dei frammenti proteici di peso molecolare inferiore alla specie proteiche originali. Seguendo una cinetica esponenziale, la degradazione arriva poi a colpire gli stessi frammenti proteici, creando dei polipeptidi con un peso molecolare talmente basso da non poter essere rivelati in una mappa 2D IEF-SDS-PAGE. Questa spiegazione può giustificare la diminuzione del numero di spots a cui si assiste tra il quattordicesimo ed il quarantaduesimo giorno di stoccaggio.

### 2.3.2. Metodo di campionamento e linee guida concettuali dell'analisi

La comparazione della mappe in figura 2.3 ha dimostrato chiaramente l'esistenza di un processo degenerativo delle proteine della membrana eritrocitaria. Considerando anche i dati di Anniss et al. [76] si deduce che tale fenomeno deve necessariamente riguardare anche l'ambiente extracellulare, interessando in modo globale tutte le specie proteiche contenute nella sacca di stoccaggio. Molti autori hanno studiato gli effetti delle *storage lesions* sulle proteine della membrana eritrocitaria, ma sino ad oggi nessuno di essi ha mai utilizzato un approccio di tipo proteomico. Come già visto in figura 2.3, tale metodica ci ha permesso di ottenere un'overview quanto più generale possibile del processo degenerativo e, come vedremo in seguito, ci ha dato la possibilità di valutare l'entità del contributo dello stress ossidativo e della degradazione proteolitica al fenomeno di degradazione. Lo studio proteomico di processi casuali ha richiesto comunque lo sviluppo di un piano di campionamento che permettesse di valutare i risultati in chiave statistica. Per eliminare qualsiasi influenza individuale è stato realizzato un pooling antecedente all'analisi, in cui il sangue destinato allo stoccaggio è stato ottenuto dal mescolamento del sangue prelevato da 10 donatori sani (figura 2.4, whole blood from 10 donors). Per valutare l'entità dei due fenomeni degenerativi si è poi deciso di impostare 5 differenti esperimenti (fresh blood/day 0, esperimento controllo su sangue fresco; + He/+I, sangue conservato sotto He ed in presenza di inibitori di proteasi; +I sangue conservato sotto O<sub>2</sub> ed in presenza di inibitori di proteasi; -I sangue conservato sotto O<sub>2</sub> ed in assenza di inibitori di proteasi), nei quali il blocco dell'azione dei ROS è stato attuato stoccando il sangue in atmosfera inerte da elio e l'aggiunta di inibitori di proteasi è stata invece pensata per inibire l'azione, sia di proteasi endogene alla cellula eritrocitaria, sia di proteasi liberate dalla lisi dei leucociti. Nel caso dei ROS, l'uso dell'elio è stato preferito a quello di *scavenger* chimici, dato che eliminando tutto l'ossigeno (compreso quello legato all'emoglobina) si blocca all'origine qualsiasi fonte di genesi dei radicali liberi. Con l'uso contemporaneo di elio e inibitori di proteasi si è cercato di inibire entrambi i fenomeni testando così quella che teoricamente doveva essere la condizione di conservazione perfetta. Per ogni esperimento abbiamo preferito considerare la variabilità biologica piuttosto che quella tecnica realizzando 5 repliche ognuna in

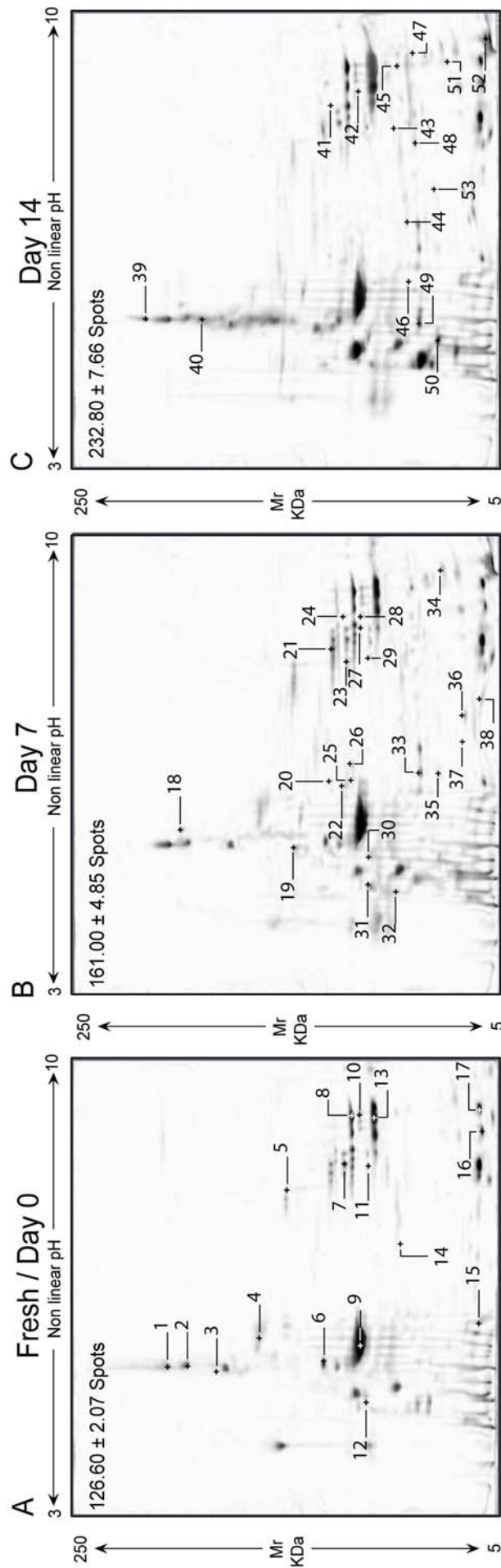


**Figura 2.4** Rappresentazione schematica dell'approccio sperimentale. Tutto il sangue fresco prelevato da 10 donatori sani è stato mescolato e successivamente suddiviso in 25 aliquote, 5 per ogni esperimento. (*fresh blood/day 0*, esperimento controllo; *+He/+I*, sangue conservato sotto He ed in presenza di inibitori di proteasi; *+I* sangue conservato sotto O<sub>2</sub> ed in presenza di inibitori di proteasi; *-I* sangue conservato sotto O<sub>2</sub> ed in assenza di inibitori di proteasi). Per ogni sacca è stata poi corsa una mappa 2D IEF-SDS-PAGE delle proteine estratte dalla membrana eritrocitaria dopo 7 e 14 giorni di conservazione. Per ogni mappa il numero totale degli spots è stato valutato con PDQuest vers. 7.3. Il numero di spots della mappa *virtuale* ottenuta da ogni esperimento è stato calcolato come la media aritmetica degli spots delle 5 mappe di replica biologica ± la deviazione standard (SD).

una sacca diversa. In questo modo infatti in sacche diverse dello stesso esperimento la degradazione può seguire vie chimiche diverse portando a prodotti differenti. Dopo 7 e 14 giorni di stoccaggio sono state corse delle mappe 2D IEF-SDS-PAGE delle proteine di membrane eritrocitaria estratte da ogni sacca e per ogni mappa è stato calcolato il numero totale di spots presenti. In questo modo per ogni esperimento è stato possibile ottenere una mappa virtuale dopo 7 e dopo 14 giorni di stoccaggio. Per ogni mappa virtuale il numero totale di spots corrispondeva alla media aritmetica  $\pm$  la deviazione standard (SD) degli spots presenti nelle 5 repliche biologiche. La comparazione del numero totale di spots tra le diverse mappe virtuali, e soprattutto la valutazione dei valori di deviazione standard, hanno permesso di valutare l'entità e la casualità dei due fenomeni degenerativi che concorrono alla degradazione del citoscheletro membranale. Gli spots differenziali tra le mappe virtuali dei diversi esperimenti sono stati poi tagliati, sottoposti al procedimento di digestione triptica in gel e identificati mediante spettrometria di massa. Tutti gli spots considerati in tale analisi erano comunque presenti in tutti e cinque i replicati biologici di ogni esperimento considerato.

### ***2.3.3. Entità dell'effetto dei ROS nella degradazione proteica***

La figura 2.5 permette di valutare l'entità della degradazione ROS dipendente delle proteine della membrana eritrocitaria. Essa compara la mappa virtuale ottenuta dal campione fresco (figura 2.5 A,  $126.60 \pm 2.07$  spots) con le mappe virtuali ottenute dai campioni stoccati per 7 (figura 2.5 B,  $161.00 \pm 4.85$  spots) e 14 giorni (figura 2.5 C,  $232.80 \pm 7.66$  spots) in presenza di inibitori di proteasi. L'aggiunta degli inibitori di proteasi è stata pensata per bloccare la degradazione proteolitica, in modo tale da studiare gli effetti del solo processo di degradazione radicalica ROS-dipendente. L'aggiunta di inibitori di proteasi è stata preferita alla pratica della leucofiltrazione, in quanto in questo modo si inibiscono sia le proteasi di origine endogena che quelle di origine esogena, liberate nel medium di stoccaggio a seguito della lisi dei globuli bianchi [79]. Per identificare le specie proteiche più sensibili allo stress ossidativo, si è deciso di focalizzare l'attenzione sui cambiamenti che avvenivano nei primi 14 giorni di stoccaggio, infatti è noto che durante i primi 5-6 giorni di stoccaggio le difese antiossidanti



**Figura 2.5** Mappe elettroforetiche bidimensionali IEF-SDS-PAGE di proteine di membrana estratte da emazie dopo 0 (A), 7 (B) e 14 giorni di stoccaggio (C) in condizioni standard (SAG-M, 4 °C) senza rimozione di inibitori di proteasi (1% v/v). I numeri nelle mappe si riferiscono alle proteine identificate e riportate nelle tabelle 1 (day 0), 2 (day 7) e 3 (day 14). Sulle mappe è riportato in numero di spots ottenuto dalla media aritmetica ± la deviazione standard degli spots presenti nelle mappe delle 5 repliche biologiche. Le mappe sono state colorate con la tecnica del Blue Silver. Sono stati caricati 600 µg di proteine per ogni mappa.

della cellula eritrocitaria riescono a contrastare efficacemente l'azione delle specie radicaliche. Al contrario l'interpretazione di mappe 2D ottenute da campioni troppo avanti nello stoccaggio (ad esempio 42 giorni) risultava al quanto difficile, proprio per la prolungata esposizione al danno radicalico. La tabella 1 riporta le identificazioni della mappa 2D del controllo (figura 2.5, day 0) . Sono state identificate 17 proteine membranali tutte costituenti il citoscheletro dell'eritrocita. Tra le altre bisogna sottolineare l'identificazione della proteina Banda 3, la specie proteica più idrofobica tra tutte quelle presenti nella membrana eritrocitaria (GRAVY 0.300) e per questo anche la più difficile da visualizzare in mappe 2D IEF-SDS-PAGE. Tecnicamente la presenza della banda 3 dimostra come il protocollo di estrazione proteica da noi utilizzato sia stato ottimale per lo studio del sistema membranale in considerazione. Il confronto tra le mappe controllo e 7 giorni stressato rivela delle differenze già ben accentuate. In particolare dopo 7 giorni di stoccaggio il profilo elettroforetico della mappa 2D ha già subito una netta variazione, soprattutto nella regione tra i 35 e i 100 kDa. In tutta la mappa molti spots risultano meno voluminosi rispetto agli analoghi della mappa controllo, inoltre a pesi molecolari superiori a 130 kDa nella regione acida della mappa sono già ben visibili degli *smearing*. Sotto i 60 kDa e soprattutto tra i 15 e gli 8 kDa, sono presenti dei nuovi spots assenti nella mappa a 0 giorni. Tali spots rappresentano i frammenti generati dall'attacco ossidativo dei ROS a carico delle proteine native e la tabella 2 ne riporta le identificazioni ottenute via MS/MS. Lo spot numero 22, ad esempio, è stato identificato con la  $\alpha$ -spettrina la quale in condizioni normali (vedi spot 1 della mappa controllo, tabella 1) ha un peso molecolare apparente su gel 2D di 241 kDa, sulla mappa a 7 giorni invece lo spot 22 presenta un peso molecolare apparente di 52 kDa. Questo fenomeno può essere spiegato solo ammettendo che lo spot 22 è una forma troncata della  $\alpha$ -spettrina. Dallo studio approfondito dei dati in tabella 2, si deduce inoltre che le specie proteiche più frammentate e quindi più suscettibili allo stress ossidativo sono la banda 4.2 (spots 26, 35, 36 e 37) e in misura minore la banda 4.1 (spots 20 e 33) e la spetttrina (spots 18, 22 e 30). Analizzando le coperture di sequenza delle proteine si deduce che tutti i peptidi identificati sono localizzati all'estremità N-terminale, suggerendo che l'attacco ossidativo agisca con una rimozione di residui

amminoacidici a partire dall'estremità C-terminale. E' stato interessante notare che dei tre frammenti della banda 3 identificati, quello nello spot 19 conteneva un prodotto di degradazione della proteina privato degli ultimi 30-35 amminoacidi all'estremità C-terminale, quello dello spot 31 corrispondeva a tutto il dominio citoplasmatico della proteina, mentre quello nello spot 32 contiene una porzione troncata centrale della specie proteica.

I nostri esperimenti hanno dimostrato anche la comparsa di specie proteiche che differiscono da quelle naturali per il valore del loro punto isoelettrico (pI). Ad esempio lo spot numero 7 (figura 2.5 A) è stato identificato nella mappa controllo con la flotillina, mentre nella mappa a 7 giorni (figura 2.5 B) la stessa identificazione è stata attribuita agli spots numero 23 e 24. Tali spots sono il primo e l'ultimo di una serie di 5 spots che differiscono solo per il valore del pI, presentando un peso molecolare apparente identico a quello dello spot 7 della mappa controllo. Come la flotillina si comportano: l'aldolasi (spot 10 nella mappa a 0 giorni; spots 27 e 28 dopo 7 giorni), l'arginasi (spot 11 nella mappa a 0 giorni; spots 29 dopo 7 giorni) e la  $\beta$ -spettrina (spot 10 nella mappa a 0 giorni; spots 27 e 28 dopo 7 giorni). Questi *shift* del valore di pI costituiscono un'altra evidenza dell'azione dei ROS. I radicali liberi infatti sono in grado di indurre delle modifiche covalenti nella catena laterale di alcuni amminoacidi senza che avvenga necessariamente alcuna rottura di legami peptidici. In questo modo non c'è una frammentazione della catena polipeptidica, ma vi è una alterazione del pI della proteina stessa che solitamente diviene più acida. A supporto di tali tesi è stato dimostrato [79] che gli amminoacidi cisteina, metionina, triptofano, istidina e tirosina sono altamente suscettibili all'attacco di specie radicaliche, inoltre almeno la cisteina e l'istidina in condizioni fisiologiche possono assumere delle cariche nette (cisteina negativa, l'istidina può protonarsi). Si capisce quindi come l'ossidazione di uno o di entrambi gli amminoacidi possa indurre un cambiamento della carica totale di tutta la proteina. È importante sottolineare che le nostre analisi MS/MS hanno rivelato, a livello della Asparagina 502, un sito di deamidazione nella proteina banda 4.1. Tale scoperta è stata fatta per un frammento della proteina generatosi dopo 7 giorni di stoccaggio (spot 20 figura 2.5 B; tabella 2). Questo sito

**Tabella 1.** Proteine identificate attraverso analisi MS/MS negli spots della mappa in figura 2.5 A. Tutti gli spots identificati erano presenti in tutte e 5 le mappe replica.

SPOT	Mr, kDa theor./exp.	pI predict./exp.	Peptides identified by MS/MS				Mascot Score	NCBI Accession Number	Protein ID [Homo sapiens]
			m/z	charge state	start-end	sequence			
01	281.0/241	4.9/5.09	516.78	(2+)	7-16	ETVVESSGPK	2587	gi 115298659	spectrin alpha
			658.91	(2+)	17-27	VLETAEEIQR			
			451.35	(2+)	28-34	RQEVLR			
			710.78	(2+)	61-72	DADDLGKWIEMK			
			679.08	(3+)	73-90	VNILTDKSYEDPTNIQGK			
			626.36	(2+)	80-90	SYEDPTNIQGK			
			635.39	(2+)	94-104	HQSLEAEVQTK			
			600.37	(2+)	239-248	QNEVNAAWER <sup>b</sup>			
			657.41	(2+)	257-268	QKALSNAANLQR			
			529.34	(2+)	259-268	ALSNAANLQR			
			601.89	(2+)	272-281	DVTEAIQWIK			
			552.89	(2+)	312-321	NLAVMSDKVK			
			619.36	(2+)	366-374	LQATYWYHR			
			670.38	(2+)	484-494	DSEQVDSWMSR			
			545.35	(2+)	532-541	IITVDKTATK			
			759.91	(2+)	542-554	LIGDDHYDSENIK			
			840.42	(2+)	604-617	LADDEDYKDIQNLK			
			689.40	(3+)	643-661	TGQEMIEGGHYASDNVTTR			
			861.71	(3+)	680-701	GTQLHEANQQLQFENNAEDLQR			
			443.21	(2+)	718-725	GLAEVQNR			
			626.37	(2+)	728-739	KHGLLESAAVAAR			
			562.39	(2+)	729-739	HGLLESAAVAAR			
			637.92	(2+)	775-785	FEALKEPLATR			
			689.45	(2+)	837-848	VILENIASHEPR			
			555.33	(2+)	859-873	MVEEGHFAAEDVASR			
			604.35	(2+)	876-885	SLNQNMESLR			
			785.47	(3+)	960-981	NQANACQQQQAAPVEGVAGEQR			
			607.39	(2+)	982-991	VMALYDFQAR			
			575.37	(3+)	1017-1032	VEAADHQGIVPAVYVVR			
			600.39	(2+)	1047-1056	REEPGNITQR			
			627.69	(3+)	1119-1133	KFDEFQKDLTNEPR			
			479.33	(2+)	1126-1133	DLTNEPR			
			642.79	(3+)	1231-1248	DLVPLGDKVTILGETAER			
799.39	(2+)	1249-1262	LSESHPDATEDLQR						
552.35	(3+)	1420-1434	SDDKSSLSLEALMK <sup>a</sup>						
702.38	(2+)	1437-1449	DDLDKAITAQEGK						
578.99	(2+)	1484-1493	ALKAQLIDER						
648.84	(2+)	1541-1551	HQTFEAHEVDGR						
501.41	(2+)	1638-1647	DLASAGNLLK						
565.47	(2+)	1638-1648	DLASAGNLLKK						
803.99	(2+)	1695-1708	FLNVQELAAAHHEK						
607.43	(2+)	1783-1793	AAVGQEEIQLR						
809.94	(2+)	1889-1902	VLQEEQNKEISSK						
630.45	(2+)	2101-2110	CLELDQQIK						
742.42	(2+)	2252-2263	MQHNLEQQIQAK <sup>a</sup>						
495.42	(2+)	2322-2330	FLDAVDPGR						
02	247.1/217	5.1/5.11	649.34	(3+)	128-144	VHLENMGSHDIVDGNHR <sup>a</sup>	2367	gi 67782319	spectrin beta
			718.91	(2+)	232-243	HNLEHAFNVAER			
			577.84	(2+)	293-302	VIDHAIETEK			
			458.85	(2+)	380-387	VYTPHDGK			
			408.88	(2+)	388-394	LVSDINR			
			581.91	(2+)	435-443	ETWLSNQNR			
			651.82	(2+)	572-583	LMEADIAIQGDK <sup>a</sup>			
			773.87	(2+)	572-585	LMEADIAIQGDKVK <sup>a</sup>			
			394.82	(2+)	586-593	AITAATLK			
			788.37	(2+)	599-611	GYQPCDPQVIQDR			
			656.38	(2+)	707-717	KQFGHPQIEAR			
			773.92	(2+)	765-779	LLSGEDVQDEGATR			
			767.02	(2+)	828-840	ELYQQVVAQADLR			
			552.38	(2+)	976-985	VVESTKDLGR			
			422.35	(2+)	1003-1010	DVAAIQAR			

			752.47 (3+)	1017-1035	<b>ESQQLMDSHPQEKEDIGQR</b>			
			701.50 (2+)	1143-1155	<b>LEGLDTGWNALGR</b>			
			629.89 (2+)	1222-1233	<b>DKVLSPVDSGNK</b>			
			508.39 (2+)	1224-1233	<b>VLSPVDSGNK</b>			
			604.86 (2+)	1234-1244	<b>LVAEGLYSDK</b>			
			436.88 (2+)	1249-1255	<b>VQLIEDR</b>			
			493.90 (2+)	1263-1271	<b>AQEASVLLR</b>			
			748.91 (2+)	1294-1306	<b>LLTSQDVSYDEAR</b>			
			603.37 (2+)	1360-1369	<b>LWDELQATTK</b>			
			702.42 (2+)	1404-1416	<b>SDDPGKDLTSVNR</b>			
			479.87 (2+)	1424-1431	<b>VEDQVNR</b>			
			767.43 (2+)	1486-1497	<b>DLEDETLWVEER</b>			
			810.95 (2+)	1520-1533	<b>NQTLQNEILGHTPR</b>			
			600.39 (2+)	1559-1568	<b>LGHQLSSWDR</b>			
			405.26 (2+)	1632-1638	<b>AVEDYGR</b>			
			888.51 (2+)	1647-1663	<b>AQGLLSAGHPEGEQIIR</b>			
			719.44 (3+)	1664-1682	<b>LQGQVDKHYAGLKDVAEER</b>			
			746.91 (2+)	1698-1709	<b>ETDDLEQWISEK</b>			
			480.82 (2+)	1738-1746	<b>ETGAIGQER</b>			
			706.50 (3+)	1738-1756	<b>ETGAIGQERVDNNAFIER</b>			
			588.90 (2+)	1747-1756	<b>VDNNAFIER</b>			
			716.89 (2+)	1790-1801	<b><u>M</u>QLLAASYDLHR<sup>a</sup></b>			
			490.86 (2+)	1862-1870	<b>LQTAYAGEK</b>			
			484.05 (3+)	1896-1907	<b>RTQLVDTADKFR</b>			
			647.43 (2+)	1897-1907	<b>TQLVDTADKFR</b>			
			568.88 (2+)	1934-1943	<b>DVSSVELLMK<sup>a</sup></b>			
			715.91 (2+)	1944-1955	<b>YHQGINAEIETR</b>			
			669.39 (2+)	1973-1983	<b><u>Q</u>HQASEEIREK<sup>b</sup></b>			
			454.35 (2+)	2057-2084	<b>STASWAER</b>			
			730.97 (2+)	2065-2077	<b>FAALEKPTTLELK</b>			
03	114.4/131	5.2/4.87	441.40 (2+)	64-72	<b>VAIVVGAPR</b>	501	gi 124951	Integrin alpha-IIb precursor
			611.89 (2+)	109-119	<b>NVGSQTLQTFK</b>			
			764.91 (3+)	150-170	<b>TEEAETKTPVGSFCFLAQPESEGR</b>			
			803.42 (2+)	156-170	<b>TPVGSFCFLAQPESEGR</b>			
			786.45 (2+)	185-196	<b>IYVENDFSWDKR</b>			
			751.95 (2+)	418-431	<b>GQVLVFLGQSEGLR</b>			
			561.37 (2+)	693-702	<b>ALSNVEGFER</b>			
			694.47 (2+)	715-726	<b>VVLCELGDNPMKK</b>			
			630.88 (2+)	800-810	<b>EQNSLDSWGPK</b>			
04	81.3/84	5.6/5.40	737.58 (2+)	7-21	<b>AAVVTSPPTTAPHK</b>	218	gi 28382	erythrocyte alpha adducin
			571.89 (2+)	200-209	<b>INLQGDIVDR</b>			
			905.12 (2+)	331-338	<b>TLASAGPNDNLVLLNPEK</b>			
			616.33 (2+)	532-543	<b>SLVQGELVTASK</b>			
05	70.2/70	6.3/6.81	700.43 (2+)	146-157	<b>LAPNQTKLEEK</b>	881	gi 110430928	EPB41 protein
			700.89 (2+)	153-163	<b>ELEEKVMELHK<sup>a</sup></b>			
			890.97 (2+)	167-182	<b><u>S</u>MTPAQADLEFLENAK<sup>a</sup></b>			
			589.83 (2+)	184-193	<b>LSMYGVDLHK<sup>a</sup></b>			
			628.03 (3+)	242-257	<b>IRPGEQEQYESTIGFK</b>			
			488.34 (2+)	280-288	<b>LTSTDITPK</b>			
			570.04 (3+)	310-324	<b>QASALIDRPAPHFER</b>			
			624.40 (2+)	333-345	<b>SLDGAAAVDSADR</b>			
			615.81 (2+)	378-388	<b>AQKETVKAIEVK</b>			
			546.83 (2+)	412-420	<b>LDGENIYIR</b>			
			575.35 (2+)	439-448	<b>HHASISELKK</b>			
			472.83 (2+)	466-473	<b>LSTHSPFR</b>			
			925.03 (2+)	474-491	<b>TLNINGQIPTGEGPPLVK</b>			
			731.42 (2+)	492-505	<b>TQTVTISDNANAVK</b>			
			598.72 (3+)	506-521	<b>SEIPTKDVPIVHTETK</b>			
			569.91 (2+)	512-521	<b>DVPIVHTETK</b>			
			586.34 (2+)	601-610	<b>EQHPDMSVTK</b>			
06	53.7/55	5.0/5.0	504.28 (2+)	14-28	<b><u>M</u>FGPGGTASRPSSSR<sup>a</sup></b>	1260	gi 37852	vimentin
			457.75 (2+)	29-36	<b>SYVTSTR</b>			
			499.32 (3+)	37-50	<b>TYSLGSALRPSTR</b>			
			714.91 (2+)	51-64	<b>SLYASPTGGVYATR</b>			
			529.99 (3+)	101-113	<b>TNEKVELQELNDR</b>			
			563.32 (2+)	114-122	<b>FANYDKVR</b>			
			482.25 (3+)	159-170	<b>RQVDQLTNDKAR</b>			
			644.38 (2+)	160-170	<b>QVDQLTNDKAR</b>			
			568.99 (3+)	171-184	<b>VEVERDNLAEDIMR<sup>a</sup></b>			
			662.29 (2+)	197-207	<b>EEAENTLQSEFR</b>			
			545.28 (2+)	208-217	<b>QDVDNASLAR</b>			
			512.29 (2+)	274-282	<b>QQYESVAAK</b>			
			655.31 (2+)	283-292	<b>NLQEAEEWYK</b>			

			547.29 (2+) 593.01 (3+) 745.87 (2+) 793.01 (3+) 452.81 (2+) 589.65 (3+) 561.34 (2+) 656.32 (2+) 720.36 (2+) 530.84 (2+) 466.78 (2+) 834.95 (2+)	(2+) (3+) (2+) (3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	295-304 295-310 322-334 322-342 335-342 365-378 382-390 391-401 391-402 402-410 403-410 425-439	<b>FADLSEANR</b> <b>FADLSEANRNDALR</b> <b>QVQSLTCEVDALK</b> <b>QVQSLTCEVDALKGTNESLER</b> <b>GTNESLER</b> <b>LQDEIQNMKEEMAR<sup>a</sup></b> <b>EYQDLLNVK</b> <b>MALDIEIATYR<sup>a</sup></b> <b>MALDIEIATYRK<sup>a</sup></b> <b>KLLEGEESR</b> <b>LLEGEESR</b> <b>ETNLDSLPLVDTHSK</b>			
07	47.5/49	7.1/7.15	608.11 (2+) 673.03 (3+) 734.53 (2+) 576.01 (2+) 525.57 (3+) 709.54 (2+) 478.62 (2+) 735.06 (2+) 698.01 (2+) 608.08 (2+)	(2+) (3+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	41-51 92-109 199-211 221-230 231-244 232-244 254-261 262-274 378-392 393-403	<b>ISLNTLTLNVK</b> <b>TEAEIAHIALETLEGHQR</b> <b>VSAQYLSEIEMAK</b> <b>AAYDIEVNTR</b> <b>RAQADLAYQLQVAK</b> <b>AQADLAYQLQVAK</b> <b>VQVQVVER</b> <b>AQQVAVQEIEIAR</b> <b>ITLVSSGSGTMGAAK<sup>a</sup></b> <b>VTGEVLDILTR</b>	542	gi 5031699	flotillin 1
08	45.6/47	8.9/7.72	841.48 (2+) 656.90 (2+) 665.93 (2+) 542.36 (2+) 485.88 (2+) 806.95 (2+) 592.45 (2+) 495.30 (2+) 739.39 (2+) 436.85 (2+) 583.87 (2+) 720.91 (2+) 469.36 (2+) 851.12 (3+) 622.86 (2+) 743.48 (2+) 491.89 (2+) 531.37 (2+) 629.38 (2+)	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	4-19 7-19 20-33 34-42 43-51 90-104 105-116 151-160 173-186 237-243 251-259 274-286 287-295 301-325 331-341 342-353 356-364 370-378 379-389	<b>LQKQPLTSPGSVSPSR</b> <b>QPLTSPGSVSPSR</b> <b>DSSVPGSPSSIVAK</b> <b>MDNQVLGYK<sup>a</sup></b> <b>DLAIPKDK</b> <b>STSPPPSPEVWADSR</b> <b>SPGIISQASAPR</b> <b>ESVGGSPQTK</b> <b>FPAAQPPDPNQPAK</b> <b>QREELSK<sup>b</sup></b> <b>MILKEEMEK<sup>a</sup></b> <b>TPFHTSLHQGTSK</b> <b>SSSLPAYGR</b> <b>LQSTEFSPSGSETGSPGLQNGEGQR</b> <b>GNSLPCVLEQK</b> <b>IYPYEMLVVTNK<sup>a</sup></b> <b>TKLPPGVDR</b> <b>HLSAEDFSR</b> <b>VFAMSPPEFGK<sup>a</sup></b>	1101	gi 22654240	Dematin (Erythrocyte membrane protein band 4.9)
09	42.0/45	5.3/5.3	488.75 (2+) 599.78 (2+) 677.81 (2+) 652.13 (3+) 566.84 (2+) 589.33 (2+) 506.26 (3+)	(2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (3+)	19-28 51-61 51-62 96-113 197-206 316-326 360-372	<b>AGFAGDDAPR</b> <b>DSYVGDEAQSK</b> <b>DSYVGDEAQSKR</b> <b>VAPEEHPVLLTEAPLNPK</b> <b>GYSFTTTAER</b> <b>EITALAPSTMK<sup>a</sup></b> <b>QEYDESGPSIVHR</b>	312	gi 4501885	beta actin
10	39.7/44	8.3/7.75	717.90 (2+) 781.98 (2+) 470.77 (2+) 633.46 (3+) 666.95 (2+) 744.98 (2+) 601.71 (3+) 745.88 (2+) 549.69 (3+) 671.88 (2+) 486.41 (2+) 758.22 (3+) 382.34 (2+) 401.41 (2+) 547.36 (2+) 566.89 (2+)	(2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+)	2-13 2-14 15-22 23-42 29-42 29-43 43-57 44-56 44-57 88-99 102-111 112-134 209-215 305-312 323-331 332-342	<b>PYQYPALTPEQK</b> <b>PYQYPALTPEQKK</b> <b>ELSDIAHR</b> <b>IVAPGKGILAADESTGSIK</b> <b>GILAADESTGSIK</b> <b>GILAADESTGSIKRR</b> <b>RLQSIGTENTEENRR</b> <b>LQSIGTENTEENR</b> <b>LQSIGTENTEENRR</b> <b>ADDGRPFQVIK</b> <b>GGVVGIKVDK</b> <b>GVVPLAGTNGETTTQGLDGLSER</b> <b>VLAAYVK</b> <b>ALQASALK</b> <b>AAQEYVVKR</b> <b>ALANSLACQK</b>	889	gi 28614	aldolase A
11	34.8/39	7.1/7.12	552.37 (2+) 557.41 (2+) 621.41 (2+) 379.86 (2+) 402.29 (2+) 474.84 (2+) 643.46 (2+) 574.34 (2+) 544.67 (3+)	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (3+)	7-17 22-32 22-33 33-39 76-83 173-180 181-191 197-205 197-210	<b>TIGIIGAPFSK</b> <b>GGVEEGPTVLR</b> <b>GGVEEGPTVLRK</b> <b>KAGLLEK</b> <b>ASEQLAGK</b> <b>DIVYIGLR</b> <b>DVDPGEHYLK</b> <b>YFSMTEVDR</b> <b>YFSMTEVDRLGIGK<sup>a</sup></b>	637	gi 178995	arginase

			713.92 679.47 416.31 811.43	(2+) (2+) (2+) (2+)	211-222 256-266 285-291 309-322	VMEETLSYLLGR EGLYITEEIIYK TPEEVTR EGNHKPIDYLNPPK			
12	40.6/42	5.0/4.5	575.87 675.11 607.36 496.03 807.44 454.35 769.35 636.76 861.95 607.43 669.35 584.03 741.37 569.43	(2+) (3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+)	82-91 190-206 197-206 215-227 215-228 228-235 236-249 236-252 272-286 287-297 315-325 326-340 328-340 344-354	EDLV <sup>a</sup> PYTGEK IKNNDPKLEEVN <sup>a</sup> LNNIR LEEVN <sup>a</sup> LNNIR AYAEALKENS <sup>a</sup> YVVK AYAEALKENS <sup>a</sup> YVKK KFSIVGTR SNDPVAYALAE <sup>a</sup> MLK SNDPVAYALAE <sup>a</sup> MLKENK LVEALPYNTSLVEMK IDNQSQPLGNK FGYHFTQQGPR LRASNAM <sup>a</sup> MNNNDLVR ASNAM <sup>a</sup> MNNNDLVR LADLTGPIPK	748	gi 4507553	tropomodulin 1
13	36.2/37	8.2/7.6	403.56 807.57 681.04 748.83 917.96 870.94 397.94 766.26 600.99 665.43	(2+) (2+) (3+) (3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+)	6-13 67-80 67-84 119-139 146-162 163-186 228-234 235-248 324-334 324-335	VG <sup>a</sup> VNGFGR LVINGNPITIFQER LVINGNPITIFQERDPSK VIISAPSADAP <sup>a</sup> MFV <sup>a</sup> MGVNHEK IISNASCTTNCLAPLAK VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK LTGMAFR VPTANVSVDLTCR VVDLMAHMASK VVDLMAHMASKE	549	gi 31645	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
14	31.9/29	7.7/6.32	458.39 631.46 731.89 624.36 676.47	(2+) (1+) (2+) (2+) (2+)	145-152 153-158 219-232 221-232 252-263	LLAQTTLR NVLGTK AKVIAAEGEMNASR VIAAEGEMNASR YLQTLTTIAAEK	271	gi 14715077	Stomatin
15	8.6/15	6.7/5.83	870.86 770.31	(2+) (2+)	1-14 42-53	LQCYNCPNPTADCK FEHCNFDVTR	119	gi 515118	Human Complement Regulatory Protein Cd59
16	16.0/14	7.9/7.54	476.85 480.34 628.89 635.34 729.41 575.38 725.46	(2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+)	1-8 9-17 18-30 117-132 121-132 133-144 133-146	VHLTPEEK TAVNALWGK VNVDAVGG <sup>a</sup> EALGR NFGKEFTPQM <sup>a</sup> QAAYQK EFTPQM <sup>a</sup> QAAYQK VVAGVANALAHK VVAGVANALAHKYH	361	gi 229172	hemoglobin delta
17	15.3/14	8.7/8.1	586.35 765.35 544.27 611.99 544.35 626.86	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	2-12 18-32 33-41 42-57 92-100 129-140	VLSPADKTNVK VGAHAGEYGAEALER MFLSFPTTK TYFPFDLSHGSAQVK LRVDPVNFK FLASVSTVLTSK	353	gi 22671717	hemoglobin alpha-2

Lo Spot ID si riferisce alla figura 4.3 A

<sup>a</sup> peptide con ossidazione della metionina (M)

<sup>b</sup> peptide with Pyro-glu modification from glutamine (Q)



			679.05 626.34 635.41 600.38 529.37 552.21	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	73-90 80-90 94-104 239-248 259-268 312-321	VNILDKSYEDPTNIQGG SYEDPTNIQGG HQSLAEVQTK QNEVNAAWER <sup>b</sup> ALSNAANLQR NLAVMSDKVK			
23	47.5/49	7.1/6.75	485.87 703.49 920.04 562.36 442.88 828.45 734.92 575.84 640.39 576.35 787.96 709.94 478.89 735.46 542.64 810.39 689.92 546.32 552.83 690.41 608.41 415.36 550.71	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	19-28 59-72 110-124 125-133 127-133 153-166 199-211 212-220 220-230 221-230 231-244 232-244 254-261 262-274 262-275 303-317 318-330 320-330 331-340 378-392 393-403 404-410 411-425	SPPVMVAGGR HGVPISVTGIAQVK AIMAHMTVEEIKDR <sup>a</sup> QKFSEQVFK <sup>b</sup> FSEQVFK DIHDDQDYLHSLGK VSAQYLSEIEMAK AQRDYELKK KAAYDIEVNTR AAYDIEVNTR RAQADLAYQLQVAK AQADLAYQLQVAK VQVQVVER AQQVAVQEIEAR AQQVAVQEIEARR SQLIMQAEAEAAASVR <sup>a</sup> MRGEAEFAIGAR GEAEFAIGAR ARAEAEQMAK ITLVSSSGTGMGAAK VTGEVLDILTR LPESVER LTGVSISQVNHKPLR	1622	gi 5031699	flotillin 1
24	47.5/49	7.1/7.55	485.83 380.98 442.88 734.95 640.89 576.36 709.96 623.40 478.85 735.46 690.00 546.32 698.43	(2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	19-28 125-133 127-133 199-211 220-230 221-230 232-244 247-261 254-261 262-274 318-330 320-330 378-392	SPPVMVAGGR QKFSEQVFK FSEQVFK VSAQYLSEIEMAK KAAYDIEVNTR AAYDIEVNTR AQADLAYQLQVAK QQIEEQRVQVQVVER VQVQVVER AQQVAVQEIEAR MRGEAEFAIGAR GEAEFAIGAR ITLVSSSGTGMGAAK <sup>a</sup>	816	gi 5031699	flotillin 1
25	78.9/47	5.3/5.95	616.90 718.92 550.37 616.98 499.32 380.64	(2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+)	78-88 174-187 188-197 289-305 371-378 379-384	GNSSNIWALR GVSCSEVTASSLIK VNILGEVVEK NHGVVALGDTVEEAFYK MLDNLGYR <sup>a</sup> TGYTYR	273	gi 34785151	ADD2 protein
26	77.7/48	8.3/6.08	676.35 747.66 544.33	(2+) (3+) (2+)	288-301 302-320 555-563	VVTFASAQGTGGR LLIDEYNEEGLQNGEQR NPPENTFLR	252	gi 112798	Erythrocyte membrane protein band 4.2
27	39.7/44	8.3/7.46	717.90 781.94 470.86 666.96 744.97 549.71 672.44 758.04 382.35 401.37 547.34 566.88	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+)	2-13 2-14 15-22 29-42 29-43 44-57 88-99 112-134 209-215 305-312 323-331 332-342	PYQYPALTPEQK PYQYPALTPEQKK ELSDIAHR GILAADESTGSIK GILAADESTGSIKAKR LQSIGTENTEENRR ADDGRPPFQVIK GVVPLAGTNGETTTQGLDGLSER VLAAYYK ALQASALK AAQEEYVVKR ALANSLACQGG	677	gi 28614	aldolase A
28	39.7/44	8.3/7.53	667.24 523.00 703.33	(2+) (2+) (3+)	29-42 61-69 154-173	GILAADESTGSIK QLLLTADDR IGEHTPSALAIMENANVLAR	161	gi 28614	aldolase A
29	34.8/39	7.1/6.94	552.40 557.35 621.39 379.83 587.93 643.35 582.31	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	7-17 22-32 22-33 33-39 72-83 181-191 197-205	TIGHGAPFSK GGVEEGPTVLR GGVEEGPTVLRK KAGLLEK SVGKASEQLAGK DVPDPEHYILK YFMSMTEVDR <sup>a</sup>	434	gi 178995	arginase

			416.29 811.47	(2+) (2+)	285-291 309-322	<b>TPEEVTR</b> <b>EGNHKPIDYLNPPK</b>			
30	281.0/43	4.9/4.75	585.67 556.33 623.34 784.78 621.34 563.88 710.40 788.45 734.42 865.97 544.83 693.67 495.30 557.83	(3+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+)	2080-2094 2133-2141 2133-2147 2133-2151 2142-2151 2178-2187 2188-2200 2188-2201 2252-2263 2267-2281 2282-2290 2302-2318 2322-2330 2369-2377	<b>QLQKDHEDFLASLAR<sup>b</sup></b> <b>HLSDIIEER</b> <b>HLSDIIEEREQELQK</b> <b>HLSDIIEEREQELQKEEAR</b> <b>EQELQKEEAR</b> <b>AYFLDGSLLK</b> <b>ETGTLESQLEANK</b> <b>ETGTLESQLEANKR</b> <b>MQHNLEQQIQAK</b> <b>GVSEETLKEFSTIYK</b> <b>HFDENLTGR</b> <b>GLNYLPMVEEDEHEPK</b> <b>FLDAVDPGR</b> <b>SYITKEDMK</b>	773	gi 115298659	spectrin alpha
31	42.6/42	4.4/4.29	805.94 751.11 782.43 681.48 733.94 745.95 938.97 475.28 728.94 527.81	(2+) (3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	57-69 57-74 139-150 161-180 220-233 234-246 247-263 284-292 293-304 296-304	<b>VYVELQELVMDEK<sup>a</sup></b> <b>VYVELQELVMDEKNQELR<sup>a</sup></b> <b>FIFEDQIRPQDR</b> <b>HSHAGELEALGGVKPAVLTR</b> <b>IPPDSEATLVLVGR</b> <b>ADFLEQPVLFVGR</b> <b>LQEAAELEAVELPVPIR</b> <b>AAATLMSER</b> <b>VFRIDAYMAQSR</b> <b>IDAYMAQSR</b>	745	gi 14277739	Cytoplasmic Domain of Human Erythrocyte Band-3 Protein
32	42.6/31	4.4/4.1	751.12 681.66 733.95 745.93	(3+) (3+) (2+) (2+)	57-74 161-180 220-233 234-246	<b>VYVELQELVMDEKNQELR<sup>a</sup></b> <b>HSHAGELEALGGVKPAVLTR</b> <b>IPPDSEATLVLVGR</b> <b>ADFLEQPVLFVGR</b>	270	gi 14277739	Cytoplasmic Domain of Human Erythrocyte Band-3 Protein
33	70.2/25	6.3/6.00	337.24 379.77 700.41 636.96 581.85	(2+) (2+) (2+) (3+) (2+)	23-28 102-108 146-157 167-183 184-193	<b>GQDLLK</b> <b>QDIVAGR</b> <b>LAPNQTKELEEK</b> <b>SMTPAQADLEFLENAKK<sup>a</sup></b> <b>LSMYGVDLHK</b>	197	gi 110430928	EPB41 protein
34	36.2/20	8.2/8.9	403.71 807.64	(2+) (2+)	6-13 67-80	<b>VGVDGFGFR<sup>c</sup></b> <b>LVINGNPITIFQER</b>	136	gi 31645	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
35	77.7/21	8.3/6.03	544.31 477.67	(2+) (3+)	555-563 652-663	<b>NPPENTFLR</b> <b>FQFTPTHVGLQR</b>	96	gi 112798	Erythrocyte membrane protein band 4.2
36	77.7/17	8.3/6.37	544.34 669.84 715.94 536.81	(2+) (2+) (2+) (2+)	555-563 641-651 652-663 681-691	<b>NPPENTFLR</b> <b>SVWPENTMCAK<sup>a</sup></b> <b>FQFTPTHVGLQR</b> <b>SVTVVAPELSA</b>	217	gi 112798	Erythrocyte membrane protein band 4.2
37	77.7/17	8.3/6.21	544.37 440.70 715.92	(2+) (2+) (2+)	555-563 629-635 652-663	<b>NPPENTFLR</b> <b>GLIHRER</b> <b>FQFTPTHVGLQR</b>	169	gi 112798	Erythrocyte membrane protein band 4.2
38	15.9/14	6.8/6.4	657.89	(2+)	18-30	<b>VNVDEVGGGEALGR</b>	81	gi 56749856	Hemoglobin subunit beta

Lo Spot ID si riferisce alla figura 4.3 A

<sup>a</sup> peptide con ossidazione della metionina (M)

<sup>b</sup> peptide with Pyro-glu modification from glutamine (Q)

**Tabella 3.** Proteine identificate attraverso analisi MS/MS degli spots della mappa in figura 4.3 C. Tutti gli spots identificati erano presenti in tutte e 5 le mappe replica.

SPOT	Mr, kDa theor./exp.	pI predict./exp.	Peptides identified by MS/MS				Mascot Score	NCBI Accession Number	Protein ID [Homo sapiens]
			m/z	charge state	start-end	sequence			
39	247.1/280	5.15/5.10	436.84	(2+)	1249-1255	VQLIEDR	1278	gi 67782319	spectrin beta
			748.93	(2+)	1294-1306	LLTSQDVSYDEAR			
			602.89	(2+)	1360-1369	LWDELQATTK			
			702.37	(2+)	1404-1416	SDDPGKDLTSVNR			
			557.87	(2+)	1423-1431	RVEDQVNVNR			
			586.65	(2+)	1460-1469	FLDLLEPLGR			
			767.43	(2+)	1486-1497	DLEDETLWVEER			
			810.98	(2+)	1520-1533	NQTLQNEILGHTPR			
			599.84	(2+)	1559-1568	LGHQLQSSWDR			
			888.53	(2+)	1647-1663	AQGILLSAGHPEGEQIIR			
			719.45	(3+)	1664-1682	LQGQVDKHYAGLKDVAEER			
			746.93	(2+)	1698-1709	ETDDLEQWISEK			
			754.13	(3+)	1710-1729	ELVASPOTEMGQDFDHVTLLR <sup>a</sup>			
			480.84	(2+)	1738-1746	ETGAIGQER			
			706.76	(3+)	1738-1756	ETGAIGQERVDNVNAFIER			
			588.86	(2+)	1747-1756	VDNVNAFIER			
			709.35	(2+)	1790-1801	MQLLAASYDLHR			
			490.84	(2+)	1862-1870	LQTAYAGEK			
			647.42	(2+)	1897-1907	TQLVDTADKFR			
			568.89	(2+)	1934-1943	DVSSVELLMK <sup>a</sup>			
			715.89	(2+)	1944-1955	YHQGINAEIETR			
			649.85	(2+)	2007-2016	MLLEVCQFSR <sup>a</sup>			
			454.34	(2+)	2057-2064	STASWAER			
			730.47	(2+)	2065-2077	FAALEKPTTLELK			
			827.95	(2+)	1420-1424	SDDKSSLDLSLEALMK <sup>a</sup>	1304	gi 115298659	spectrin alpha
			570.90	(2+)	1484-1493	ALKAQLIDER			
			648.83	(2+)	1541-1551	HQTFAEVDGR			
			564.41	(2+)	1744-1753	DLQGVQNLLK			
			607.41	(2+)	1783-1793	AAVGQEEIQLR			
			643.91	(2+)	1794-1803	LAQFVEHWEK			
			556.62	(3+)	1861-1874	HEALENDFAVHETR			
			794.43	(2+)	1875-1888	VQNVCAQGEDILNK			
			809.95	(2+)	1889-1902	VLQEEQNKEISSK			
			707.44	(2+)	1903-1915	IEALNEKTPSLAK			
			883.35	(2+)	1970-1984	QDTLDASLQSFQQR			
			586.45	(2+)	1985-1994	LPEITDLKDK			
			719.94	(2+)	2017-2028	WEQLLEASAVHR			
			653.59	(2+)	2041-2051	AEDLFVEFAHK			
			637.38	(2+)	2084-2094	DHEDFLASLAR			
			629.94	(2+)	2101-2110	CLELDQQIK			
			563.84	(2+)	2178-2187	AYFLDGSLLK			
			734.37	(2+)	2252-2263	MQHNLEQQIQAK			
			544.83	(2+)	2282-2290	HFDENLTGR			
			495.36	(2+)	2322-2330	FLDAVDPGR			
			854.95	(2+)	2353-2368	SSDEIENAFQALAEK			
			565.85	(2+)	2369-2377	SYTKEDMK <sup>a</sup>			
			40	247.1/150	5.15/4.91	436.82			
494.37	(2+)	1263-1271				AQEASVLLR			
748.92	(2+)	1294-1306				LLTSQDVSYDEAR			
602.90	(2+)	1360-1369				LWDELQATTK			
702.43	(2+)	1404-1416				SDDPGKDLTSVNR			
557.54	(2+)	1423-1431				RVEDQVNVNR			
586.97	(2+)	1460-1469				FLDLLEPLGR			
810.54	(2+)	1520-1533				NQTLQNEILGHTPR			
599.85	(2+)	1559-1568				LGHQLQSSWDR			
888.53	(2+)	1647-1663				AQGILLSAGHPEGEQIIR			
719.42	(3+)	1664-1682				LQGQVDKHYAGLKDVAEER			
588.88	(2+)	1747-1756				VDNVNAFIER			
647.41	(2+)	1897-1907				TQLVDTADKFR			
568.89	(2+)	1934-1943				DVSSVELLMK <sup>a</sup>			

			715.92 454.30 730.49	(2+) (2+) (2+)	1944-1955 2057-2064 2065-2077	<b>YHQGINAEIETR</b> <b>STASWAER</b> <b>FAALEKPTTLELK</b>			
41	207.1/45	5.82/7.42	540.48 524.03 654.93 612.03 480.98 897.67 699.52 535.66	(2+) (2+) (3+) (3+) (2+) (2+) (3+) (3+)	9-18 68-76 77-95 78-95 174-182 188-204 229-248 287-301	<b>EADAATSFLR</b> <b>EIILETTTK</b> <b>KGNTALHIAALAGQDEVVR</b> <b>GNTALHIAALAGQDEVVR</b> <b>LPALHIAAR</b> <b>TAAVLLQNDPNPDVLSK</b> <b>GSSVNFTPQNGITPLHIASR</b> <b>ISEILLDHGAPIQAK</b>	378	gi 178646	Ankyrin
42	45.6/41	8.9/7.57	485.87 807.44 592.45 788.41 495.32 739.36 436.85 583.86 670.41 720.91 469.37 491.89 531.38 621.41	(2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	43-51 90-104 105-116 123-142 151-160 173-186 237-243 251-259 269-286 274-286 287-295 356-364 370-378 379-389	<b>DLAaipKDK</b> <b>STSPPPSPEVWADSR</b> <b>SPGIISQASAPR</b> <b>TSLPHFHHPETSRPDSNIYK</b> <b>ESVGGSPQTK</b> <b>FPAAQPPDPNPAK</b> <b>QREELSK<sup>b</sup></b> <b>MILKEEMEK<sup>a</sup></b> <b>SLPDRTPFHTSLHQGTSK</b> <b>TPFHTSLHQGTSK</b> <b>SSSLPAYGR</b> <b>TKLPPGVDR</b> <b>HLSAEDFSR</b> <b>VFAMSPPEFGK</b>	674	gi 22654240	Dematin (Erythrocyte membrane protein band 4.9)
43	36.2/33	8.2/6.84	749.11 917.46 871.00 706.50 406.28 765.98 724.46 882.47 617.32 665.95	(3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	119-139 146-162 198-215 201-215 228-234 235-248 249-260 310-323 324-334 324-335	<b>VIISAPSADAPMFVMGVNHEK<sup>a</sup></b> <b>IISNASCTNCLAPLAK</b> <b>DGRGALQNIIPASTGAAK</b> <b>GALQNIIPASTGAAK</b> <b>LTGM<sup>a</sup>AFR<sup>a</sup></b> <b>VPTANVSVVDLTCR</b> <b>LEKPAKYDDIKK</b> <b>LISWYDNEFGYSNR</b> <b>VVDLMAHMASK<sup>a</sup></b> <b>VVDLMAHMASKE</b>	567	gi 31645	glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase
44	70.2/28	6.3/6.21	700.45 379.26 637.35 589.87	(2+) (2+) (3+) (2+)	146-157 158-163 167-183 184-193	<b>LAPNQTKELEEK</b> <b>VMELHK</b> <b>SMTPAQADLEFLENACK<sup>a</sup></b> <b>LSMYGVDLHK<sup>a</sup></b>	141	gi 110430928	EPB41 protein
45	45.6/31	8.9/7.71	469.22 491.81 531.30	(2+) (2+) (2+)	287-295 356-364 370-378	<b>SSSLPAYGR</b> <b>TKLPPGVDR</b> <b>HLSAEDFSR</b>	123	gi 22654240	dematin (Erythrocyte membrane protein band 4.9)
46	42.0/28	5.3/5.79	566.84 581.36 750.39	(2+) (2+) (2+)	197-206 316-326 360-372	<b>GYSFTTTAER</b> <b>EITALAPSTMK</b> <b>QEYDESGPSIVHR<sup>b</sup></b>	225	gi 4501885	beta actin
47	40.6/27	5.0/8.89	675.11 607.36 496.03 807.44 454.35 769.35 636.76 861.95 669.35 584.03 741.37 569.46	(3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+)	190-206 197-206 215-227 215-228 228-235 236-249 236-252 272-286 315-325 326-340 328-340 344-354	<b>IKNNDPKLEEVLNNIR</b> <b>LEEVLNNIR</b> <b>AYAEALKENSIVVK</b> <b>AYAEALKENSIVKK</b> <b>KFSIVGTR</b> <b>SNDPVAYALAEMLK<sup>a</sup></b> <b>SNDPVAYALAEMLKENK<sup>a</sup></b> <b>LVEALPYNTSLVEMK<sup>a</sup></b> <b>FGYHFTQQGPR</b> <b>LRASNAMMNNNDLVR<sup>a</sup></b> <b>ASNAMMNNNDLVR<sup>a</sup></b> <b>LADLTGPIPK</b>	668	gi 4507553	tropomodulin 1
48	44.4/26	5.6/6.69	509.73 457.73 515.88 565.43 436.97 795.46 731.40 604.43 570.35 809.00 697.94	(2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	47-60 48-60 51-60 100-109 102-109 110-124 111-124 155-164 165-173 202-216 217-228	<b>RLVKGPDPSPOTAFR</b> <b>LVKGPDPSPOTAFR</b> <b>GPDPSPOTAFR</b> <b>TRGTLALER</b> <b>GTLALER</b> <b>KDHSGQVFSVVSNGK</b> <b>DHSGQVFSVVSNGK</b> <b>SITLFVQEDR</b> <b>AQLYIDCEK</b> <b>GGVNDNFQGVLQNV</b> <b>FVFGTTPEDILR</b>	700	gi 538354	thrombospondin
49	70.2/24	6.3/5.15	885.01 583.41 659.93 700.44	(2+) (2+) (2+) (2+)	5-19 20-29 54-64 146-157	<b>VSLDDTVYECVVEK</b> <b>HAKGQDLLKR</b> <b>TWLDSAKEIKK</b> <b>LAPNQTKELEEK</b>	605	gi 110430928	EPB41 protein

			692.89 378.83 890.97 637.06 645.89 581.89	(2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+)	153-163 158-163 167-182 167-183 183-193 184-193	<b>ELEEKVMELHK</b> <b>VMELHK</b> <b>SMPAQADLEFLENAK</b> <b>SMPAQADLEFLENAKK</b> <b>KLSMYGVDLHK</b> <b>LSMYGVDLHK</b>			
50	42.6/21	4.4/4.69	806.02 751.16 782.47 681.46 475.29	(2+) (3+) (2+) (3+) (2+)	57-69 57-74 139-150 161-180 284-292	<b>VYVELQELVMDEK<sup>a</sup></b> <b>VYVELQELVMDEKNQELR<sup>a</sup></b> <b>FIFEDQIRPQDR</b> <b>HSHAGELEALGGVKPAVLTR</b> <b>AAATLMSER</b>	334	gi 14277739	Cytoplasmic Domain of Human Erythrocyte Band-3 Protein
51	247.1/20	5.15/7.75	490.86 573.70 647.43 681.82 560.94 715.89 549.22 649.52 454.36	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	1862-1870 1896-1905 1897-1907 1914-1924 1934-1943 1944-1955 1973-1981 2007-2016 2057-2064	<b>LQTAYAGEK</b> <b>RTQLVDTADK</b> <b>TQLVDTADKFR</b> <b>DLLSWMESIIR</b> <b>DVSSVELLMK</b> <b>YHQGINAEIETR</b> <b>QHQASEEIR</b> <b>MLLEVCQFSR<sup>a</sup></b> <b>STASWAER</b>	455	gi 67782319	spectrin beta
52	42.0/10	5.3/9.5	527.47 581.37 398.35 750.39	(2+) (2+) (2+) (2+)	313-326 316-326 329-335 360-372	<b>MQKEITALAPSTMK<sup>a</sup></b> <b>EITALAPSTMK</b> <b>IIAPPER</b> <b>QEYDESGPSIVHR<sup>b</sup></b>	177	gi 4501885	beta actin
53	70.2/24	6.3/6.3	659.69 379.74 700.40 589.89	(2+) (2+) (2+) (2+)	54-64 102-108 146-157 184-193	<b>TWLDSAKEIKK</b> <b>QDIVAGR</b> <b>LAPNQTKELEEK</b> <b>LSMYGVDLHK<sup>a</sup></b>	172	gi 110430928	EPB41 protein

Lo Spot ID si riferisce alla figura 4.3 B

<sup>a</sup> peptide con ossidazione della metionina (M)

<sup>b</sup> peptide con modificazione della glutamine con Pyro-glu (Q)

<sup>c</sup> peptide con deamidazione della asparagina

di deamidazione insieme a quello sulla asparagina 478, è stato già caratterizzato in passato da altri autori, ed è stato relazionato con l'età fisiologica degli eritrociti [80]. Ciò non deve stupire in quanto è ben documentato, sia in vivo che in vitro, che le proteine della membrana sono substrati preferenziali delle modificazioni post-traduzionali a carattere ossidativo che inducono l'invecchiamento dell'eritrocita. Nello specifico, sembra che la deamidazione dei residui di asparagina e l'isomerizzazione di residui di aspartato delle proteine banda 4.1, banda 4.2, anchirina e banda 3, siano tra le cause effettrici del danno molecolare indotto dall'azione radicalica [81]. Di nuovo le nostre analisi hanno identificato, per la prima volta, un sito di deamidazione sull'asparagina 9 della gliceraldeide-3-fosfato (spot 34 figura 2.5 B; tabella 2), relazionabile con lo stress ossidativo.

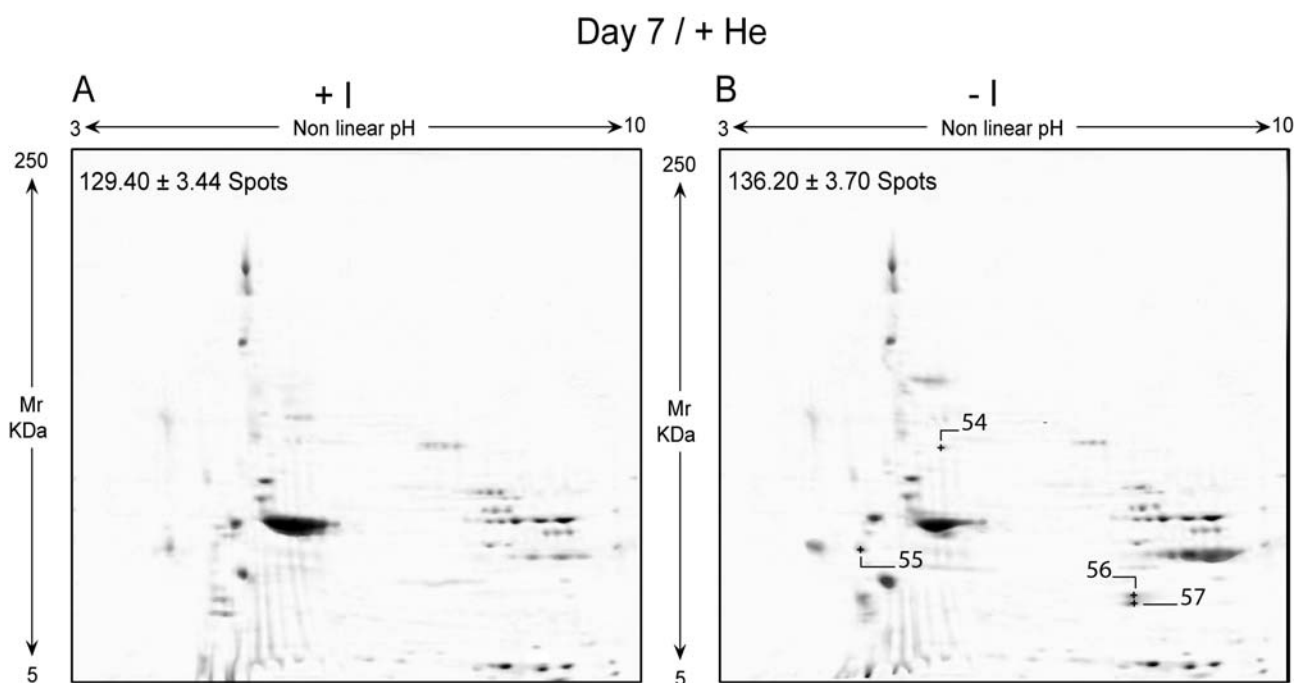
La mappa a 14 giorni (figura 2.5 C) mostra come l'alterazione del profilo elettroforetico risulta sempre più marcata con il passare del tempo di stoccaggio. Il raddoppio del tempo di conservazione comporta, rispetto alla mappa a 7 giorni, la comparsa di nuovi frammenti di degradazione e la formazione di aggregati multiproteici (tabella 3). Considerando le identificazioni dei nuovi spots, si deduce come il processo di degradazione della banda 4.1 continui inesorabilmente tra il settimo ed il quattordicesimo giorno (spot 44, 49 e 53). In più proteine che a 7 giorni non avevano ancora risentito dell'azione dei ROS, dopo 14 giorni sembrano frammentarsi. Ad esempio frammenti della  $\beta$ -actina sono stati identificati negli spots 46 e 52, così come per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot 43), l'anchirina (spot 41) e la banda 4.9 (spot 42 e 45). Per lo spot 39 il discorso è invece ben diverso. Tale spot pur avendo su gel una massa molecolare apparente di 280 kDa, è stato identificato sia come  $\alpha$  che  $\beta$ -spettrina, denotando così la presenza contemporanea di entrambe le specie proteiche nello spot. Considerando che nel gel a 0 giorni l' $\alpha$  e la  $\beta$ -spettrina mostravano una massa molecolare apparente rispettivamente di 241 e 217 kDa, l'unica interpretazione possibile del fenomeno può stare nell'ammettere l'esistenza di un aggregato multiproteico generato dalla formazione di *cross-linkages* covalenti tra frammenti di  $\alpha$ -spettrina e frammenti di  $\beta$ -spettrina. Tale tesi è sostenuta da vari autori [82-84], che già in passato hanno dimostrato la formazione di *cross-linkages* a seguito di un attacco ossidativo, per le specie anchirina, actina, banda 3, banda 4.1 e glicoforina. Sempre su tale linea

Caprai et al. [85] dimostrarono che il *terz*-butil-idroperossido (t-BHP) è in grado di indurre seri danni alle proteine del citoscheletro membranale, sia attraverso la parziale frammentazione delle molecole di anchirina e spettрина, sia mediante la formazione simultanea di aggregati multiproteici ad alto peso molecolare (HMWA) e sia attraverso un incremento del legame della globina al doppio strato fosfolipidico. La frammentazione della spettрина e il suo coinvolgimento nella formazione di HMWA, comporta lo stravolgimento di quella struttura tetramerica che costituisce le fondamenta del citoscheletro membranale della cellula eritrocitaria [85]. Il coinvolgimento della spettрина induce anche lo smantellamento delle giunzioni spettрина-actina-banda 4.1 del citoscheletro, ed è correlato con un declino del contenuto fosfolipidico membranale seguito a sua volta da un processo di vescicolazione che induce una riduzione della superficie cellulare. La comparsa di HMWA dopo 14 giorni, induce a pensare che la formazione di HMWA sia un fenomeno secondario che diviene più accentuato con l'allungarsi dei tempi di conservazione (vedi figura 2.3 C, 42 giorni). Questo conferma che l'aggregazione è un prodotto finale della degradazione ossidativa, seguito sempre da un riarrangiamento molecolare della struttura terziaria e quaternaria che induce una perdita di funzionalità del citoscheletro [86].

#### ***2.3.4. Entità dell'effetto delle proteasi nella degradazione proteica***

Per valutare l'entità del contributo delle proteasi nei processi di degenerazione strutturale e funzionale del citoscheletro membranale, si è deciso di impostare un esperimento in cui le preparazioni di stoccaggio sono state conservate creando nelle sacche un'atmosfera satura di elio. Con il fine di inibire qualsiasi processo di degradazione radicalica da parte di specie reattive dell'ossigeno, l'eliminazione dell'ossigeno è stata realizzata facendo gorgogliare dell'elio nei preparati sino a scomparsa completa di tutta l'ossi-emoglobina (valutata spettrometricamente). Una volta eliminato tutto l'ossigeno, per valutare l'entità dell'attacco proteolitico, si è deciso di aggiungere un cocktail di inibitori di proteasi, per poi valutarne gli effetti dell'aggiunta dopo 7 e 14 giorni di stoccaggio. La figura 2.6 compara la mappa 2D di proteine di membrana estratte da eritrociti conservati per 7 giorni in assenza di ossigeno e in presenza di inibitori di proteasi

(figura 2.6 A), con la mappa ottenuta da proteine conservate per 7 giorni in assenza di ossigeno (figura 2.6 B). Sulla base dell'impostazione sperimentale si capisce come la mappa in figura 2.6 A debba essere molto simile a quella del controllo (figura 2.4 A), infatti essa è il risultato di uno stoccaggio in cui sono stati inibiti entrambi i fenomeni degradativi. I risultati sperimentali sembrano confermare la nostra intuizione, infatti la mappa virtuale di figura 2.6 A ha un numero totale di spots pari a  $129.40 \pm 3.44$  che risulta differire di poco dal valore di  $126.60 \pm 3.44$  della mappa controllo (figura 2.4 A), mentre si discosta di molto rispetto al valore di  $161.00 \pm 4.85$  ottenuto dopo 7 giorni (figura 2.5 B). Questo dimostra la sicura compartecipazione di entrambi fenomeni al processo di frammentazione.



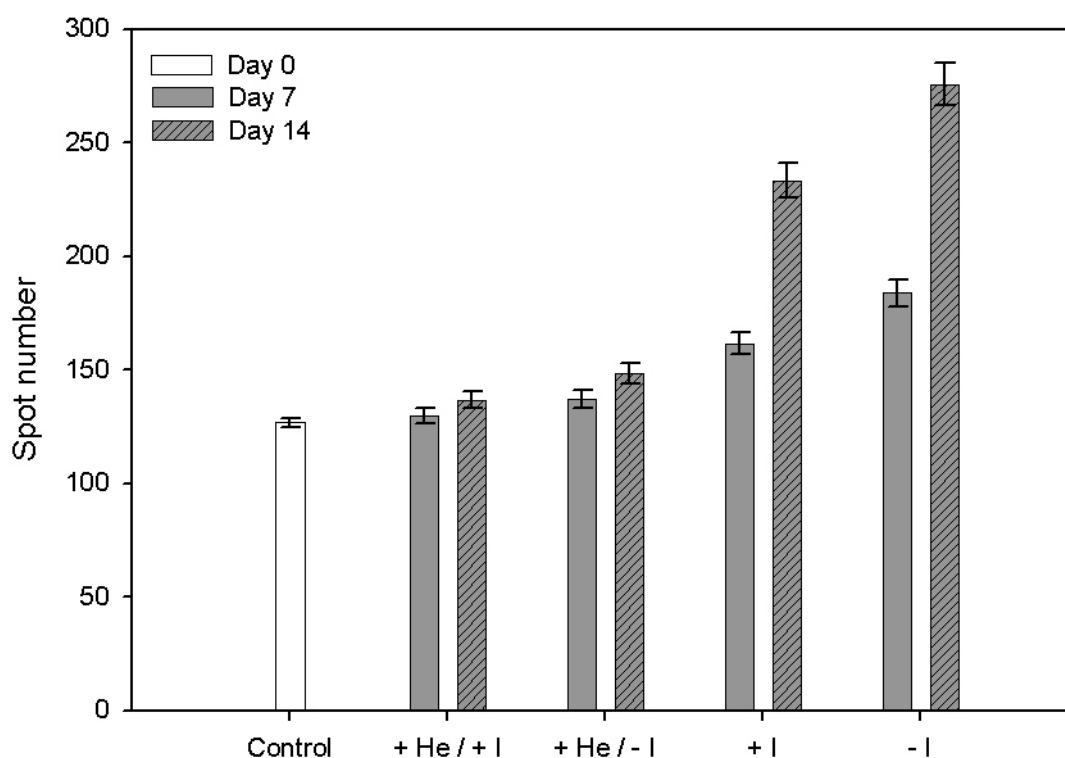
**Figura 2.6** Mappe elettroforetiche bidimensionali IEF-SDS-PAGE di proteine di membrana estratte da emazie dopo 7 giorni di stoccaggio in condizioni standard (SAG-M, 4 °C) con rimozione di ossigeno sia con aggiunta di inibitori di proteasi (1% v/v; A) che senza (B). Sulle mappe è riportato in numero di spots ottenuto dalla media aritmetica  $\pm$  la deviazione standard degli spots presenti nelle mappe delle 5 repliche biologiche. + He sta ad indicare che lo stoccaggio è avvenuto per entrambi i campioni in una atmosfera satura di elio. Le mappe sono state colorate con la tecnica del Blue Silver. Sono stati caricati 600  $\mu$ g di proteine per ogni mappa.

Entrando nel merito della figura 2.6 risulta invece chiaro come gli spots differenziali tra la mappa A e la mappa B siano la dimostrazione dell'azione delle proteasi. Si stanno infatti paragonando due mappe in cui nella prima (la A; 129.40

$\pm 3.44$  spots) sono stati inibiti sia il fenomeno di degradazione da ROS che quello da proteasi, e nella seconda (la B;  $136.20 \pm 3.70$  spots) si è inibito il solo processo di degradazione radicalica. Le due mappe differiscono per soli 7 spots, suggerendo che l'azione delle proteasi è generalmente poco marcata, almeno durante la prima settimana di conservazione. Quattro di questi spots sono stati analizzati mediante spettrometria di massa e identificati come frammenti della banda 3 (spots 54 e 55, figura 2.6 C), della gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (spot 56) e della banda 4.1 (spot 57). Tali identificazioni sembrerebbero dimostrare, in accordo con lavori precedenti [58, 59], che tali proteine siano tra le più sensibili all'attacco da parte di specie proteolitiche.

### ***2.3.5. Valutazione quantitativa del contributo dei fenomeni degenerativi***

La figura 2.7 compara graficamente il numero di spots (media aritmetica dei cinque replicati  $\pm$  SD) contati nelle mappe virtuali di tutti gli esperimenti riportati in figura 2.4. Si può ben vedere come vi sia una differenza significativa nel numero di spots, sia tra i vari esperimenti, che all'interno dello stesso esperimento per giorni di stoccaggio differenti. La differenza dopo 7 e 14 giorni di stoccaggio fornisce un dato significativo di facile interpretazione. Si vede infatti come essa tenda ad aumentare man mano che entra in gioco l'azione dell'ossigeno: è bassa quando agiscono solo le proteasi (+ He / -I), aumenta quando agisce solo l'ossigeno (+I), per poi crescere ancor più quando vi è l'azione contemporanea di proteasi e ossigeno (-I). Queste osservazioni dimostrano che la degradazione ossigeno-dipendente è più importante ed accentuata di quella proteasi-dipendente, e che l'azione contemporanea di entrambi i fenomeni, comporta in qualche modo un aumento sinergico della attività degradativa. Altro parametro importante è la deviazione standard (SD) dei 4 esperimenti: essa aumenta linearmente nell'ordine + He / +I > + He / -I > +I > -I. Considerando che per ogni esperimento sono stati realizzati 5 replicati "biologici" in 5 sacche separate, si deduce che tanto più alto è il valore della SD e tanto più il processo degenerativo è regolato da leggi casuali. In questo modo si dimostra che la degradazione radicalica da ROS è un processo degenerativo irreversibile più dannoso e casuale rispetto alla degradazione proteolitica, la quale a sua volta sembra essere in un qualche modo catalizzata

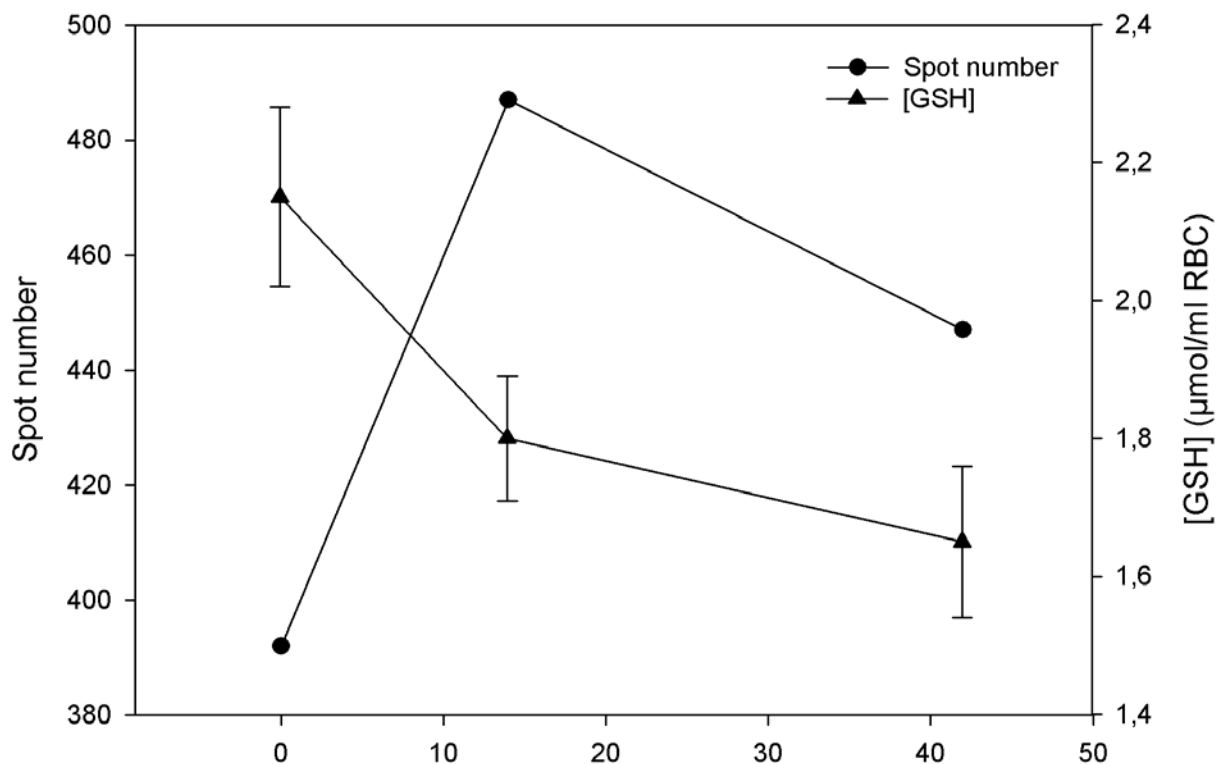


**Figura 2.7** Numero totale di spots contati nelle mappe 2D virtuali, ottenute dopo 7 o 14 giorni di stoccaggio, degli esperimenti condotti con o senza rimozione di ossigeno e con o senza aggiunta di inibitori di proteasi. È stato riportato il numero di spots ottenuto dalla media aritmetica  $\pm$  la deviazione standard degli spots presenti nelle mappe delle 5 repliche biologiche. Per il significato dei simboli vedere la figura 2.4.

dall'azione dei ROS. Questa affermazione sembra trovare conferma in alcuni lavori [70, 71] in cui è stato dimostrato che le proteasi caspasi 2 e 3 sono attive in eritrociti stressati ossidativamente. In questo scenario, i rimodellamenti indotti all'apparto fosfolipidico e proteico dall'azione dei ROS possono rendere le specie proteiche ossidate più sensibili all'attacco proteolitico. Così può essere ipotizzato che la frammentazione ossidativa inizi la degradazione proteica e che la degradazione proteolitica la completi.

L'attivazione di tale processo è contrastata, almeno durante la prima settimana di conservazione dalle scorte intracellulari di glutazione, che forse rappresenta l'unica efficace difesa antiossidativa della cellula eritrocitaria [51]. Utilizzando un metodo non distruttivo che non richiede l'isolamento del glutazione dalla cellula eritrocitaria [68], abbiamo pensato di comparare i livelli di glutazione intracellulare con il numero totale di spots delle mappe in figura 2.3 (figura 2.8). Dal grafico si vede

chiaramente come nel tempo vi sia un graduale decremento dei livelli di glutatione. Questo correla direttamente la diminuzione dell'efficacia delle difese antiossidanti della cellula con l'aumento del numero di spots sulle mappe 2D, ed è un'ulteriore dimostrazione indiretta del coinvolgimento dello stress ossidativo nei processi degradativi. Il reintegro di glutatione nelle sacche nel corso dei giorni di stoccaggio, così come ogni altro tentativo di "rinforzamento" delle difese antiossidanti della cellula eritrocitaria, non sembra poi proteggere più di tanto le membrane dall'ossidazione [52, 53].



**Figura 2.8** Comparazione nell'arco dei primi 42 giorni di stoccaggio, dei livelli di glutatione rivelati nella cellula eritrocitaria e del numero di spots rivelati in figura 2.3. La concentrazione del glutatione è espressa in micromoli per millilitro.

### 2.3.6. Conclusioni

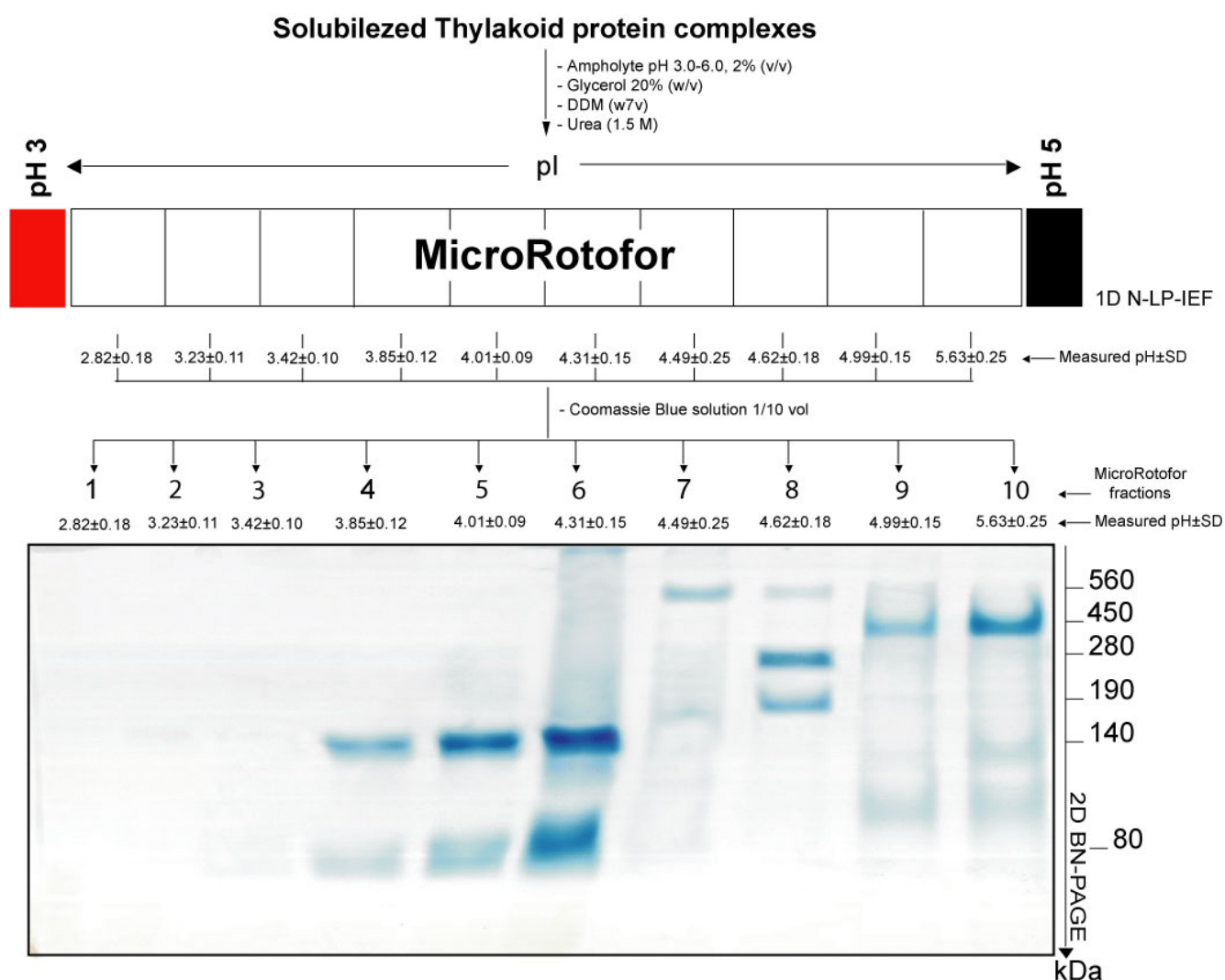
La nostra investigazione fornisce per la prima volta una panoramica dei cambiamenti subiti dalla componente proteica della membrana cellulare eritrocitaria durante lo stoccaggio del sangue ad uso trasfusionale. Solo attraverso il sapiente uso

della spettrometria di massa è stato possibile riconoscere, in quelli che apparentemente sembravano dei nuovi spots, delle forme troncate o aggregati di proteine native. Le specie radicaliche dell'ossigeno prodotte a partire dall'ossiemoglobina, attraverso l'iniziale ossidazione delle catene laterali di specifici amminoacidi inducono, fenomeni di frammentazione e/o aggregazione proteica, i quali, a loro volta, sono responsabili delle ben note alterazioni morfologiche che generano la perdita di funzionalità della cellula eritrocitaria. In linea con il lavoro di Yoshida et al. [87] i nostri esperimenti hanno dimostrato che la rimozione dell'ossigeno è una via di limitazione alle lesioni ossidative più efficace, rispetto all'aggiunta di qualsiasi additivo chimico. Teoricamente l'uso dell'elio potrebbe essere sostituito da gas meno costosi come l'azoto. In quest'ultimo caso però la possibile presenza di contaminazioni da ossido nitrico potrebbero generare dei perossinitrili in grado di attaccare le specie proteiche. A supporto di tale tesi, recentemente è stato documentato [71] che i perossinitrili possono accelerare la senescenza e indurre l'apoptosi delle cellule eritrocitaria.

Questo studio ha comunque dimostrato che l'azione delle proteasi induce delle alterazioni minime paragonate ai cambiamenti indotti dall'attacco dei ROS. Quindi l'aggiunta di inibitori di proteasi è da evitare nei protocolli di conservazione, soprattutto perché non se ne conoscono gli effetti secondari sulla disponibilità e sulla funzionalità degli eritrociti. Al contrario, è bene eseguire la pratica della leucofiltrazione, dato che è ben noto che la presenza di leucociti durante lo stoccaggio degli eritrociti, accelera la senescenza di quest'ultimi contribuendo significativamente ai processi di storage lesions [50]. In conclusione, a nostro avviso, la migliore metodica di stoccaggio è quella che prevede la conservazione in atmosfera priva di ossigeno di preparati eritrocitari leucofiltrati.

CAPITOLO 3

**ACCOPPIAMENTO DI IEF NATIVA IN FASE LIQUIDA CON BN-PAGE: UN NUOVO ESEMPIO DI ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE NATIVA PER LA SEPARAZIONE DI COMPLESSI MULTIPROTEICI DI MEMBRANA**



## SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un nuovo sistema elettroforetico bidimensionale applicabile a complessi multiproteici, con il fine di caratterizzare sia il complesso nella sua funzionalità che nelle sue componenti. L'originalità del protocollo proposto sta nel fatto che per la prima volta i complessi sono stati separati sia sulla base del loro punto isoelettrico, che sulla base del loro peso molecolare mantenendo integra la loro conformazione nativa. Alle due dimensioni native è stata fatta poi seguire una terza dimensione denaturante, la quale ha permesso lo studio delle subunità proteiche costituenti i complessi.

L'interesse verso questo tipo d'analisi nasce dalle difficoltà generali riportate in letteratura nello studio delle proteine di membrana ed in particolare da quelle inerenti alla possibilità di separare le proteine, più propriamente i complessi proteici, nella loro forma nativa. L'utilità di un approccio di questo tipo viene giustificata dalle considerazioni sull'importanza delle proteine di membrana nel mondo biologico e dal loro ruolo centrale di sistema di interfaccia tra ambiente esterno e cellulare. Molti processi cellulari richiedono l'azione di diversi enzimi, spesso ciascuno contenente molte subunità. Per raggiungere efficienza, specificità, velocità dei pathways metabolici, questi enzimi sono spesso associati l'uno con l'altro, formando stabili o temporanei complessi proteici. Ottenere complessi proteici di membrana nella loro forma nativa significa poter disporre di un valido strumento di analisi di partenza per studi strutturali e funzionali con possibili applicazioni in campo clinico. Clinicamente, infatti, disporre di proteine e complessi proteici in forma nativa ha ovvi vantaggi, come la possibilità di progettare nuovi farmaci sulla base delle informazioni strutturali ricavabili, oppure, è possibile studiare come le singole proteine si riorganizzano in situazioni diverse da quelle fisiologiche. Ad esempio, nel mondo vegetale l'importanza di tali studi risiede nella possibilità di valutare i mutamenti dei complessi proteici in relazione a mutamenti ambientali, quali ad esempio possono essere i cambiamenti climatici degli ultimi decenni.

In questo lavoro di tesi come modello, nella messa a punto della metodica di un'elettroforesi bidimensionale nativa, sono stati presi in considerazione i complessi proteici delle membrane tilacoidali di *Spinacia oleracea*. La prima dimensione è stata un'isoelectrofocusing in fase liquida per la separazione in accordo al pI (punto isoelettrico) dei complessi proteici tilacoidali, interfacciata ad una seconda dimensione su gel di acrilamide (Blue Native Page) per separare i complessi in accordo alla loro massa molecolare apparente. Alle due dimensioni native si è fatta poi seguire una SDS-PAGE, tecnica questa che ha permesso la scissione dei complessi multiproteici nelle singole subunità proteiche costituenti. Il risultato è stata una analisi elettroforetica tridimensionale la 3D N-LP-IEF-BN-SDS-PAGE (three dimensional native – liquid – phase – isoelectric focusing - blue native - sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis).

## SEZIONE 3.1: INTRODUZIONE

### 3.1.1 *Importanza dello studio del proteoma nativo*

Ad oltre venti anni dalla sua nascita la Proteomica si è molto evoluta. Studiando la letteratura specializzata si capisce come nel corso degli anni si siano sviluppate diverse metodologie di analisi che possono essere definite di tipo proteomico. Ad oggi esistono molti validi esempi di lavori “proteomici”, ma tra tutti il più comune e datato è sicuramente quello che prevede la semplice identificazione di tutte le specie proteiche presenti in una cellula o in un qualsiasi organulo di essa. Questi lavori prevedono un *work-flow* molto semplice, di norma si inizia con il frazionamento e l'estrazione del campione, continuando poi con un'analisi elettroforetica bidimensionale IEF-SDS-PAGE, per poi chiudere con la digestione triptica e l'identificazione (tramite spettrometria di massa) del maggiore numero possibile di spots presenti nella mappa 2D ottenuta. Lo scopo quindi è quello di ottenere quanti più spots possibili da identificare e tutti i protocolli utilizzati saranno protesi in tal senso. Il risultato finale rimane comunque una “sterile” lista di specie proteiche, da cui l'unica informazione valida che si può estrapolare è che le proteine identificate sono presenti all'interno del campione di partenza. Tale approccio ad oggi tende quasi a scomparire, non tanto per la scarsa qualità delle informazioni fornite, quanto più perché è ormai molto difficile trovare degli organismi che non siano stati analizzati con tale metodologia di base. Più valido ed interessante è invece l'approccio differenziale, di cui ne è stato fornito un esempio nel capitolo 2. In questo caso lo studio valuta le variazioni indotte al proteoma di un campione biologico da un fattore esogeno al proteoma stesso, fattore che può essere ad esempio uno stress o un trattamento con una sostanza esogena. Le informazioni estrapolabili permettono di valutare differenze quantitative e/o qualitative tra i livelli di espressione proteica del campione controllo e del campione alterato. Ciò che si ottiene rimane comunque una lista di proteine che risultano presenti/assenti oppure sovra-espresse/sotto-espresse nel campione alterato. Se escludiamo l'informazione qualitativa/quantitativa capiamo come anche l'approccio differenziale non fornisca assolutamente alcun dato che aiuti a capire il modo in cui le diverse proteine tendano ad interagire tra loro.

La Proteomica “convenzionale” non rappresenta quindi un valido strumento per lo studio del modo in cui le differenti specie proteiche di un proteoma interagiscono nell’espletamento delle loro funzionalità biologiche. Dopo più di venti anni bisogna essere in grado di dare delle risposte più profonde che esulano dalla semplice identificazione proteica. La *Proteomica funzionale* nasce proprio con l’intento di colmare tale laguna. Essa rappresenta la forma più evoluta e completa della scienza del proteoma, in quanto non si limita ad una semplice caratterizzazione delle specie proteiche, ma si sforza anche di fornire una interpretazione valida di come queste interagiscano nell’organicità dei diversi *networks* biologici, compresi quelli delle membrane biologiche essenziali al mantenimento della vita cellulare. Sappiamo che nei *networks* di membrana spesso le specie proteiche interagiscono con delle interazioni non covalenti nel formare dei complessi multiproteici. Oltre ai complessi membranali, molti processi biologici richiedono l’intervento di enzimi multimerici costituiti dall’assemblamento di più subunità proteiche. La comprensione della struttura e del modo in cui le diverse subunità proteiche interagiscono nella formazione di tali complessi è logicamente essenziale per comprendere la funzionalità degli stessi. Si capisce come l’approccio denaturante classico della Proteomica convenzionale (basato sulla 2D IEF-SDS-PAGE) non possa essere di alcuna utilità per un’analisi di questo tipo. Per esempio considerando un sistema membranale si capisce come la solubilizzazione in un tampone per IEF (contenente agenti caotropici, riducenti ed alte concentrazioni di detergente) porti alla disgregazione dei complessi multiproteici. Ne consegue che sulla mappa 2D IEF-SDS-PAGE saranno presenti le singole componenti proteiche e sarà a quel punto persa la possibilità di ottenere informazioni valide sulla struttura e la funzionalità dei complessi nativi. L’approccio denaturante non è quindi in alcun modo idoneo per lo studio delle funzionalità di un proteoma, dato che, per un tale fine, bisogna necessariamente utilizzare delle tecniche che mantengano integri i complessi multiproteici. Questo significa che la Proteomica funzionale è rivolta allo studio di quello che può essere definito Proteoma nativo, terminologia con la quale si indica un proteoma integro e funzionante in cui i diversi complessi multiproteici che lo compongono sono intatti. Lo studio del Proteoma nativo porta quindi a comprendere come le diverse specie proteiche, inserite nel loro contesto cellulare

naturale, lavorino in modo cooperativo e sinergico nell'espletamento delle loro funzioni, parametri questi importantissimi per comprendere al meglio molti *pathways* metabolici e cellulari essenziali alla vita.

### **3.1.2 Principali metodi elettroforetici nativi: BN-GEL e CN-GEL**

Tecnicamente esistono diverse metodologie utilizzabili nell'analisi di un proteoma nativo, e ognuna ha i suoi vantaggi e i svantaggi [88]. Le tecniche più comuni (e vantaggiose) sono l'analisi con gradiente di saccarosio in ultracentrifuga, la cromatografia liquida per esclusione e l'elettroforesi. Quest'ultima tra tutte, per capacità risolutiva e semplicità d'esecuzione, rimane il metodo di elezione anche per lo studio del proteoma nativo. In questo caso si parlerà quindi di elettroforesi native, ovvero tecniche che permettono la separazione elettroforetica di specie proteiche nella loro conformazione nativa. Affinché ciò accada è importante evitare l'uso di agenti caotropici e riducenti durante le fasi di solubilizzazione del campione, mentre l'uso di detergenti (comunque non ionici o zwitterionici) è possibile solo in basse concentrazioni, tali da permettere la formazione delle micelle necessarie alla solubilizzazione dei complessi multiproteici senza ledere l'integrità degli stessi.

Il sistema di elettroforesi nativa che offre la maggiore capacità risolutiva è il BN-PAGE, protocollo proposto da Schägger et al [34] nel 1991 e di cui abbiamo già parlato precedentemente. Il Blue Native PAGE si è inizialmente sviluppato per l'analisi dei complessi della catena respiratoria del mitocondrio e ne permette la determinazione del peso molecolare mantenendo raggruppate le diverse subunità costituenti. Tale sistema è particolarmente indicato per lo studio di proteomi nativi membranali e realizza una separazione dei diversi complessi multiproteici semplicemente sfruttandone la massa molecolare apparente. Ciò è possibile grazie all'uso di un tensioattivo anfipatico non ionico (TritonX-100; DDM; digitonina) e di un colorante il Blue Brilliant Coomassie (BBC). Il detergente ha una doppia azione, da prima sfalda il doppio strato fosfolipidico membranale, per poi generare delle micelle che rendono solubili i complessi membranali nell'ambiente a base acquosa del tampone di solubilizzazione. Ottenuta la solubilizzazione avviene l'aggiunta del BBC che formando delle sfere cariche negativamente intorno ai

complessi, spiazza le molecole di detergente creando così le condizioni per subire quella forza elettrica che consente poi la migrazione dei complessi verso l'anodo nel gel di poliacrilamide [89]. Durante la migrazione elettroforetica i complessi mantengono la loro eventuale attività enzimatica, che può poi essere testata con degli opportuni saggi in gel. Questo eccellente sistema elettroforetico permette la separazione di complessi multiproteici nel range di massa tra i 10 KDa e i 10 MDa, inoltre, proprio per i principi su cui si basa, non risente di alcuna limitazione imposta dall'idrofobicità delle proteine e quindi risulta particolarmente indicato per l'analisi di specie proteiche altamente idrofobiche [90, 91]. La separazione dei complessi multiproteici può poi essere seguita da una seconda dimensione denaturante dove, a seguito dell'aggiunta dell'SDS, è possibile scindere i complessi nativi in tutte le loro componenti di base, ottenendo così un'analisi elettroforetica bidimensionale. La 2D BN-SDS-PAGE fornisce quindi un metodo analitico per la determinazione della massa molecolare e dello stato oligomerico dei complessi nativi, della composizione delle subunità e del grado di purezza e di rivelazione dei subcomplessi. Da un'analisi elettroforetica di questo tipo possono essere ottenute in una volta sola molte informazioni. Come dimostrato da un nostro lavoro sugli effetti della ferro deficienza in piante di Spinacio [92, vedi pubblicazioni], attraverso l'identificazione di tutte le bande presenti sul gel di prima dimensione si può conoscere la composizione del proteoma nativo analizzato; inoltre con una analisi densitometrica sulle bande del gel si possono valutare le variazioni quantitative/qualitative indotte sui complessi da uno stato di stress (proteomica differenziale nativa). L'analisi del gel di seconda dimensione permette invece di riconoscere una ad una tutte le specie proteiche costituenti i complessi multiproteici separati nel gel di prima dimensione. Inoltre la realizzazione di gels di seconda dimensione replicati permette una quantificazione della variazione dei livelli di espressione proteica come risposta ad uno stress. Dal 1991 ad oggi un numero sempre maggiore di pubblicazioni ha sfruttato con successo il BN gel per l'analisi di complessi multiproteici nella loro conformazione nativa.

Analogo al BN gel è il *Colorless-native* (CN) gel in cui la separazione delle specie multiproteiche avviene sempre e solo sulla base della massa molecolare apparente. Il CN-PAGE rappresenta una modifica del BN-PAGE, da cui si

differenza per l'assenza del CBB. In questo modo i complessi, migrano verso l'anodo unicamente sulla base della carica intrinseca nativa che possiedono a pH 7 (il valore del pH del gel e del tampone di estrazione). Quindi le uniche specie multiproteiche che possono essere separate in CN-PAGE sono quelle che hanno un pI nativo acido che a pH 7 conferisce loro una carica elettrica intrinseca negativa. Questo rende il CN-PAGE meno risolutivo e più restrittivo rispetto al BN-PAGE ma al tempo stesso sino ad oggi era l'unico metodo che permettesse una valutazione, seppur grossolana, del pI dei complessi nativi dato che la mobilità elettroforetica non è solo funzione della massa molecolare dei complessi ma anche dal pI degli stessi. Il metodo è stato applicato all'analisi del complesso del citocromo bc/bf di cuore bovino [93] combinando il CN-PAGE in prima dimensione con il BN-PAGE in seconda dimensione. Ciò ha reso possibile la separazione di complessi proteici di membrana altamente puri, mediante lo sviluppo di tecniche non dissocianti che sono state combinate per produrre sistemi elettroforetici bidimensionali altamente risolutivi. Il BN-PAGE e il CN-PAGE rappresentano quindi dei validi sistemi sia analitici sia preparativi, garantendo il mantenimento delle conformazioni native dei complessi.

Sfortunatamente, sia il BN-PAGE che il CN-PAGE, essendo delle tecniche elettroforetiche monodimensionale, hanno dei limiti che risiedono principalmente nella scarsa capacità risolutiva di complessi multiproteici con una massa molecolare apparente molto vicina [94, 95]. Per risolvere tale problema sono state proposte delle combinazioni di elettroforesi bidimensionali native sia in prima che in seconda dimensione. Lo stesso Schägger ha sfruttato in passato diverse combinazioni. È nata così la 2D BN/BN-PAGE (un doppio BN gel in cui una striscia di prima dimensione viene caricata ortogonalmente ad un BN gel di seconda dimensione) o un 2D CN/BN-PAGE (di cui si è accennato precedentemente). Questi "stratagemmi" non hanno comunque permesso di ottenere dei gel bidimensionali nativi che permettessero di risolvere il problema della comigrazione. In realtà il BN/BN-PAGE è ossia di quegli aggregati macromolecolari nati dall'interazione di più complessi multiproteici. I supercomplessi separati nella prima dimensione si dissociano in singoli complessi e sono rivelati sotto una diagonale permettendo di

determinare tramite quantificazione densitometrica, la composizione stechiometrica all'interno dei supercomplessi.

## SEZIONE 3.2: MATERIALI E METODI

### 3.2.1 Allestimento di colture idroponiche.

Per l'allestimento delle colture idroponiche di piante di spinacio (*Spinacia oleracea*) sono state preparate tre soluzioni: la soluzione A dei macroelementi (0.5 M  $K_2SO_4$ ; 1 M  $MgSO_4$ ; 0.01 M  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ; 0.08 M  $NaH_2PO_4$ ; 1 M  $KNO_3$ ), la soluzione B dei microelementi ( $H_3BO_3$  46mM;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  9.16mM;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.76mM;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.320mM;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  83 $\mu$ M), la soluzione C ferrosa (6.95 mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 10mM EDTA  $Na_2$ ). Sono stati contati circa 200 semi di *Spinacia oleracea*, sono stati sfregati al fine di favorirne la germinazione, posti a reidratare in un becker sotto agitazione magnetica e lavati con detergente per alcuni minuti. I semi sono stati in seguito lavati con acqua corrente al fine di allontanare il detergente per circa 10 minuti, poi lavati due volte in acqua distillata. I semi sono quindi stati posti per 15 minuti a lavare con NaOCl al 10%. Sono seguiti 10-15 lavaggi in acqua distillata.

I semi sono stati poi disposti, opportunamente distanziati, in camera umida per la germinazione e incubati al buio nel Seed Germinator (umidità 90%) per 3-4 giorni. Intorno al 5°giorno i semi germinati sono stati trasferiti mediante l'ausilio di pinzette in vermiculite bagnata della soluzione di germinazione  $\frac{1}{2}$  Hoagland Nutrient Media (5% v/v soluzione A, 0.05% v/v soluzione B) addizionata di ferro (come solfato ferrico) chelato con EDTA disodico per una concentrazione finale di 69.5  $\mu$ M e posti nel fitotrone (umidità 80%, temperatura 22°C, irradianza di 53-63  $\mu$ E m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperiodo di 12 ore). La vermiculite è un minerale costituito da idrosilicati di magnesio e alluminio contenente ferro trivalente adatto a mantenere l'umidità e garantire una buona aerazione, favorendo lo sviluppo delle radici. Trascorsi 5 giorni le pinate sono state quindi trasferite con attenzione mediante l'uso di pinzette in vaschette di plastica opportunamente forate (volume ~1L) riempite della soluzione di crescita della stessa composizione di quella di germinazione. La crescita della piante è così proseguita fino al 20°giorno, giorno di prima raccolta dei campioni. La raccolta dei campioni prevedeva: escissione delle foglie e delle radici dalle piante, pesata degli stessi, deposizione O.N. a 4°C e congelamento per passaggio diretto in azoto liquido la mattina successiva la raccolta. I campioni congelati sono stati conservati a -80°C.

### 3.2.2 Estrazione delle membrane tilacoidali.

L'estrazione delle membrane tilacoidali da cloroplasti di foglie di spinacio è stata effettuata al buio, al fine di minimizzare gli effetti della luce. Tutte le operazioni sono state condotte con soluzioni refrigerate e in ghiaccio al fine di conservare la stabilità dei complessi proteici. Sono stati utilizzati due diversi tamponi per l'estrazione: il tampone T1 (0.4 M sorbitolo; 0.1 M Tricina pH 7.8; 10mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5% (w/v) latte magro in polvere; 100 µM PMSF; 5mM Acido Amminocaproico; 1mM Benzamidina) e il tampone T2 (50mM sorbitolo; 5mM tricina pH 7.8; 10mM EDTA Na<sub>2</sub>). Le foglie di spinacio sono state poste in un becker refrigerato ed omogenizzate con omogenizzatore a lame intercambiabili fino ad ottenere un liquido spumoso in tampone T1. L'omogenizzazione è stata seguita da filtrazione su doppio strato di Miracloth (Calbiochem, pori da 20 µm), centrifugazione a 1400 x g per 10 min in supercentrifuga refrigerata a 4°C (Beckman J2-HS, rotore JA-20). Il surnatante è stato poi allontanato ed il pellet, rappresentato dai cloroplasti, risospeso in T2 e centrifugato a 10000 x g per 10 min per due volte. Il pellet, rappresentato a questo punto dalle membrane tilacoidali, è stato quindi risospeso in un volume limitato di tampone T2. I campioni sono stati poi stoccati a -80°C previo congelamento in azoto liquido. La concentrazione proteica dei campioni è stata valutata con il kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

### 3.2.3 Solubilizzazione delle membrane tilacoidali

Prima di sottoporre le membrane tilacoidali al processo di solubilizzazione, le stesse sono state dializzate per una notte a 4° C contro una soluzione 25 mM mM BisTris-HCl, pH 7.0. La solubilizzazione è stata realizzata in accordo con Kügler et al. [96], and Suorsa et al. [97] con le seguenti modifiche. Le membrane tilacoidali sono state lavate con un *washing buffer* (330 mM sorbitolo, 50 mM BisTris-HCl, pH 7.0, and 250 mg/mL Pefabloc (Roche)) e pellettate con una centrifugata di 3500 x g di 2 minuti a 4° C. Il pellet è stato poi risospeso nel tampone 25BTH20G (20% v/v glicerolo, 25 mM BisTris-HCl, pH 7.0, and 250 mg/mL Pefabloc). Un identico volume di 25BTH20G contenente 2% w/v n-dodecil-β-D-maltoside (DDM, Sigma-Aldrich) è stato poi aggiunto alla sospensione di membrane e la solubilizzazione è

stata effettuata sotto continua agitazione in ghiaccio per 3 minuti. L'insolubilizzato è stato poi allontanato con una centrifugata di 18000 x g per 15 min a 4° C

### **3.2.4 1D BN-PAGE**

Le membrane tilacoidali solubilizzate sono state mescolate con 0.1 volumi di Coomassie Blue solution (5% p/v Serva blue G, 100 mM BisTris-HCl, pH 7.0, 30% w/v saccarosio, and 500 mM acido  $\epsilon$ -amino-n-caproico) e caricate su di un gel BN-PAGE di spessore pari a 0.75 mm e con un gradiente di acrilamide dal 5 al 12.5 %. Per la corsa è stata utilizzata una cella elettroforetica mini Protean II (Bio-Rad) caricando 30  $\mu$ g di proteine per ciascun pozzetto. La concentrazione proteica dopo la solubilizzazione è stata stimata con il saggio DC Protein Assay. La prima dimensione è stata corsa applicando una differenza di potenziale costante di 90 V per una notte intera gradualmente incrementata a 200 V la mattina seguente.

### **3.2.5 1D BN-PAGE con urea**

Sei aliquote da 10  $\mu$ l di una soluzione di tilacoidi solubilizzati (con una concentrazione proteica di 3  $\mu$ g· $\mu$ l<sup>-1</sup>) sono stati miscelate con differenti volumi di una soluzione madre di urea (7M), ottenendo concentrazioni finali dell'agente caotropico rispettivamente di 0.5, 1, 2, 3, 4 e 5 M. Dopo un'incubazione di 15 min al buio e a 10° C i campioni sono stati caricati e fatti correre su di un BN-PAGE di spessore pari a 0.75 mm e con un gradiente di acrilammide dal 5 al 12.5% come riportato precedentemente.

### **3.2.6 2D BN/BN-PAGE**

Una striscia del BN-PAGE di prima dimensione è stata tagliata e caricata ortogonalmente sul BN-PAGE di seconda dimensione e fissata tramite l'aggiunta di una soluzione di agar 0.5% (p/v) in *BN cathode buffer*. La composizione del gel di seconda dimensione era identica a quella del gel di prima dimensione se non per il fatto che è stato utilizzato un gradiente di poliacrilammide dal 5% al 18, si è inoltre aggiunta uno 0.02% (p/v) di DDM al cathode buffer.

### **3.2.7 2D N-LP-IEF-BN-PAGE**

Le membrane tilacoidali solubilizzate (3 mg totali) sono state mescolate con Ampholyte pH 3.0-6.0 (2% v/V), glicerolo (20% v/v), DDM (1% p/V) e urea (1.5 M), fino ad una concentrazione proteica finale di  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Il cocktail di focalizzazione così ottenuto è stato poi caricato con una siringa nella cella di focalizzazione per elettroforesi in fase liquida MicroRotofor (Bio-Rad). Le camere laterali del MicroRotofor sono state riempite con 0.5 M di acido acetico (pH 3, anolita) e 0.25 M HEPES (pH 5, catolita). La focalizzazione è stata poi realizzata a  $4^\circ \text{ C}$  e al buio applicando una potenza costante di 1 W per 210 min. Finita la focalizzazione le 10 frazioni del MicroRotofor sono state raccolte separatamente facendo molta cura ad evitare la diffusione. La concentrazione proteica di ogni frazione è stata poi stimata utilizzando il saggio DC Protein Assay mentre il pH è stato misurato a  $25^\circ \text{ C}$  mediante l'ausilio di un microelettrodo collegato ad pHmetro standard. Per correre la seconda dimensione nativa in BN-PAGE, 30  $\mu\text{l}$  di ciascuna frazione sono stati mescolati con 3  $\mu\text{l}$  di Coomassie Blue solution e caricati su di un BN gel di spessore pari a 0.75 mm e con un gradiente di acrilamide dal 5 al 12.5%. La corsa è stata poi realizzata seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 3.2.4

### **3.2.8 3D SDS-PAGE**

Per realizzare una terza dimensione denaturante le bande del 2D N-LP-IEF-BN-PAGE sono state tagliate e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in un buffer contenente SDS al 2% (p/V),  $\beta$ -mercaptoetanolo al 5% (v/v) e urea 6M. Dopo l'incubazione le bande sono state caricate su di un SDS gel [30], con una concentrazione costante di acrilamide del 15% addizionato di un 6M urea. La corsa è stata realizzata overnight ad una corrente costante di 10 mA per gel. La colorazione dei gel è stata realizzata sia con BlueSilver [65] che Silver-stain [66].

### **3.2.9 Digestione triptica in gel**

Tutte le bande del gel 2D N-LP-IEF-BN-PAGE sono state ritagliate e sottoposte a digestione triptica in gel secondo il protocollo di Shevchenko et al. [67]. Dopo una serie di lavaggi ciascun pezzo di gel è stato essiccato e poi reidratato in ghiaccio con una soluzione di digestione contenete  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM e

tripsina 12.5 ng/ $\mu$ L (tripsina porcina modificata, Promega). Dopo 30 minuti in ghiaccio il surnatante è stato scartato e sono stati aggiunti 20  $\mu$ L di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. I pezzi di gel sono stati lasciati ad incubare a 37 °C per una notte. L'indomani il trasudato contenente i peptidi digeriti è stato separato dal gel ed essiccato. Prima dell'analisi in massa i peptidi sono stati risospesi in 10  $\mu$ L di acido formico al 5%.

### ***3.2.10 Nano RP-HPLC-ESI-MS/MS e sequenziamento peptidici***

I peptidi sono stati separati in cromatografia liquida a fase inversa, usando un nano-HPLC (Ultimate, Dionex-LC Packings). 10  $\mu$ L di campione sono stati iniettati dall'autocampionatore su di una pre-colonna fatta in casa lunga 2 cm (75  $\mu$ m i.d.; 375  $\mu$ m o.d.; ResprosilC18-AQ, 3  $\mu$ m) ad un flusso di 2  $\mu$ L/min. L'eluizione sequenziale dei peptidi è stata realizzata ad un flusso di 200 nL/min utilizzando una colonna fatta in casa di 15 cm (75  $\mu$ m i.d.; 375  $\mu$ m o.d.; ResprosilC18-AQ, 3  $\mu$ m) in linea con la precolonna. Il gradiente utilizzato per la corsa era di tipo lineare, e prevedeva il passaggio da un 100% della soluzione A (2% v/v acetonitrile, 0.1% v/v acido formico) ad un 50% della soluzione B (98% v/v acetonitrile, 0.1% v/v acido formico) in 40 minuti.

I peptidi sono stati eluiti direttamente dentro un spettrometro di massa con trappola ionica ad alta capacità (HTCplus Bruker-Daltonics). Il voltaggio del capillare è stato settato a 1.5 kV. Il range di scansione utilizzato era tra i 300 e i 1800 m/z. L'identificazione delle proteine è stata realizzata per MS/MS Ions Search dei frammenti riconosciuti, ricercando nel database non ridondante del National Center for Biotechnology information (NCBIInr) utilizzando il programma MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). La ricerca all'interno del database è stata compiuta includendo i seguenti parametri: completa carbamidometilazione delle cisteine e parziale ossidazione delle metionine, tolleranza della massa peptidica di  $\pm 1.2$  Da e tolleranza per la massa del frammento peptidico di  $\pm 0.9$  Da, digestione eseguita con tripsina.

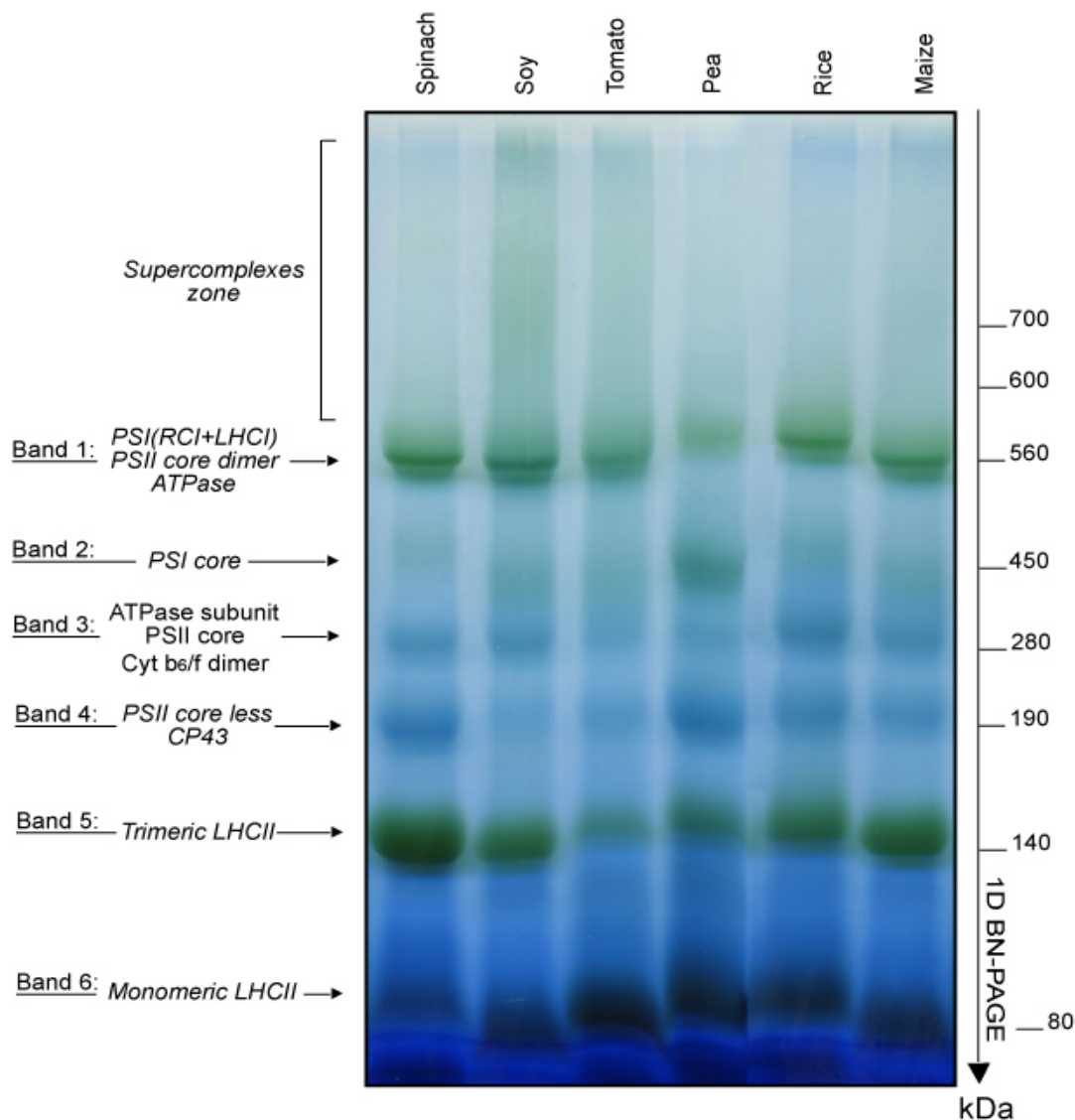
## SEZIONE 3.3: RISULTATI E DISCUSSIONE

### *3.3.1 BN-PAGE dei complessi multiproteici delle membrane tilacoidali di diverse specie vegetali*

Negli ultimi dieci anni il BN-PAGE interfacciato ad una seconda dimensione denaturante è stato il metodo di elezione per l'analisi funzionale di molti complessi multiproteici associati a diversi sistemi membranali. Il sistema più studiato è stato sicuramente quello della catena respiratoria mitocondriale [34]. Decine di studi nel corso degli anni, hanno caratterizzato tutte le subunità costituenti i complessi della membrana mitocondriale, dimostrando profonde differenze funzionali e metaboliche tra piante, batteri e funghi [89]. Il primo lavoro sulle membrane tilacoidali risale invece al 1997 quando, utilizzando il DDM come detergente, Kügler e collaboratori riuscirono a caratterizzare tutti i complessi multiproteici coinvolti nella fotofosforilazione [97]. A seguire, lo stesso protocollo di solubilizzazione è stato sfruttato per lo studio delle membrane fotosintetiche di diverse specie (cianobatteri, alghe, batteri) [98-100]. Con gli anni, oltre al DDM, sono stati sviluppati comunque altri metodi di solubilizzazione. Tra tutti, quello che prevede l'uso della digitonina, un tensioattivo naturale che sembra garantire una maggiore integrità strutturale dei complessi in virtù di una azione più "blanda", sembra essere l'unico che, nel caso dei tilacoidi, possa garantire dei risultati comparabili a quelli ottenuti con l'uso del DDM [101]. Per i nostri studi l'utilizzo del DDM è stato comunque preferito a quello della digitonina, in quanto, sulla base delle prove da noi realizzate, non sono state riscontrate grandi differenze tra i profili elettroforetici ottenuti con i due metodi di solubilizzazione.

Per dimostrare che il bandeggio elettroforetico di un BN gel di membrane tilacoidali è indipendente dalla specie vegetale, è stato corso un gel in cui sono stati caricati contemporaneamente i tilacoidi estratti da diverse specie vegetali. Il gel in figura 3.1 compara il profilo elettroforetico dei complessi solubilizzati a partire da foglie di spinacio, soia, pomodoro, pisello, riso e mais. Per garantire un'adeguata comparazione, tutti i campioni corsi sono stati estratti, solubilizzati e corsi nelle stesse identiche condizioni sperimentali. L'analisi del gel in figura 3.1 non ha dimostrato differenze sostanziali nel bandeggio, suggerendo che il profilo elettroforetico è indipendente dalla specie prescelta. Per garantire un'identificazione

inequivocabile di tutti i complessi separati, le bande della linea dello spinacio sono state poi identificate mediante spettrometria di massa tandem (MS/MS)[102]. Contenendo ogni banda uno o più complessi multiproteici, la digestione triptica e l'analisi RP-HPLC-ESI-MS/MS ha portato alla contemporanea identificazione di più specie proteiche. La valutazione delle specie proteiche identificate ha permesso il riconoscimento dei complessi originali. La tabella 1 riporta le identificazioni delle 6 bande del gel di figura 3.1.



**Figure 3.1.** 1D Blue-Native PAGE dei complessi fotosintetici delle membrane tilacoidali estratte dalle specie: spinacio (linea 1), soia (linea 2), pomodoro (linea 3), pisello (linea 4), riso (linea 5) e mais (linea 6). I complessi sono stati solubilizzati utilizzando un rapporto DDM-proteina pari a 4 su ogni linea è stata poi caricata la stessa quantità di detergente (30  $\mu$ g), valutata con il metodo DC protein assay (Bio-Rad). Il gel è stato solo decolorata e corso in accordo ai protocolli riportati in materiali e metodi. Sulla sinistra del gel sono indicati i complessi identificati in ciascuna banda.

**Tabella 1. Complessi identificati nel 1D BN-PAGE di tilacoidi di spinacio.** Ogni banda contiene uno o più complessi mutiproteici riconosciuti sulla base delle proteine costituenti identificate. Il numero delle bande si riferisce alla figura 3.1.

**Banda 1, 565 kDa:PSI (RCI+LHCI) / PSII core dimer / ATPase**

Identificazione	Mascot Score	Numero di peptidi	Mw kDa/pI	Numero di accesso NCBI
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 [Spinacia oleracea]	103	2	83.1 / 6.74	gi 11497525
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 [Spinacia oleracea]	121	4	82.4 / 6.72	gi 11497524
Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor (PSI-E)	109	2	13.3 / 9.99	gi 131178
PSI type III chlorophyll a/b-binding protein	167	2	29.1 / 8.61	gi 430947
Photosystem II 47 kDa protein [Spinacia oleracea]	119	3	56.2 / 6.16	gi 11497552
ATPase subunit alpha [Spinacia oleracea]	187	5	55.5 / 5.16	ATPA_SPIOL
ATPase subunit beta [Spinacia oleracea]	398	9	53.7 / 5.22	ATPB_SPIOL

**Banda 2, 453 kDa: PSI core**

Identificazione	Mascot Score	Numero di peptidi	Mw kDa/pI	Numero di accesso NCBI
-----------------	--------------	-------------------	-----------	------------------------

Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 [Spinacia oleracea]	245	4	83.1 / 6.74	gi 11497525
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 [Spinacia oleracea]	263	5	82.4 / 6.72	gi 11497524
Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor (PSI-E)	173	3	13.3 / 9.99	gi 131178
Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplast precursor (PSI-L) (PSI subunit V)	121	2	23.0 / 9.70	gi 3914473

**Banda 3, 292 kDa: ATPase subunit / PSII core / Cyt b<sub>6</sub>/f dimer**

<b>Identificazione</b>	<b>Mascot Score</b>	<b>Numero di peptidi</b>	<b>Mw kDa/pI</b>	<b>Numero di accesso NCBI</b>
Photosystem Q(B) protein (32 kDa thylakoid membrane protein) (Photosystem II protein D1)	165	3	38.8 / 5.29	gi 1709829
Photosystem II 47 kDa protein [Spinacia oleracea]	296	5	56.2 / 6.16	gi 11497552
Photosystem II 44 kDa protein [Spinacia oleracea]	175	3	52.0 / 6.68	gi 11497521
Photosystem II protein D2 [Spinacia oleracea]	145	3	39.5 / 5.46	gi 11497520
Apocytochrome f precursor	128	3	35.4 / 8.34	gi 544122
ATPase subunit alpha [Spinacia oleracea]	152	4	55.5 / 5.16	ATPA_SPIOL

ATPase subunit beta [Spinacia oleracea]	478	10	53.7 / 5.22	ATPB_SPIOL
--	-----	----	-------------	------------

**Banda 4, 193 kDa: PSII core less CP43**

Identificazione	Mascot Score	Numero di peptidi	Mw kDa/pI	Numero di accesso NCBI
Photosystem Q(B) protein (32 kDa thylakoid membrane protein) (Photosystem II protein D1)	251	4	38.8 / 5.29	gi 1709829
Photosystem II 47 kDa protein [Spinacia oleracea]	364	6	56.2 / 6.16	gi 11497552
Photosystem II protein D2 [Spinacia oleracea]	201	4	39.5 / 5.46	gi 11497520

**Banda 5, 148 kDa: Trimeric LHCII**

Identificazione	Mascot Score	Numero di peptidi	Mw kDa/pI	Numero di accesso NCBI
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.1 [Spinacia oleracea]	134	2	28.4 / 5.16	gi 133917263
Lhcb2 protein [Arabidopsis thaliana]	167	3	28.7 / 5.48	gi 4741944

**Band 6, 85 kDa: Monomeric LHCII**

Identificazione	Mascot Score	Numero di peptidi	Mw kDa/pI	Numero di accesso NCBI
-----------------	--------------	-------------------	-----------	------------------------

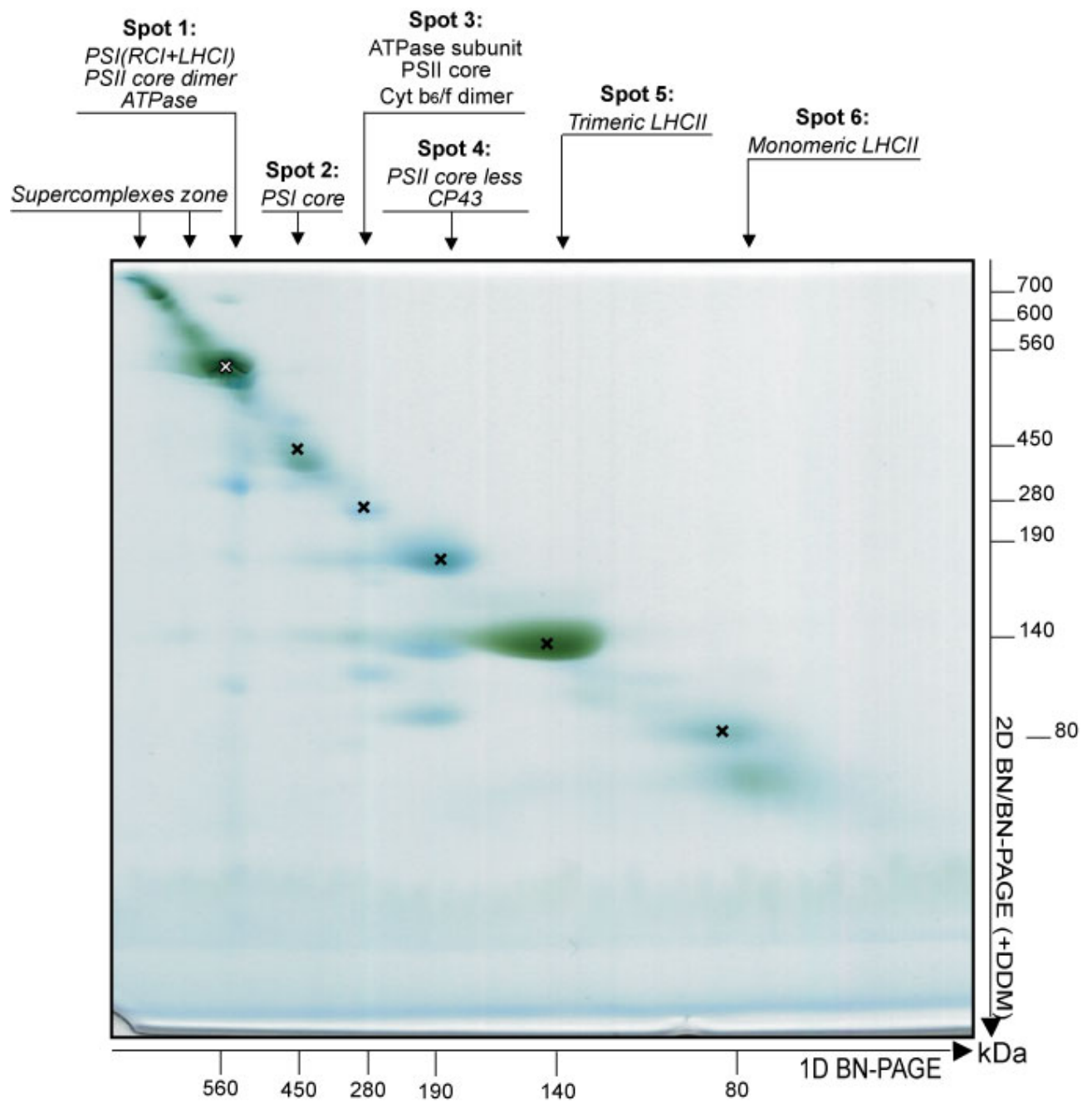
LHCB5 (Light harvesting complex of Photosystem II 5); [Arabidopsis thaliana]	228	4	30.1 / 6.00	gi 15235029
LHCB4.2 (Light harvesting complex psii) [Arabidopsis thaliana]	187	3	31.2 / 5.85	gi 15231990

Come riportato in tabella 1 sotto le bande 1 e 3 vi sono più complessi che migrano in contemporanea. Il BN gel è infatti un sistema elettroforetico nativo ad alta risoluzione, ma come tutte le tecniche monodimensionale può essere limitato da fenomeni di comigrazione. La comigrazione può essere dovuta, sia alla massa molecolare dei complessi (per esempio in figura 3.1 la banda 2 a 565 kDa e la banda 3 a 292 kDa contengono entrambe complessi che hanno la stessa massa molecolare apparente), sia ad interazioni deboli aspecifiche che possono instaurarsi durante la migrazione tra complessi di massa molecolare differente. Tale fenomeno riduce notevolmente il numero di complessi identificabili mediante *non-gel shotgun method* [102], ma soprattutto complica di molto l'interpretazione dei gels di seconda dimensione. Infatti ad una valutazione quantitativa, una mappa 2D BN-SDS-PAGE presenta un numero di spots inferiore a quello di una mappa 2D IEF-SDS-PAGE, e questo accade perché le proteine in una 2D BN-SDS-PAGE non sono distribuite su tutta la superficie della mappa, ma bensì su linee verticali derivate direttamente dalla denaturazione delle bande di prima dimensione. Se non ci fosse comigrazione il problema sarebbe di poco conto, ma la comigrazione in prima dimensione, unita alla distribuzione in linee verticali, riduce notevolmente la capacità di identificazione anche delle componenti proteiche dei complessi multiproteici.

### **3.3.2 2D BN/BN-PAGE di complessi multiproteici delle membrane tilacoidali**

Nel tentativo di sviluppare un sistema elettroforetico che potesse in qualche modo risolvere il problema della comigrazione del 1D BN-PAGE, convinti che solo

un sistema bidimensionale era in grado di riuscire in tal senso, abbiamo cominciato valutando l'efficacia dell'unico sistema di elettroforesi bidimensionale nativa sia in prima che in seconda dimensione conosciuto, il 2D BN/BN-PAGE. Tale metodologia è stata anche essa introdotta da Schagger et al. [103] come un'evoluzione del 1D BN-PAGE per meglio comprendere la composizione stechiometrica dei supercomplessi mitocondriali (omo ed etero oligomeri di complessi multiproteici con massa molecolare totale superiore a 505 kDa) e per migliorare la risoluzione elettroforetica totale. La corsa di seconda dimensione è realizzata caricando ortogonalmente, su di un BN gel che differisce da quello di prima dimensione solo nel gradiente di acrilammide, un linea di prima dimensione. Secondo il protocollo originale, inoltre, come detergente di solubilizzazione va utilizzata la digitonina, e basse concentrazioni di un detergente non ionico (0.02% di DDM o 0.3% di Triton X-100) che devono essere aggiunte nel cathode buffer di seconda dimensione [104]. Questa accortezza permette nel gel di seconda dimensione la dissociazione dei supercomplessi (separati con il gel di prima dimensione) nei sub-complessi costituenti, senza indurre la disgregazione di quest'ultimi nelle loro componenti proteiche di base. In questo tipo di elettroforesi bidimensionale tutti i complessi multiproteici sono risolti lungo la diagonale del gel di poliacrilammide. La figura 3.2 mostra la 2D BN/BN-PAGE ottenuta da membrane tilacoidali estratte da spinacio. Il numero di spots ottenuti lungo la diagonale coincide con il numero di bande ottenuto in 1D BN-PAGE, e gli spots visibili al di sotto della diagonale sono stati identificati come sub-complessi ottenuti dalla destabilizzazione dei complessi originali durante la corsa del gel di seconda dimensione. Ad esempio nello spots 1 comigrano come nel gel monodimensionale, il fotosistema I (RCI+LHCI), il dimerico del core fotosistema II ( $[RCII]_2$ ) e la  $CF_0$ - $CF_1$ -ATP sintasi, e nello spot 3 la porzione  $CF_1$  dell'ATP sintasi migra insieme a fotosistema II (RCII+LHCII) e al dimerico del citocromo  $b_6/f$ . Contrariamente a ciò che accade in una double SDS-PAGE (dSDS-PAGE) [33], in una 2D BN/BN-PAGE gli spots si dispongono lungo la diagonale del gel senza però mostrare quella dispersione in grado di incrementare la capacità risolutiva del sistema, questo perché molto probabilmente i complessi multiproteici più idrofobici non subiscono alcuna migrazione anomala nel gel di seconda dimensione [105]. Questo dimostra



**Figure 3.2.** 2D BN/PAGE dei complessi fotosintetici delle membrane tilacoidali di spinacio. La seconda dimensione è stata corsa con l'aggiunta di 0.02% DDD nel *cathode buffer*. L'identificazione degli spot è riportata sopra la figura.

e spiega perché il 2D BN/PAGE non è in grado di migliorare la risoluzione elettroforetica dei complessi multiproteici rispetto ad un BN gel monodimensionale.

### 3.3.3 2D N-LP-IEF-BN-PAGE di complessi multiproteici delle membrane tilacoidali

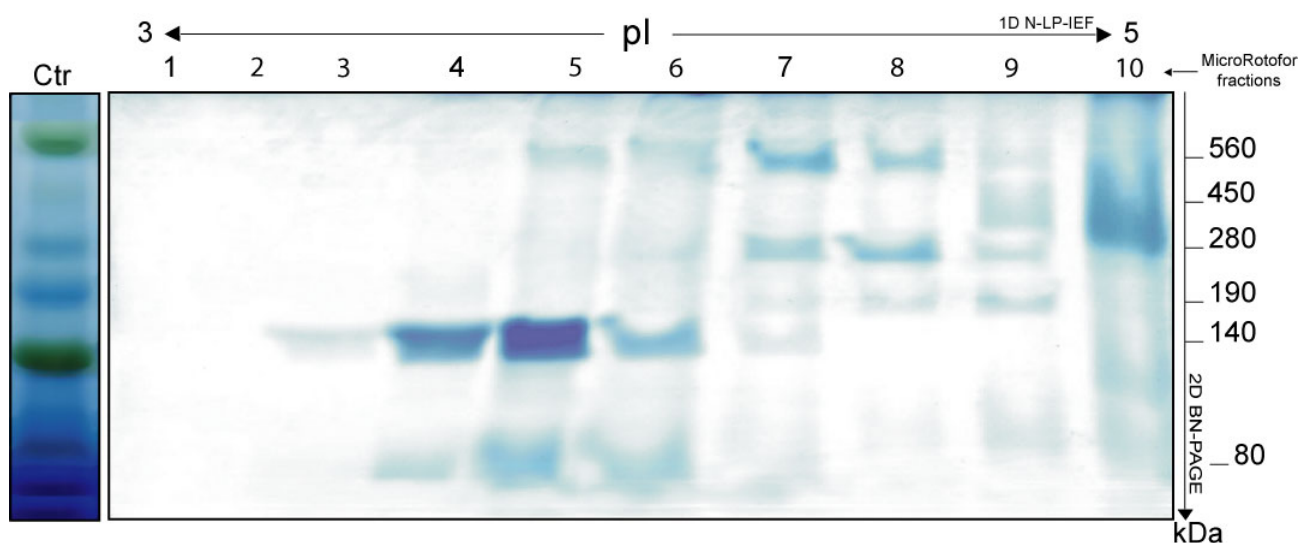
Nel tentativo di sviluppare un nuovo sistema elettroforetico bidimensionale nativo, si è ritenuto opportuno studiare lo stato di carica dei complessi della membrana tilacoidale. A tal fine si è corso un *clear-native* gel (CN-PAGE, gel non mostrato) un gel nativo monodimensionale che differisce dal BN gel solo per il fatto che i complessi migrano sulla base della propria carica elettrica totale nativa (dato che non vi è alcuna aggiunta di BBC prima della corsa elettroforetica). Tale sistema di risoluzione inferiore a quella del BN, ha permesso la caratterizzazione di 5 bande, indicando che tutti i complessi multiproteici della membrana tilacoidale avevano un punto isoelettrico nativo acido. È ben noto infatti che in un CN-PAGE migrano verso l'anodo solo i complessi che a pH 7 (il pH del gel e di tutti i tamponi) hanno una carica netta negativa, inoltre, se il pI nativo dei complessi risulta inferiore a 5.4, il CN-PAGE mostra una risoluzione elettroforetica paragonabile a quella del BN gel. Quindi il fatto che nel CN-PAGE di membrane tilacoidali fossero presenti 5 bande indicava che il pI dei nostri complessi era inferiore a 5.4. Questi risultati ci hanno spinto a pensare ad un sistema elettroforetico bidimensionale che si basasse in prima dimensione su una IEF nativa in fase liquida (N-LP-IEF) seguita da un BN-PAGE di seconda dimensione (figura 3.3). In questo modo è stato messo a punto un sistema elettroforetico che in prima dimensione sfrutta il pI nativo dei complessi multiproteici ed in seconda dimensione la loro massa molecolare apparente. Questo approccio ricalca in parte dei lavori recenti in cui una IEF denaturante in fase liquida è stata poi seguita da una 2D IEF-SDS-PAGE, per un sistema a tre dimensioni applicabile allo studio di proteomi molto complessi [107-109]. Noi abbiamo pensato di applicare la stessa idea in condizioni non denaturanti.

Sulla base delle indicazioni fornite dal CN-PAGE, la 2D N-LP-IEF-BN-PAGE è stata corsa nell'intervallo di pH 3-5, utilizzando come catolita una soluzione di HEPES 0.25 M e come anolita una soluzione di acido acetico 0.5 M. Prima della solubilizzazione, il campione (le membrane tilacoidali) è stato dializzato per una notte, con il fine di eliminare tutte le specie ioniche che avrebbero potuto interferire con la formazione di un gradiente di pH lineare

all'interno della camera di focalizzazione. L'interazione di elettroliti con le membrane ioniche del MicroRotafor può infatti ridurre il valore di potenziale elettrico effettivamente applicato, inducendo un'alterazione della linearità del gradiente di pH che porta ad una riduzione della qualità della focalizzazione. Le membrane tilacoidali dializzate sono state poi solubilizzate con DDM [99], per poi essere diluite con glicerolo e una soluzione di *carrier* anfiliti (pH 3.0-6.0), mantenendo una concentrazione finale di DDM e BisTris rispettivamente dell'1% (p/V) e di 3.0 mM. In accordo con il protocollo originale di BN, l'aggiunta del glicerolo è stata messa in atto per stabilizzare la sfera di idratazione intorno ai complessi multiproteici, incrementandone così la solubilità e la stabilità. L'aggiunta del detergente sino ad un rapporto finale DDM/proteina di 4 (g/g) è stata attuata per aumentare la solubilità dei complessi in corrispondenza del loro pI. La concentrazione del Bis-Tris è stata ridotta al valore di 3 mM (da un valore iniziale post-solubilizzazione di 25 mM) perché per alte concentrazioni (superiori a 4 mM) il gradiente di pH lungo la cella di focalizzazione risultava tamponato al valore di pKa del tampone. Questo riduceva la capacità risolutiva del *focusing*, facendo sì che diverse frazioni avessero lo stesso valore di pH. Per correre la N-LP-IEF l'aggiunta del BBC non era necessaria (anzi sarebbe stata deleteria), in quanto i complessi multiproteici migrano all'interno del gradiente di pH solo sulla base della propria carica netta totale sino al punto in cui tale carica non diviene nulla (pI). Il cocktail di focalizzazione è stato poi caricato in ogni compartimento della camera di focalizzazione del MicroRotofor e il tutto è stato poi focalizzato per 270 min. alla potenza costante di 1 W. Per evitare la destabilizzazione dei complessi e la possibilità di diffusione degli stessi dalle proprie zone di focalizzazione, la corsa è stata realizzata ad una temperatura costante di 4° C. Dopo il focusing le 10 frazioni del MicroRotofor sono state raccolte separatamente, e dopo aggiunta del BBC (ad una concentrazione finale di 0.5 % p/v), sono state caricate su di un BN gel convenzionale di seconda dimensione. In questa fase l'aggiunta del BBC era necessaria al fine di conferire ai complessi una carica netta negativa che li facesse migrare verso l'anodo. Il gel di seconda dimensione ha presentato tempi di corsa più lunghi rispetto ad un 1D BN-PAGE, probabilmente perché il BBC aggiunto

dopo la focalizzazione non riesce a spiazzare completamente gli anfoliti carrier anfoliti già legati ai complessi.

Da una attenta osservazione della figura 3.3 si capisce come il sistema elettroforetico proposto non presenti ancora una risoluzione elettroforetica ottimale. Ad esempio la banda a 565 kDa nella quale normalmente in un 1D BN-PAGE comigrano 3 complessi (Ctr, figura 3.3) è stata suddivisa dopo la 2D N-LP-IEF-BN-PAGE in 5/6 bande, indicando una scarsa risoluzione della prima dimensione nativa.

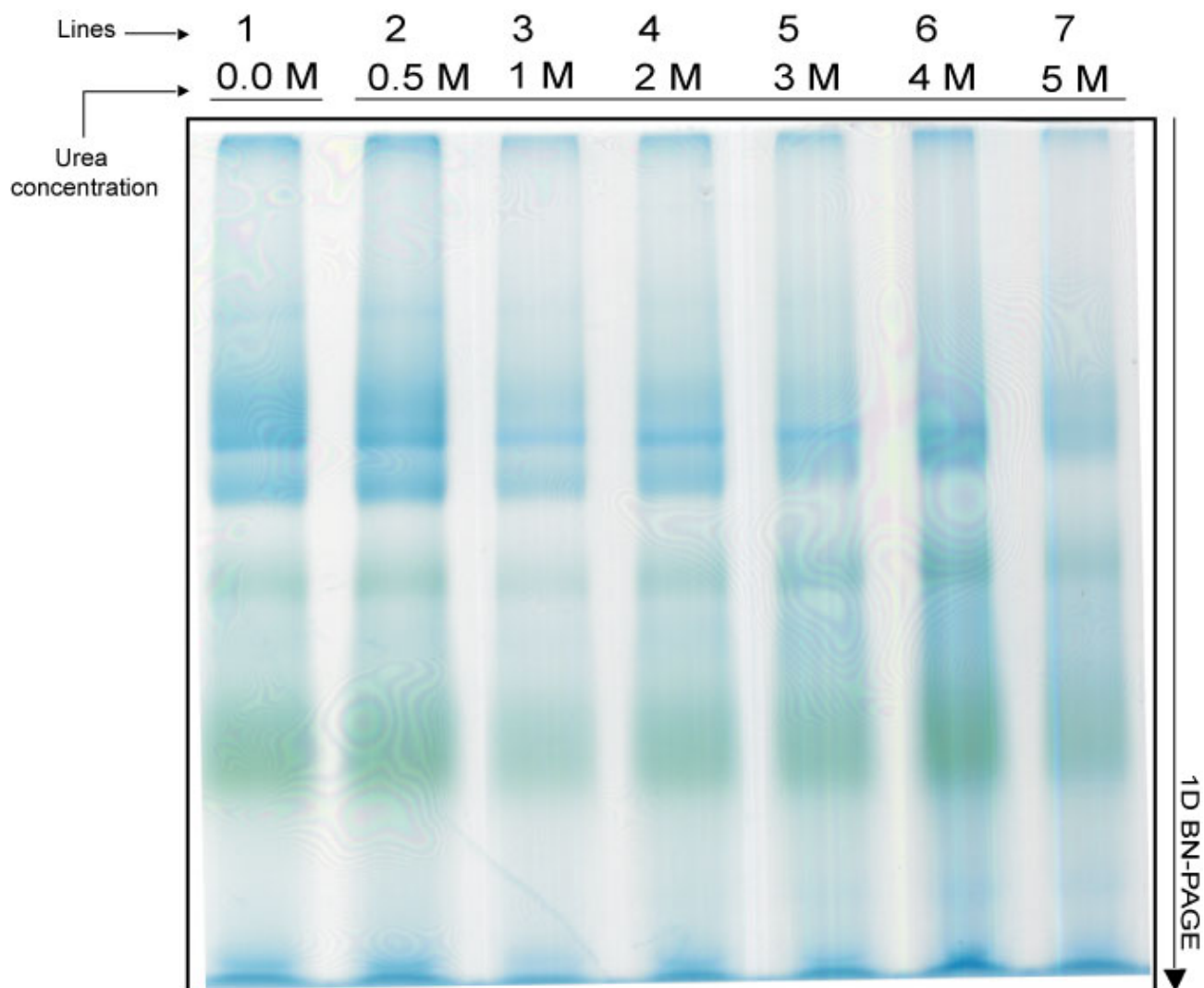


**Figure 3.3.** Mappa 2D nativa dei complessi fotosintetici delle membrane tilacoidali di spinacio realizzata in prima dimensione con una IEF nativa in fase liquida e in seconda dimensione con un BN gel (2D N-LP-IEF-BN-PAGE). La focalizzazione di prima dimensione è stato realizzato nell'intervallo di pH 3-5. Dalla linea 1 alla linea 10 sono state caricate sul gel di seconda dimensione le 10 frazioni raccolte del MicroRotor dopo la focalizzazione. Il campione corso nella linea Ctr contiene membrane tilacoidali non focalizzate. Il gel è stato colorato con BluSilver e sono stati focalizzati in tutto 3 mg di proteina.

### ***3.3.4 2D N-LP-IEF-BN-PAGE di complessi multiproteici delle membrane tilacoidali con 1.5 M urea***

Con l'intento di migliorare la risoluzione elettroforetica di prima dimensione (N-LP-IEF) si è pensato di aggiungere un agente caotropico al cocktail di focalizzazione. La scarsa risoluzione era infatti attribuibile ad interazioni deboli (legami idrogeno, forza di Van der Waals e idrofobiche in generale) che venivano ad instaurarsi tra i complessi multiproteici durante la focalizzazione. Solo l'aggiunta di un agente come l'urea, in grado di contrastare la formazione di tali legami poteva migliorare la qualità della separazione (come accade in condizioni denaturanti in

una 2D-IEF-SDS-PAGE), permettendo a tutti i complessi di migrare indipendentemente sino al loro pI nativo. Per scegliere una concentrazione adeguata di caotropico in grado di migliorare la risoluzione senza causare la degradazione dei complessi multiproteici, si è deciso di correre un 1D BN-PAGE di membrane tilacoidali in presenza di una concentrazione di urea variabile tra 0 e 5 M. L'urea è stata aggiunta ai campioni dopo la solubilizzazione e prima del caricamento.

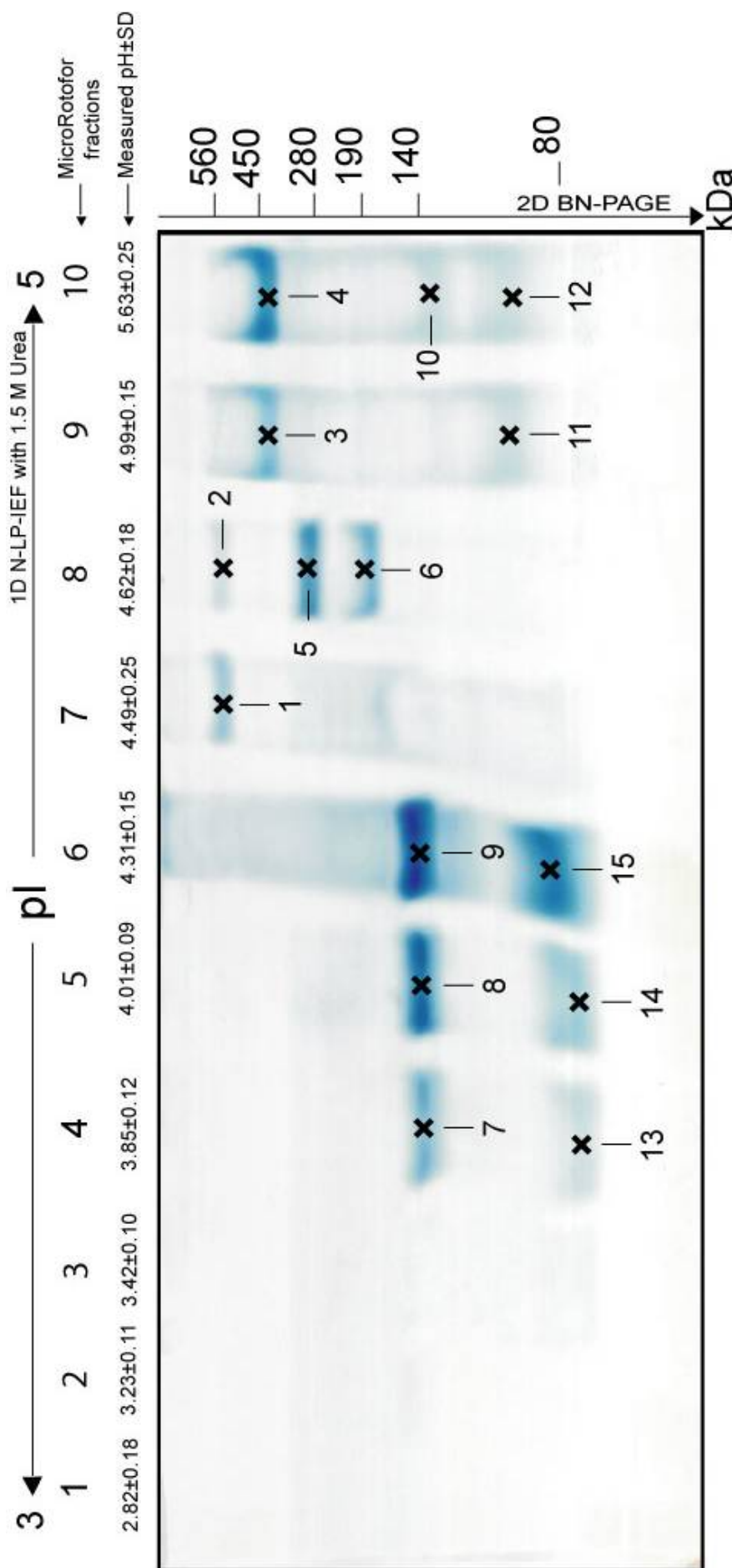


**Figure 3.4.** 1D BN-PAGE di complessi fotosintetici delle membrane tilacoidali di spinacio in presenza di urea. L'urea è stata aggiunta dopo la solubilizzazione dei campioni. La concentrazione finale di urea è riportata sopra ogni linea. Sono stati caricati 30  $\mu\text{g}$  di campione per ogni linea.

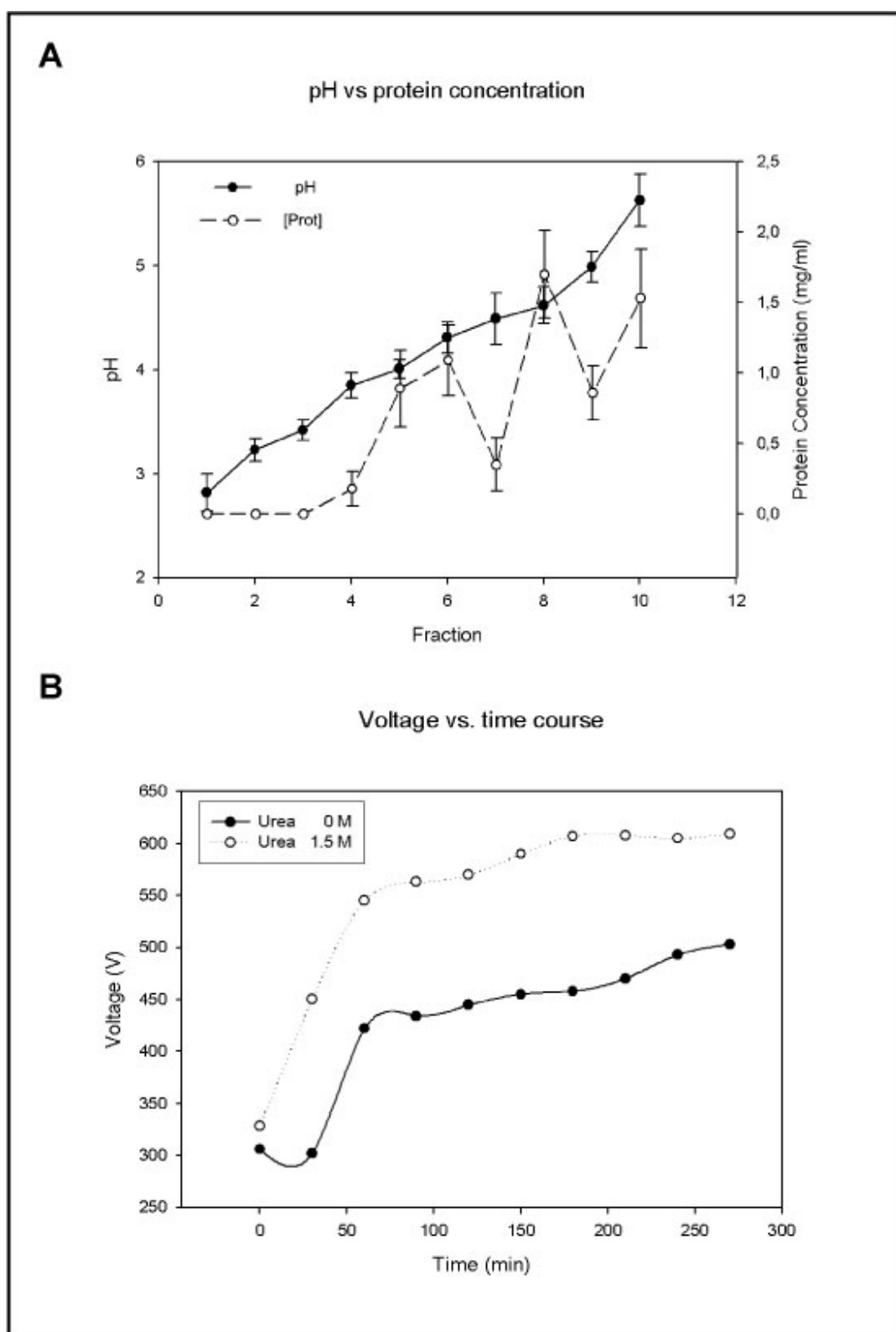
Il gel in figura 3.4 mostra chiaramente che le linee 3 e 4, con una concentrazione di urea rispettivamente di 1 e 2 M, mostrano lo stesso bandeggio della linea 1, che non contiene urea. Per concentrazioni di urea più alte (linee 5, 6 e 7) si assiste invece ad un progressivo aumento del numero delle bande, interpretabile con uno sfaldamento dei complessi. Si è quindi deciso di correre la N-LP-IEF in presenza di una concentrazione di urea pari a 1.5 M, mantenendo una temperatura di 4° C alla quale l'urea nella cella di focalizzazione del MicroRotofor non sembrava cristallizzare.

La figura 3.5 mostra il risultato della 2D N-LP-IEF-BN-PAGE in cui la focalizzazione è stata realizzata con l'aggiunta di 1.5 M urea al cocktail di focalizzazione. Comparando la figura 3.5 con la figura 3.3 si nota un netto aumento della risoluzione elettroforetica di prima dimensione, dimostrato (ad esempio) dalla presenza di sole 2 bande a 565 kDa (prima in assenza di urea erano 5). Per valutare la riproducibilità della focalizzazione la corsa è stata ripetuta 5 volte, e i valori di pH e di concentrazione proteica di ciascuna frazione del MicroRotofor sono stati graficati rispetto al numero delle frazioni stesse (figura 3.6 A). La deviazione standard delle misure di pH oscillava tra un valore massimo di 0.25 (per la frazione 10) e un valore minimo di 0.09 (per la frazione 6) indicando un buon livello di riproducibilità dell'analisi. La non linearità del gradiente di pH riscontrabile in figura 3.6 A può essere riconducibile alla presenza dell'urea, che aumentando la viscosità del mezzo di focalizzazione può indurre uno shift del pH specialmente nella regione basica. Questo si traduce in una parziale perdita di conducibilità elettrica, che spiega perché in presenza di urea i V·h totali necessari alla completa focalizzazione sono stati superiori che in assenza della stessa. Ciò è dimostrato in figura 3.6 B, nella quale è stato riportato il gradiente di voltaggio registrato in presenza (linea tratteggiata) ed in assenza (linea continua) di urea durante la focalizzazione condotta per 270 min ad una potenza costante di 1W. In presenza di urea il voltaggio di inizio corsa è stato superiore di 30 V e durante la corsa tale divario è andato incrementando proprio a causa della maggiore viscosità del mezzo di focalizzazione.

Il più grande vantaggio del metodo elettroforetico bidimensionale proposto risiede nella possibilità di valutare il valore di pH di ogni singola frazione. Questo



**Figure 3.5.** N-LP-IEF-BN-PAGE di complessi fotosintetici delle membrane tilacoidali di spinacio in presenza di 1.5 M urea. L'identificazione delle bande è riportata in tabella 2. Sopra ogni linea è riportata la misura del pH con la deviazione standard per ogni frazione raccolta dal MicroRotorfor. L'identificazione delle bande realizzata attraverso LC-ESI-MS/MS è la seguente: banda 1 (565 kDa, pl 4.49 ± 0.25) ATPase; banda 2 (565 kDa, pl 4.62 ± 0.18) PSI (RCI+LHCI) e PSII dimeric core; banda 3 e 4 (453 kDa, pl 4.99±0.15, 5.63±0.25) PSI core; banda 5 (292 kDa, pl 4.62±0.18) PSII core e dimer del citocromo b<sub>6</sub>/f; banda 6 (193 kDa, pl 4.62±0.18) PSII core meno CP-43; bande 7, 8 e 9 (148 kDa, pl 3.85±0.12, 4.01±0.09, 4.31±0.15) trimeri delle Lhcll; banda 10 (135 kDa, pl 5.63±0.25) monomero del Cyt b<sub>6</sub>/f; bande 11 e 12 (105 kDa, pl 4.99±0.15, 5.63±0.25) dimeri della CP 43; bande 13, 14 and 15 (85 kDa, pl 3.85±0.12, 4.01±0.09, 4.31±0.15) antenne monomeriche del PSII.

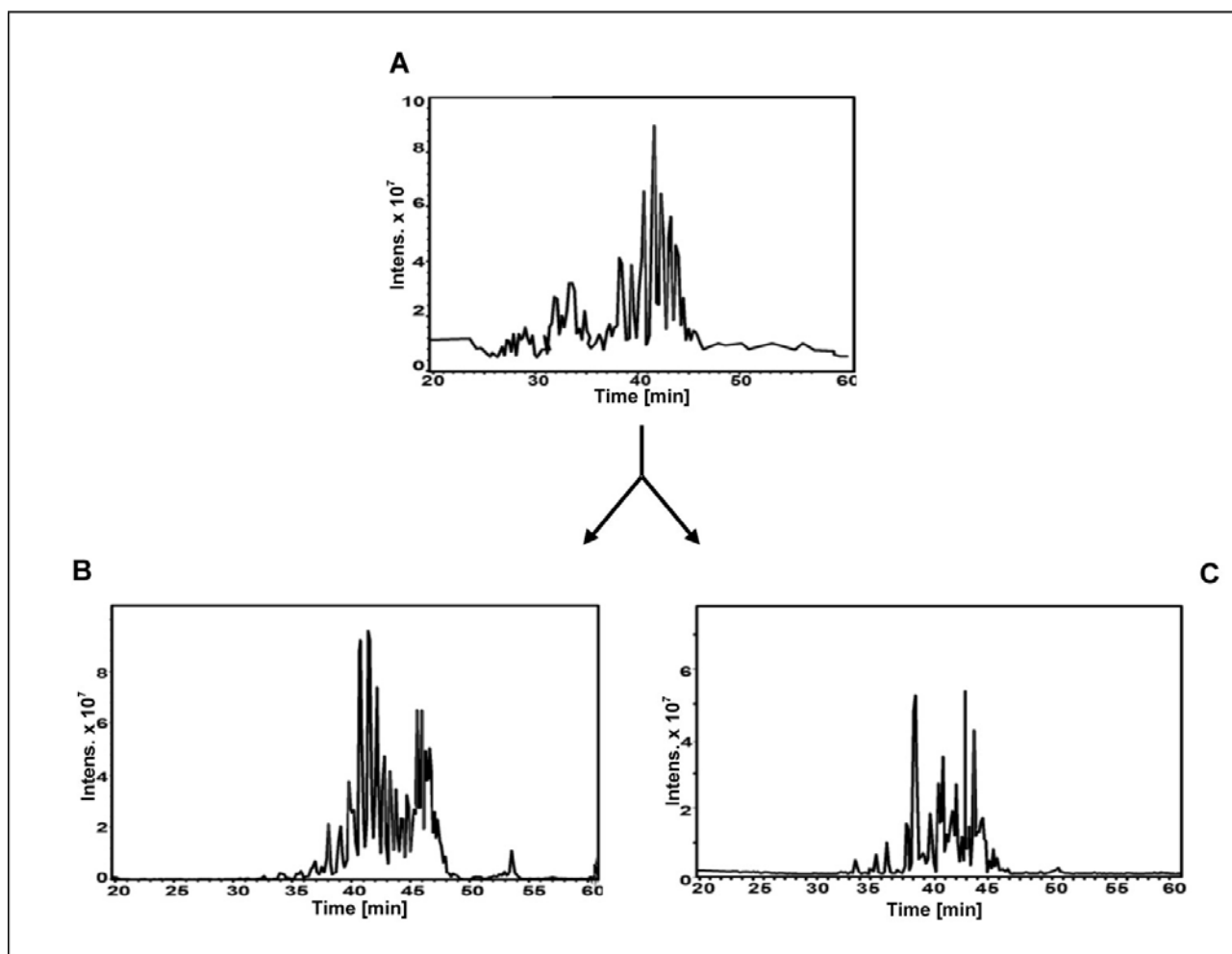


**Figure 3.6.** Pannello A: valori di pH e concentrazione proteica misurati per ciascuna delle 10 frazioni raccolte dal MicroRotofor dopo il focusing in presenza di urea 1.5 M. Pannello B: comparazione dei gradienti di voltaggio registrati durante la focalizzazione in presenza (linea tratteggiata) ed in assenza (linea continua) di urea.

ci ha permesso di misurare il pI nativo dei complessi della membrana tilacoidale, ottenendo dei valori che, in linea con i dati del CN-PAGE, oscillavano tra un minimo di 2.82 (frazione 1) ed un massimo di 5.63 (frazione 10). La tabella 2 riporta la caratterizzazione (per peso molecolare e pI nativi) e le identificazioni di ciascuna banda del gel di figura 3.5. L'identificazione dei complessi è stata realizzata sfruttando il metodo proposto da Fandino e collaboratori. [102]. Come ci si aspettava i complessi che nel 1D BN-PAGE comigravano nella stessa banda, ora, con l'introduzione di una prima dimensione di focalizzazione, sono stati suddivisi in più bande. Questo *split* ha migliorato anche la qualità delle identificazioni ottenute mediante LC-MS/MS. In figura 3.7 sono comparate le correnti ioniche totali (TIC) ottenute dai peptidi ricavati dalla digestione triptica della banda 1 del gel di figura 3.1 (pannello A) e quelle ricavate dalla digestione delle bande 1 (pannello B) e 2 (pannello C) del gel mostrato di figura 3.5. Si vede chiaramente come la somma dei peptidi delle bande dei pannelli B e C sia maggiore di quelli della banda del pannello A.

Tale evidenza può essere spiegata ammettendo una maggiore efficacia dell'enzima di digestione (la tripsina), nel momento in cui i complessi sono sottoposti alla sua azione in modo frazionato. La produzione di un numero maggiore di peptidi innalza conseguentemente la qualità dell'identificazione LC-MS/MS.

Nella banda 1 (565 kDa, pI  $4.49 \pm 0.25$ , vedi tabella 2) della figura 3.5 sono state identificate solo componenti proteiche dell'ATPase. Questo ci ha fatto dedurre che in tale banda è stato isolato il complesso multiproteico dell'ATPase nella sua forma nativa. L'analisi LC-MS/MS della banda 2 (565 kDa, pI  $4.62 \pm 0.18$ ) ha invece portato all'identificazione di 8 proteine del fotosistema I (PsaA, PsaB, PsaD, PsaE, PsaF, PsaL, Lhca3, Lhca4) più due proteine del fotosistema II (CP47 e D2), suggerendo che in questo caso vi sia stata la comigrazione dell'intero fotosistema I (RCI+Lhca) e del dimero del core del fotosistema II. Le bande numero 3 e 4 (453 kDa, pI  $4.99 \pm 0.15$ ,  $5.63 \pm 0.25$ ) sono state identificate entrambe come il core del PSI. La presenza di tale complesso in entrambe le bande adiacenti, può essere spiegata con un elevato effetto di diffusione dovuto all'alto valore di concentrazione proteica della frazione 10. Nella banda 5 (292 kDa, pI  $4.62 \pm 0.18$ ) a comigrare erano invece il core del fotosistema II insieme al dimero del citocromo  $b_6/f$ . La banda 6 (193



**Figure 3.7.** Corrente ionica totale (TIC) ottenuta correndo in LC-MS/MS i peptide originati dalla digestione triptica in gel della banda 1 del gel di figura 3.1 (pannello A) e delle bande 1 (pannello B) e 2 (Pannello C) del gel di figura 3.5.

kDa,  $pI\ 4.62\pm 0.18$ ) conteneva invece il core del PSII privato della proteina CP43, una specie di complesso normalmente presente nelle membrane tilacoidali. Sorprendentemente le bande 7, 8, e 9 (148 kDa,  $pI\ 3.85\pm 0.12$ ,  $4.01\pm 0.09$ ,  $4.31\pm 0.15$ ) sono state tutte identificate come trimeri delle LhcII. In questo caso nessun fenomeno di diffusione può spiegare la presenza di più bande, inoltre le identificazioni LC-MS/MS hanno dimostrato la presenza delle specie Lhcb1 e Lhcb3 in tutte e tre le bande mentre la specie Lhcb3 sembra essere presente solo nelle bande 7 e 8 e non nella banda 9. Queste osservazioni sembrano avvalorare la tesi proposta Jackowski e collaboratori [110] che prevede l'esistenza di diverse isoforme del complesso multiproteico dei trimeri delle LhcII, caratterizzate da una diversa composizione di proteine LhcII. La banda 10 (135 kDa,  $pI\ 5.63\pm 0.25$ ) è

stata identificata con la forma monomerica del citocromo  $b_6/f$ , mentre le bande 11 e 12 (105 kDa, pI  $4,99 \pm 0.15$ ,  $5.63 \pm 0.25$ ) sembravano contenere solo la proteina CP43 in forma libera. In queste bande, CP43 deve comunque essere in forma dimerica, dato che il peso molecolare apparente delle bande 11 e 12 è stato stimato intorno ai 105 kDa mentre CP43 monomerica possiede un peso molecolare di soli 52 kDa. Per finire, le bande 13, 14 e 15 hanno dimostrato contenere la forma monomerica delle antenne minori del PSII (85 kDa, pI  $3.85 \pm 0.12$ ,  $4.01 \pm 0.09$ ,  $4.31 \pm 0.15$ ). In questo caso il diverso valore del pI delle tre bande può essere spiegato con la comigrazione (in forma monomerica) di differenti specie proteiche del tipo LhcII 4-LhcII5-LhcII6.

Le identificazioni delle bande di figura 3.5 hanno dimostrato che il nuovo sistema elettroforetico presenta ancora qualche forma di comigrazione, ma al tempo stesso hanno anche confermato l'isolamento di importanti complessi della membrana tilacoidali (come l'ATPase e il citocromo  $b_6/f$ ). Tutti i complessi sono stati identificati allo stesso valore di massa molecolare apparente valutato in 1D BN-PAGE, il che implica che la 2D N-LP-IEF-BN-PAGE è applicabile per lo studio di tutti quei proteomi nativi i cui complessi multiproteici sono stabili al proprio pI nativo. Per pI nativo si intende quel valore di pH per il quale la carica netta del complesso multiproteico, nell'integrità della sua struttura quaternaria, risulta nulla. Tale valore dipende solo ed esclusivamente dalle catene laterali degli aminoacidi esterni che si trovano all'interfaccia con l'ambiente acquoso. Per esempio a dimostrazione di ciò possiamo considerare il caso dell'ATPase, che nella 2D N-LP-IEF-BN-PAGE ha dimostrato avere un pI nativo di  $4.62 \pm 0.18$ , mentre il pI delle diverse specie proteiche componenti oscilla tra 4.94 e 9.04 (con una media aritmetica di 6.35).

**Tabella 2. Complessi identificati nel 2D N-LP-IEF-BN-PAGE di tilacoidi di spinacio.** Ogni banda contiene uno o più complessi mutiproteici riconosciuti sulla base delle proteine costituenti identificate. Il numero delle bande si riferisce alla figura 3.5.

**Banda1, 565 kDa, pI 4.49 ± 0.25: ATPase**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS			Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	
ATPase subunit alpha [Spinacia oleracea]	800.02	(2+)	26 – 41	gi 126022791
	708.97	(2+)	95 – 107	
	768.46	(2+)	203 – 216	
	396.78	(2+)	457 – 462	
	541.37	(3+)	467 – 480	
	626.32	(2+)	48 – 491	
ATPase subunit beta [Spinacia oleracea]	646.46	(2+)	40 – 50	gi 11497535
	596.33	(2+)	76 – 87	
	652.50	(3+)	110 – 127	
	589.89	(2+)	135 – 145	
	504.72	(2+)	146 – 154	
	523.44	(2+)	155 – 163	
	488.40	(2+)	168 – 178	
	443.32	(3+)	192 – 205	
	759.16	(2+)	218 – 231	
	809.45	(2+)	232 – 246	
	744.43	(2+)	249 – 261	
	717.45	(2+)	278 – 291	
766.85	(3+)	292 – 312		
693.06	(3+)	360 – 378		
482.00	(3+)	379 – 390		
ATPase delta chain [Arabidopsis thaliana]	573.44	(2+)	149 - 158	gi 15233985
ATP synthase CF1 epsilon subunit [Arabidopsis thaliana]	488.34	(2+)	13 - 20	gi 7525039
	822.04	(2+)	69 - 83	
	564.92	(2+)	111 - 120	
ATP synthase gamma chain [Arabidopsis thaliana]	514.90	(2+)	127 - 136	gi 18412632
	670.42	(2+)	137 – 148	
	494.33	(2+)	180 – 187	
	582.39	(2+)	188 – 198	
	766.02	(2+)	232 - 245	
	679.27	(2+)	316 – 328	
	553.56	(2+)	329 – 344	
485.29	(2+)	345 - 352		
ATP synthase CF0 B subunit [Arabidopsis thaliana]	364.90	(2+)	60 - 65	gi 7525019
	614.90	(2+)	72 - 82	
	533.87	(2+)	97 - 105	

**Banda 2, 565 kDa, pI 4.62 ± 0.18: PSI (RCI+LHCI) / PSII dimeric core**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS			Numero di accesso NCBI	
	m/z	carica	Inizio-fine		Sequenza
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 [Spinacia oleracea]	527.90	(2+)	12 - 20	<b>ILVDRDPVK</b> <b>YADFLTFR</b> <b>YNDLLDR</b> <b>ALSIVQGR</b>	gi 11497525
	516.86	(2+)	269 - 276		
	454.83	(2+)	420 - 426		
	422.38	(2+)	716 - 723		
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 [Spinacia oleracea]	660.93	(2+)	8 - 19	<b>FSQGLAQDPTTR</b> <b>FSQGLAQDPTTRR</b> <b>TNFGIGHSMKD Oxidation (M)</b> <b>DLLEAHIPPGR</b> <b>DYNPEQNEDNVLAR</b> <b>DFGYSFPCDGPR</b> <b>TPLANLIR</b> <b>DKPVALSIVQAR</b>	gi 11497524
	493.02	(3+)	8 - 20		
	554.33	(2+)	293 - 302		
	425.67	(2+)	303 - 314		
	838.91	(2+)	397 - 410		
	737.85	(2+)	552 - 564		
	449.40	(2+)	685 - 692		
649.43	(2+)	695 - 706			
Photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor (Photosystem I 20 kDa subunit) (PSI-D)	561.73	(3+)	107 - 121	<b>EQIFEMPTGAAIMR 2 Oxidation (M)</b> <b>INYQFYR</b> <b>VFPNGEVQYLHPK</b>	gi 131166
	502.33	(2+)	148 - 154		
	509.99	(2+)	155 - 167		
Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor (PSI-E)	603.41	(3+)	35-54	<b>AAEEAAAAPAAASPEGEAPK</b> <b>KAAAKPPPIGPKR</b> <b>GVGSVVAVDQDPK</b>	gi 131178
	523.75	(2+)	55-65		
	635.93	(2+)	82 - 94		
Photosystem I reaction center subunit III, chloroplast precursor (Light- harvesting complex I 17 kDa protein) (PSI-F) [Spinacia oleracea]	674.44	(2+)	108 - 120	<b>LYADDSAPALAIK</b> <b>GFSWPVAAAYR</b>	gi 131187
	577.34	(2+)	210 - 219		
Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplast precursor (PSI-L) (PSI subunitV)	756.48	(2+)	157 - 171	<b>EGEPSIAPALTLTGR</b> <b>QPDQLQSADGWAK</b>	gi 3914473
	722.32	(2+)	174 - 186		
LHCA3 (Photosystem I light harvesting complex gene 3); chlorophyll binding [Arabidopsis]	646.41	(2+)	95 - 105	<b>WLAYGEIINGR</b> <b>FAMLGAAGAIPEILGK</b> <b>LQDWYNPGSMGK Oxidation (M)</b> <b>QYFLGLEK Gln-&gt;pyro-Glu (N-term Q)</b>	gi 15219941
	815.62	(2+)	106 - 122		
	706.40	(2+)	171 - 182		
	490.39	(2+)	183 - 190		

thaliana]					
LHCA4 (Photosystem I light harvesting complex gene 4); chlorophyll binding [Arabidopsis thaliana]	662.74 658.44	(3+) (2+)	158 - 174 163 - 174	<b>WQDIKNPGSVNQDPIFK</b> <b>NPGSVNQDPIFK</b>	gi 30692874
Photosystem II 47 kDa protein [Spinacia oleracea]	403.03 663.90 656.71 905.95 743.34 352.62	(2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+)	8 - 18 58 - 68 287 - 304 288 - 304 309 - 321 379 - 384	<b>VHTVVLNDPGR</b> <b>QGMFVIPMTR Oxidation (M)</b> <b>RVSAGLAENQSFSEAWSK</b> <b>VSAGLAENQSFSEAWSK</b> <b>LAFYDYIGNNPAK</b> <b>ADVPPFR</b>	gi 11497552
Photosystem II D2 protein (Photosystem Q(A) protein) (PSII D2 protein)	613.80 774.46	(2+) (2+)	296 - 305 306 - 318	<b>AYDFVSQEIR</b> <b>AAEDPEFETFYTK</b>	gi 131296

**Banda 4\*, 453 kDa, pI 5.63 ± 0.25: PSI core**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 [Spinacia oleracea]	528.39 541.05 516.87 454.82	(2+) (3+) (2+) (2+)	12 - 20 21 - 34 269 - 276 420 - 426	<b>ILVDRDPVK</b> <b>TSFEAWAKPGHFSR</b> <b>YADFLTFR</b> <b>YNDLLDR</b>	gi 11497525
Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 [Spinacia oleracea]	660.93 493.02 554.33 425.67 838.91 737.85 449.40 649.43	(2+) (3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+)	8 - 19 8 - 20 293 - 302 303 - 314 397 - 410 552 - 564 685 - 692 695 - 706	<b>FSQGLAQDPTTR</b> <b>FSQGLAQDPTTRR</b> <b>TNFGIGHSMKD Oxidation (M)</b> <b>DLLEAHIPPGR</b> <b>DYNPEQNEDNVLAR</b> <b>DFGYSFPCDGPGR</b> <b>TPLANLIR</b> <b>DKPVALSIVQAR</b>	gi 11497524
Photosystem I subunit VII (PSI-C) [Arabidopsis thaliana]	823.42	(2+)	7 - 19	<b>IYDTCIGCTQCVR</b>	gi 7525086
PSAD-1 (photosystem I subunit D-1) [Arabidopsis thaliana]	841.92 588.42 524.38 437.27 443.33	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	107 - 121 132 - 141 133 - 141 180 - 187 192 - 199	<b>EQIFEMPTGGAAIMRE 2 Oxidation (M)</b> <b>KEQCLALGTR</b> <b>EQCLALGTR</b> <b>EGVGLNMR</b> <b>NVSPIEVK</b>	gi 15235503
PSAD-2 (photosystem I subunit D-2) [Arabidopsis thaliana]	561.73 509.99 529.86	(3+) (3+) (2+)	103 - 117 151 - 163 196 - 204	<b>EQIFEMPTGGAAIMR 2 Oxidation (M)</b> <b>VFPNGEVQYLHPK</b> <b>FTGKQSYDL</b>	gi 15218708

Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor (PSI-E)	905.01 523.93 635.94	(2+) (2+) (2+)	35 - 54 55 - 65 82 - 94	<b>AAEEAAAAPAAASPEGEAPK AAAKPPPIGPK GVGSVVAVDQDPK</b>	gi 131178
PSAF (photosystem I subunit F) [Arabidopsis thaliana]	633.80 590.37	(3+) (2+)	98 - 115 200 - 209	<b>LYAPESAPALALNAQIEK GFIWPVAAAYR</b>	gi 15221681
PSAH-1 (photosystem I subunit H-1) [Arabidopsis thaliana]	653.43	(2+)	89 - 99	<b>FFETFAAPFTK</b>	gi 15233291
Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplast precursor (PSI-L) (PSI subunit V)	442.34 756.48 722.40	(2+) (2+) (2+)	93 - 100 157 - 171 174 - 186	<b>TAVNPLLR EGEPSIAPALTLTGR QPDQLQSADGWAK</b>	gi 3914473
PSAN (photosystem I reaction center subunit PSI-N); calmodulin binding [Arabidopsis thaliana]	763.95 612.44 854.01	(2+) (3+) (2+)	128 - 140 143 - 158 144 - 158	<b>FPENFTGCQDLAK KVPFISEDIALECEGK VPFISEDIALECEGK</b>	gi 15237593

\*Stessa identificazione per la banda numero 3 (PSI core, 453 kDa, pI 4.99 ± 0.15).

### Banda 5, 292 kDa, pI 4.62 ± 0.18: PSII core / dimeric Cyt b<sub>6</sub>f

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Photosystem Q(B) protein (32 kDa thylakoid membrane protein) (Photosystem II protein D1)	714.35 730.06 730.18 657.87 429.19	(2+) (3+) (2+) (2+) (3+)	17 - 27 239 - 257 258 - 269 313 - 323 324 - 334	<b>FCDWITSTENR FGQEEETYNIVAAHG YFGR LIFQYASFNNR VINTWADIINR ANLGMEVMHERN Oxidation (M)</b>	gi 1709829
Photosystem II 47 kDa protein [Spinacia oleracea]	403.03 671.89 656.71 905.95 743.34 352.62 723.91 645.43	(3+) (2+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	8 - 18 58 - 68 287 - 304 288 - 304 309 - 321 379 - 384 423 - 434 424 - 434	<b>VHTVVLNDPGR QGMFVIPMTRL Oxidation (M) RVSAGLAENQSFSEAWSK VSAGLAENQSFSEAWSK LAFYDYIGNNPAK ADV PFR RAQLGEIFELDR AQLGEIFELDR</b>	gi 11497552
Photosystem II 44 kDa protein [Spinacia oleracea]	713.92 740.88 491.81 536.31	(2+) (2+) (2+) (2+)	324 - 339 344 - 357 363 - 370 383 - 390	<b>LGANVGS AQGPTGLGK SPTGEVIFGGETMR APWLEPLR DIQPWQER</b>	gi 11497521

	382.71 902.53	(2+) (3+)	450 - 457 458 - 473	<b>AAAAGFEK</b> <b>GIDRDFEPVLSMTPLN</b>	
Photosystem II protein D2 [Spinacia oleracea]	714.83 682.73 614.36 774.37 521.41	(2+) (3+) (2+) (2+) (2+)	14 - 24 235 - 252 296 - 305 306 - 318 319 - 327	<b>DLFDSMDDWLRR Oxidation (M)</b> <b>AFNPTQAEETYSMTANR.F Oxidation (M)</b> <b>AYDFVSQEIR</b> <b>AAEDPEFETFYTK</b> <b>NILLNEGIR</b>	gi 11497520
Cytochrome b559 component psbE - beet chloroplast	561.90 743.38	(2+) (2+)	44 - 53 105 - 116	<b>SFADIITSIR</b> <b>FDSLEQLDEFSR</b>	gi 7514666
PSBO-2/PSBO2 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT O-2); oxygen evolving [Arabidopsis thaliana]	626.92 548.91 681.93 566.41 765.45 476.36 781.98 688.33 459.72 602.46 868.91	(2+) (2+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (3+) (2+) (2+) (3+)	90 - 99 91 - 99 135 - 145 152 - 161 187 - 207 208 - 215 247 - 263 264 - 275 276 - 287 291 - 315 322 - 331	<b>RLTYDEIQSK</b> <b>LTYDEIQSK</b> <b>FCFEPTSFTVK</b> <b>NAPPDFQNTK</b> <b>FKEEDGIDYAAVTVQLPGER</b> <b>VPFLFTVK</b> <b>GGSTGYDNAVALPAGGR</b> <b>GDEEELSKENVK</b> <b>NTAASVGEITLK</b> <b>SKPETGEVIGVFESLQPSDTDLGAK</b> <b>IQGVWYGQIE</b>	gi 15230324
Rieske FeS-precursor [Spinacia oleracea]	757.94 380.80	(2+) (2+)	125 - 138 146 - 152	<b>DALGNDVIAAEWLK</b> <b>TLTQGLK</b>	gi 21311
Apocytochrome f precursor	560.36 617.97 594.66 477.36 492.27	(3+) (2+) (3+) (2+) (2+)	132 - 145 146 - 157 221 - 236 237 - 244 313 - 320	<b>IGNLSFQNYRPNKK</b> <b>NILVIGPVPQK</b> <b>EKGGYEITVDASNER</b> <b>QVIDIIPR</b> <b>VQLSEMNF Oxidation (M)</b>	gi 544122

**Banda 6, 193 kDa, pI 4.62 ± 0.18: PSII core less CP43**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
PSAD-1 (photosystem I subunit D-1) [Arabidopsis thaliana]	841.92 588.42 524.38 437.27 443.33	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	107 - 121 132 - 141 133 - 141 180 - 187 192 - 199	<b>EQIFEMPTGGAAIMRE 2 Oxidation (M)</b> <b>KEQCLALGTR</b> <b>EQCLALGTR</b> <b>EGVGLNMR</b> <b>NVSPIEVK</b>	gi 15235503
PSAD-2 (photosystem I subunit D-2) [Arabidopsis thaliana]	561.73 509.99 529.86	(3+) (3+) (2+)	103 - 117 151 - 163 196 - 204	<b>EQIFEMPTGGAAIMR 2 Oxidation (M)</b> <b>VFPNGEVQYLHPK</b> <b>FTGKQSYDL</b>	gi 15218708
CP47 [Spinacia oleracea]	656.34 723.95 729.36 751.80 352.69 724.45 645.93	(3+) (3+) (3+) (2+) (2+) (2+) (2+)	290 - 307 330 - 350 361 - 381 362 - 381 362 - 381 382 - 387 426 - 437	<b>RVSAGLAENQSFSEAWSK</b> <b>AGSMDNGDGI AVGWLGHPIFR</b> <b>RMPTFFETFPVVLIDGDGIVR</b> <b>MPTFFETFPVVLIDGDGIVR</b> <b>ADV PFR</b> <b>RAQLGEIFELDR</b> <b>AQLGEIFELDR</b>	gi 1420852

**Banda 7, 148 kDa, pI 3.85 ± 0.12: Trimeric LHCII**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.1 [Spinacia oleracea]	711.30	(2+)	44 - 56	<b>NVSSGSPWYG PDR</b> <b>NRELEVIHCR</b> <b>ELEVIHCR</b> <b>FGAEVWFK</b>	gi 133917263
	663.39	(2+)	96 - 105		
	528.35	(2+)	127 - 134		
	492.24	(2+)	98 - 105		
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.2 [Spinacia oleracea]	711.30	(2+)	44 - 56	<b>NVSSGSPWYG PDR</b> <b>NRELEVIHCR</b> <b>ELEVIHCR</b>	gi 133917261
	663.39	(2+)	96 - 105		
	528.35	(2+)	127 - 134		
Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplast precursor (LHCII type I CAB-13) (LHCP)	528.35	(2+)	97 - 104	<b>KLEVIHCR</b> <b>FGAEVWFK</b>	gi 115774
	492.24	(2+)	126 - 133		
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.3 [Spinacia oleracea]	740.41	(2+)	44 - 56	<b>TVQSSSPWYG PDR</b> <b>FGAEVWFK</b>	gi 133918011
	492.35	(2+)	127 - 134		
Chlorophyll a-b binding protein 48, chloroplast precursor (LHCII type I CAB-48) (LHCP)	672.36	(3+)	35 - 53	<b>TAAKPKPARSGSPWYGADR</b> <b>NRELEVIHCR</b> <b>ELEVIHCR</b>	gi 543938
	663.39	(2+)	93 - 102		
	528.35	(2+)	95 - 102		
Lhcb2 protein [Arabidopsis thaliana]	544.66	(3+)	43 - 56	<b>STPQSIWYG PDRPK</b> <b>NRELEVIHSR</b> <b>ELEVIHSR</b> <b>FGAEVWFK</b>	gi 4741944
	418.30	(2+)	94 - 103		
	322.22	(3+)	96 - 103		
	492.33	(2+)	125 - 132		

**Banda 8, 148 kDa, pI 4.01 ± 0.09: Trimeric LHCII**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP) [Spinacia oleracea]	740.36	(2+)	44 - 56	<b>TVQSSSPWYG PDR</b>	gi 115780
Lhcb2 protein [Arabidopsis thaliana]	418.30	(2+)	94 - 103	<b>NRELEVIHSR</b> <b>ELEVIHSR</b> <b>FGAEVWFK</b>	gi 4741944
	322.22	(3+)	96 - 103		
	492.33	(2+)	125 - 132		

Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.1 [Spinacia oleracea]	711.30 663.39 528.35	(2+) (2+) (2+)	44 - 56 96 - 105 127 - 134	NVSSGSPWYGPDR NRELEVIHCR ELEVIHCR	gi 133917263
---	----------------------------	----------------------	----------------------------------	---	--------------

**Banda 9, 148 kDa, pI 4.31 ± 0.15: Trimeric LHCII**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP) [Spinacia oleracea]	740.36 492.35	(2+) (2+)	44 - 56 127 - 134	TVQSSSPWYGPDR FGAEVWFK	gi 115780
Major chlorophyll a/b binding protein LHCb1.3 [Spinacia oleracea]	740.41 492.35	(2+) (2+)	44 - 56 127 - 134	TVQSSSPWYGPDR FGAEVWFK	gi 133918011
Chlorophyll a-b binding protein 1, chloroplast precursor (LHCII type I CAB-1) (LHCP) [Zea mays]	418.27 492.32	(2+) (3+)	91 - 100 122 - 129	NRELEVIHSR FGAEVWFK	gi 115771
Lhcb2 protein [Arabidopsis thaliana]	418.30 322.22 492.33	(2+) (3+) (2+)	94 - 103 96 - 103 125 - 132	NRELEVIHSR ELEVIHSR FGAEVWFK	gi 4741944

**Banda 10, 135 kDa, 5.63 ± 0.25: Monomeric Cyt b<sub>6</sub>f**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Cytochrome f [Spinacia oleracea]	503.93 519.24 482.84 784.92 719.44 470.89 679.42	(2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+) (2+)	86 - 93 181 - 189 192 - 200 201 - 215 223 - 236 237 - 244 245 - 257	IPYDMLK YPIYVGGNR GQIYPDGSK SNNTVYNSTATGIVK GGYEINIADASDGR EVVDIIPR GPELLVSEGESIK	gi 11497541
Rieske FeS-precursor [Spinacia oleracea]	757.60	(2+)	125 - 138	DALGNDVIAAEWLK	gi 21311

**Banda 11\*, 105 kDa, pI 4.99 ± 0.15: CP 43**

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Photosystem II 44 kDa protein [Spinacia oleracea]	855.37	(2+)	27 - 41	<b>DQETTGFVWAGNAR</b>	gi 11497521
	713.84	(2+)	324 - 339	<b>LGANVGSAAQGTGLGK</b>	
	740.52	(2+)	344 - 357	<b>SPTGEVIFGGETMR</b>	
	494.35	(2+)	363 - 370	<b>APWLEPLR</b>	
	491.36	(2+)	371 - 379	<b>GPNGLDLSR</b>	
	464.18	(2+)	383 - 390	<b>DIQPWQER</b>	
	536.34	(2+)	458 - 473	<b>GIDRDFEPVLSMTPLN Oxidation (M)</b>	
910.44	(2+)	462 - 473	<b>DFEPVLSMTPLN Oxidation (M)</b>		

\* Stessa identificazione per la banda numero 12 (CP 43, 105 kDa, pI 5.63 ± 0.25).

### Banda 13, 85 kDa, pI 3.85 ± 0.12: Monomeric LHCII

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Light-harvesting chlorophyll a/b- binding protein	710.99	(2+)	44 - 56	<b>NVSSGSPWYGPDNR</b>	gi 133918011
	418.37	(3+)	96 - 105	<b>NRELEVIHSR</b>	
	491.84	(2+)	98 - 105	<b>ELEVIHSR</b>	
	491.89	(2+)	127 - 134	<b>FGEAVWFK</b>	
LHCB5 (LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5); chlorophyll binding [Arabidopsis thaliana]	579.89	(2+)	69 - 78	<b>IFLPDGLLDR</b>	gi 15235029
	624.38	(2+)	110 - 119	<b>YQAFELIHAR</b>	
	749.95	(2+)	137 - 149	<b>YGANCGPEAVWFK</b>	
	709.97	(2+)	200 - 213	<b>LHPGGPFDPLGLAK</b>	
	485.82	(2+)	214 - 222	<b>DPEQGALLK</b>	
709.11	(3+)	257 - 276	<b>HLSDPFGNNLLTVIAGTAER</b>		
Lhcb6 protein [Brassica rapa subsp. pekinensis]	532.82	(2+)	195 - 204	<b>FFDPLGLAGK</b>	gi 50313237
	476.27	(2+)	207 - 214	<b>DGVYEPDR</b>	
	604.30	(3+)	207 - 216	<b>DGVYEPDREK</b>	
	407.84	(2+)	220 - 226	<b>LKLAEIK</b>	
LHCB4.2 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII) [Arabidopsis thaliana]	878.54	(2+)	118 - 132	<b>STPFQPYSEVFLQR</b>	gi 15231990
	439.58	(3+)	133 - 142	<b>FRECELIHGR</b>	
	703.45	(2+)	219 - 231	<b>FFDPLGLASDPVK</b>	
	507.33	(2+)	233 - 241	<b>AQLQLAEIK</b>	

### Banda 14, 85 kDa, pI 4.01 ± 0.09: Monomeric LHCII

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS				Numero di accesso NCBI
	m/z	carica	Inizio-fine	Sequenza	
Lhcb6 protein [Arabidopsis thaliana]	640.03	(2+)	177 - 194	<b>TAENFANYTGDQGYPGGR</b>	gi 4741960
	403.27	(2+)	207 - 216	<b>DGVYEPDREK</b>	

chlorophyll a/b-binding protein CP26 in PS II [Brassica juncea]	559.85	(2+)	54 - 64	TVSAADELAK IFLPDGLLDR YQAFELIHAR YQAFELIHAR YGANCGPEAVWFK TGALLLDGNTLSYFGK	gi 1644289
	579.89	(2+)	72 - 81		
	624.38	(2+)	113 - 122		
	749.95	(2+)	123 - 139		
	835.52	(2+)	140 - 152		
	908.05	(2+)	153 - 168		

### Banda 15, 85 kDa, pI 4.31 ± 0.15: Monomeric LHCII

Identificazione	Peptidi identificati con MS/MS			Numero di accesso NCBI	
	m/z	carica	Inizio-fine		Sequenza
chlorophyll a/b binding protein Lhcb4 [Brassica oleracea]	640.38	(2+)	44 - 55	GPSGSPWYGSER NRELEVIHCR ELEVIHCR Glu->pyro-Glu (N-term E) FGEAVWFK	gi 31323256
	633.50	(2+)	95 - 104		
	346.60	(2+)	97 - 104		
	492.24	(2+)	126 - 133		
chlorophyll a/b-binding protein CP29 [Arabidopsis thaliana]	508.36	(2+)	104 - 113	FRECELIHGR STPFQPYSEVFGIQR NLAGDVIGTR	gi 13877547
	878.51	(2+)	121 - 135		
	439.62	(2+)	136 - 145		

### 3.3.5 3D N-LP-IEF-BN-SDS-PAGE

Ognuna delle bande delle 2D N-LP-IEF-BN-PAGE è stata tagliata dal gel di seconda dimensione ed analizzata su di un gel denaturante di terza dimensione. In questo modo è stato possibile valutare su gel la composizione polipeptidica di ogni singolo complesso isolato nella 2D nativa. Tale procedura è stata attuata anche per confermare le identificazioni ottenute sfruttando LC-MS/MS. In figura 8 sono comparate la 3D N-LP-IEF-BN-SDS-PAGE (pannello A) con una classica 2D BN-SDS-PAGE (pannello B). In entrambi i casi si è ottenuta una distribuzione delle proteine costituenti i complessi multiproteici tilacoidali sulla base della loro massa molecolare apparente, ma, come si vede, la distribuzione delle bande nel gel di terza dimensione risulta molto più chiara e nitida rispetto a quella della 2D BN-SDS-PAGE. Questo aumento di risoluzione ha permesso l'identificazione di un numero maggiore di componenti dell'ATPase e del citocromo  $b_6/f$ . La linea 1 del gel in figura 3.8 A contiene, infatti 9 bande tutte derivanti dalla denaturazione del complesso dell'ATPase [111]. Diversamente, solo 4 sub unità dell'ATPase sono state identificate nel gel di 2D BN-SDS-PAGE (figura 3.8 B). La linea 2 contiene 15-20 bande tutte identificabili con polipeptidi dei fotosistemi I e II. Sempre 15-20 bande derivano invece dalla denaturazione del core del fotosistema I (linee 3 e 4),



mentre la linea 5 contiene 20 bande derivanti dal core del fotosistema II e dal dimero del citocromo  $b_6/f$ . Si prosegue poi con la linea 6 che contiene tutte le componenti del fotosistema II tranne CP43. Interessante è la linea 10 che mostra 6 bande originatesi dalla forma monomeric del citocromo  $b_6/f$  (nel 2D BN-SDS-PAGE sono stati identificati solo 4 polipeptidi appartenenti a tale complesso). A conferma di quanto dimostrato dalla spettrometria di massa, le linee 11 e 12 contengono una sola banda (CP43). Sempre in linea con i dati di LC-MS/MS, le linee 7 ed 8 contengono 3 bande (Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3), mentre la linea 9 ne contiene solo 2 (Lhcb1 e Lhcb2). Questo dimostra inequivocabilmente che le bande 7, 8 e 9 della 2D N-LP-IEF-SDS-PAGE corrispondono a tre differenti stati di aggregazione della forma trimerica delle LhcII, ognuno con un differente pI nativo, ma tutti con la stessa massa molecolare apparente. La banda 13 così come la 14 contengono prevalentemente le antenne minori CP24 e CP26 del fotosistema II, mentre nella banda 15 sembrano comigrate le antenne CP24 e CP29.

Tali evidenze sperimentali possono portare alla conclusione che la pre-separazione dei complessi multiproteici delle membrane tilacoidali sulla base del loro pI nativo, non solo permette l'isolamento dei complessi ATPase e citocromo  $b_6/f$  ma, rispetto ad un normale 2D BN-SDS-PAGE, migliora anche l'identificazione delle singole componenti proteiche costituenti i complessi stessi.

### **3.3.6 Conclusioni**

Il nuovo sistema elettroforetico nativo qui proposto è il primo esempio di elettroforesi bidimensionale in cui le condizioni native sono state mantenute sia in prima che in seconda dimensione. Questo permette la caratterizzazione per pI e massa molecolare nativi dei complessi multiproteici di un proteoma. Come dimostrato, alla seconda dimensione nativa può seguire una terza dimensione denaturante in grado di separare le specie proteiche costituenti i complessi sulla base della loro massa molecolare apparente. Per una risoluzione ancora maggiore è possibile trattare le bande ottenute dalla 2D N-LP-IEF-BN-PAGE con una 2D IEF-SDS-PAGE sviluppando così un sistema a 4 dimensioni, che tenendo conto dei limiti della focalizzazione in condizioni denaturanti, può in linea teorica rappresentare il massimo sistema elettroforetico fino ad oggi concepito. Non solo, i

complessi contenuti nelle bande del gel di 2D N-LP-IEF-BN-PAGE possono essere elettro-eluiti ed analizzati in soluzione mediante un sistema HPLC. Le membrane tilacoidali sono state nel nostro caso solo un modello, scelto sulla base della complessità di analisi che normalmente tale proteoma idrofobico richiede. Quindi in linea di principio il nuovo sistema elettroforetico può essere applicato a qualsiasi proteoma nativo costituito da complessi multiproteici, unica limitazione è che tali complessi siano stabili al loro punto isoeltrico nativo.

Con la 2D N-LP-IEF-BN-PAGE è stato proposto un nuovo strumento che apre nuove possibilità nello studio dei proteomi nativi, costituendo così un valido strumento per molte indagini di proteomica funzionale. Il concetto di base non è più quello di identificare più proteine possibili senza conoscerne struttura e funzione, bensì identificare proteine correlando la loro funzione al contesto del proteoma nativo nel quale queste sono inserite.

---

**BIBLIOGRAFIA****CAPITOLO 1**

- [1] Kenyon, G. L., Demarini, D. M., Fuchs, E., Galas, D. J., Kirsch, J. F., Leyh, T. S., Moos, W. H., Petsko, G. A., Ringe, D., Rubin, G. M., Sheahan L. C. (2002) Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol. Cell Proteom.* **1**: 763-780.
- [2] Pandey, A., Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**: 837-846.
- [3] Reinders J, Lewandrowski U, Moebius J, Wagner Y, Sickmann A. (2004) Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics.* **4**: 3686-3703.
- [4] Wittmann-Liebold, B., Graack, H. R., Pohl T. (2006) Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics.* **6**: 4688-4703.
- [5] Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* **4**: 3665-3685.
- [6] Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P., Vad, C. (2004) 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev Proteomics.* **1**: 37-46. Review.
- [7] Nesvizhskii, A. I. (2007) Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol.* **367**: 87-119.
- [8] Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E., Engelhard, V. H., (1992) Characterization of peptides bound to the class I MCH molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255**: 1261-1263.
- [9] Yates III, J. R., McCormack, A. L., Schieltz, D., Carmack, E., Link, A. (1997) Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry. *J. Prot. Chem.* **16**: 495-497.
- [10] Wolters, D. A., Washburn, M. P., Yates III, J. R. (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics.

- Anal. Chem.* **73**: 5683-5690.
- [11] Washburn, M. P., Wolters, D., Yates III, J. R. (2001) Large scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**: 242-247.
- [12] Langen, H., Takacs, B., Evers, S., Berndt, P., Lahm, H. W., Wipf, B., Gray, C., Foutoulakis, M. (2000) Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* **21**: 411-429.
- [13] Smith, R. D., Pasa-Tolic, L., Lipton, M. S., Jensen, P. K., Anderson, G. A., Shen, Y., Conrads, T. P., Udseth, H. R., Harkewicz, R., Belov, M. E., Masselon, C., Veenstra, T. D. (2001) Rapid quantitative measurements of proteomes by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**: 1652-1668.
- [14] Smith, R. D., Anderson, G. A., Lipton, M. S., Pasa-Tolic, L., Shen, Y., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Udseth, H. R. (2002) An accurate mass tag strategy for quantitative and high throughput proteome measurements. *Proteomics* **2**: 513-523.
- [15] Jensen, P. K., Pasa-Tolic, L., Peden, K. K., Anderson, G. A., Tolic, N., Horner, J. A., Lipton, M. S., Bruce, J. E., Smith, R. D. (1999) Probing proteomes using capillary isoelectric focusing-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71**: 2076-2084.
- [16] Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1**: 377-396.
- [17] Unlu, M., Morgan, M. E., Minden, J. S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**: 2071-2077.
- [18] Tekirian, T. L., Thomas, S. N., Yang, A. (2007) Advancing signaling networks through proteomics. *Expert Rev Proteomics*. **4**: 573-583.
- [19] Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E. (2006) Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics*. **6**: 5385-5408.

- [20] Marouga, R., David, S., Hawkins, E. (2005) The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* **382**: 669-678.
- [21] Jorriin, J. V., Maldonado, A. M., Castillejo, M. A. (2007) Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics.* **7**: 2947-2962.
- [22] Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D., Chait, B. T. (1999) Accurate quantitation of protein expression and site specific phosphorylation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **8**: 6591-6596.
- [23] Krishna, R. G., Wold, F. (1993) Post-translational modifications of proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **67**: 265-298.
- [24] Mann, M., Jensen, O. N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**(3): 255-261.
- [25] MacCoss, M. J., McDonald, W. H., saraf, A., Sadygov, R., Clark, J. M., Tasto, J. J., Gould, K. L., Wolters, D., Washburn, M., Weiss, A., Clark, J. I., Yates III, J. R. (2002) Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 7900-7905.
- [26] Aebersold, R., Goodlett, D. R. (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chemical Reviews* **101**: 269-295.
- [27] Wallin, E., von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**: 1029-1038.
- [28] Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Nelissen, B., Goffeau, A., Saier M. H. Jr. (1998) Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **430**: 116-125.
- [29] Kashino, Y. Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. (2003) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 **797**: 191-216.
- [30] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- [31] Braun R. J., Kinkl, N., Beer, M., Ueffing, M. (2007) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem.* Aug 7; [Epub

ahead of print]

- [32] Rabilloud, T., Luche, S., Santoni, V., Chevallet, M. (2007) Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol.* **355**:111-119.
- [33] Rais, I., Karas, M., Schagger, H. (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics.* **4**: 2567-2571.
- [34] Schagger, H., von Jagow G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* **199**: 223-231.

## CAPITOLO 2

- [35] Widmann, Sacher, Mc Pherson (2001) “Interpretazione clinica degli esami di laboratorio” Mc Graw Hill XI Edizione Marzo, **2**: 39-60.
- [36] Castaldi, G., Liso, V. (2001) “Malattie del Sangue e degli Organi Ematopoietici” Mc Graw Hill III Edizione, **2**: 13-28.
- [37] Bennett, V., Baines, A. J. (2001) Spectrin and Ankyrin-Based Pathways: Metazoan Inventions for Integrating Cells Into Tissues. *Phys. Rev.* **81**: 1353-1392.
- [38] Fu, G., Wang, T., Yang, B., Lv, F., Shi, C., Jiang, X., Tian, L., Yu, W., Hamasaki, N (2004). Purification and Characterization of the Human Erythrocyte Band 3 Protein C-Terminal Domain. *Biochem.* **43**: 1633-1638.
- [39] Mohandas N., Chassi J. A. (1993) Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Sem. Haematol.* **30**: 171-182.
- [40] Council of Europe Committee of Ministers. Recommendation No. R (95) 15 of the Committee of Ministers to Members States on the preparation, use and quality assurance of blood components. Concil of Europe Publishing: Strasbourg, France, 1997.
- [41] Chin-Yee, I.; Arya, N.; D’Almeida, M. S. (1997) The red cell storage lesion and its implication for transfusion. *Transfus. Sci.* **18**: 447-458.

- [42] Berezina, T. L.; Zaets, S. B.; Morgan, C.; Spillert, C. R.; Kamiyama, M.; Spolarics, Z.; Deitch, E. A.; Machiedo, G. W. (2002) Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J. Surg. Res.* **102**: 6-12.
- [43] Greenwalt, T. J. (2006) The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion*, **46**: 143-152.
- [44] Tinmouth, A.; Chin-Yee, I. (2001) The clinical consequences of the red cell storage lesion. *Transfus. Med. Rev.* **15**: 91-107.
- [45] Ho, J.; Sibbald, W. J.; Chin-Yee, I. H. (2003) Effects of storage on efficacy of red cell transfusion: when is it not safe? *Crit. Care Med.* **31**: 687-697.
- [46] Hess, J. R.; Hil, I. H. R.; Oliver, C. K.; Lippert, L. E.; Rugg, N.; Joines, A. D.; Gormas, J. F.; Pratt, P. G.; Silverstein, E. B.; Greenwalt, T. J. (2003) Twelve-week RBC storage. *Transfusion* **43**: 867-872.
- [47] Beppu, M.; Mizukami, A.; Nagoya, M.; Kikugawa, K. (1990) Binding of anti-band 3 autoantibody to oxidatively damaged erythrocytes. Formation of senescent antigen on erythrocyte surface by an oxidative mechanism. *J. Biol. Chem.* **265**: 3226-3233.
- [48] Pradhan, D.; Weiser, M.; Lumley-Sapanski, K.; Frazier, D.; Kemper, S.; Williamson, P.; Schlegel, R. A. (1990) Peroxidation-induced perturbations of erythrocyte lipid organization. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**: 398-404.
- [49] Gutteridge, J. M. C. (1986) Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.* **201**: 291-295.
- [50] Racek, J.; Herynkova', R.; Holec'ek, V.; Faltysova', J.; Krejc'ova', I. (2001) What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? *Physiol. Res.* **50**: 83-388.
- [51] Dumaswala, U. J.; Zhuo, L.; Jacobsen, D. W.; Jain, S. K.; Sukalski, K. A. (1999) Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radical Biol. Med.* **27**: 1041-1049.
- [52] Dumaswala, U. J.; Zhuo, L.; Mahajan, S.; Nair, P. N.; Shertzer, H. G.; Dibello, P.; Jacobsen, D. W. (2001) Glutathione protects chemokinescavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**: 867-873.

- [53] Dumaswala, U. J.; Wilson, M. J.; Wu, Y. L.; Wykle, J.; Zhuo, L.; Douglass, L. M.; Daleke, D. L. (2000) Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radical Res.* **33**: 517-529.
- [54] Keifer, C. R., Trainor, J. F., McKenney, J. B., Valeri, C. R., Snyder, L. M. (1995) Hemoglobin-spectrin complexes: interference with spectrin tetramer assembly as a mechanism for compartmentalization of band 1 and band 2 complexes. *Blood* **86**: 366-371.
- [55] Caprai, P., Bozzi, A., Malori, W., Bottini, A., Iosi, F., Santini, M. T., Salvati, A. M. (1995) Junctional sites of erythrocytes skeletal proteins are specific targets of ter-butylhydroperoxide oxidative damage. *Chem Biol Interact* **94**: 243-258.
- [56] Mannu, F., Arese, P., Cappellini, M. D., Fiorelli, G., Cappadoro, M., Giribaldi, G., Turrini, F. (1995) Role of hemicrome binding to erythrocyte membrane in the generation of Band3 alterations in  $\beta$ -thalassaemia intermedia erythrocytes. *Blood* **86**: 2014-2020.
- [57] Wolfe, L. C. (1989) Oxidative injuries to the red cell membrane during conventional blood preservation. *Semin. Hematol.* **26**: 307-312.
- [58] Mandal, D.; Baudin-Creuzat, V.; Bhattacharyya, A.; Pathak, S.; Delaunay, J.; Kundu, M.; Basu, J. (2003) Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J. Biol. Chem.* **278**: 52551-52558.
- [59] Boivin, P.; Galand, C.; Dhery, D. (1990) In vitro digestion of spectrin, protein 4.1 and ankyrin by erythrocyte calcium dependent neutral protease (calpain I). *Int. J. Biochem.* **22**: 1479-1489.
- [60] Brecher, M. E.; Pineta, A. A.; Torroni, A. S.; Harbaugh, C. A.; Emery, R. L.; Moore, S. B.; Carmen, R.; Nelson, E. (1991) Prestorage leukocyte depletion: effect on leukocyte and platelet metabolites, erythrocyte lysis, metabolism, and in vivo survival. *Semin. Hematol.* **28**: 3-9.
- [61] Wittmann-Liebold, B.; Graack, H. R.; Pohl, T. (2006) Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* **6**: 4688-4703.
- [62] Schoneich, C.; Sharov, V. S. (2006) Mass spectrometry of protein

- modifications by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biol. Med.* **41**, 1507-1520.
- [63] Olivieri, E.; Herbert, B.; Righetti, P. G. (2001) The effect of protease inhibitors on the two-dimensional electrophoresis pattern of red blood cell membranes. *Electrophoresis*, **22**, 560-565.
- [64] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- [65] Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Cantucci, L.; Ghiggeri, G. M.; Carnemolla, B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; Righetti, P. G. (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, **25**, 1327-1333.
- [66] Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-97.
- [67] Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
- [68] Raththagala, M.; Root, P. D.; Spence D. M. (2006) Dynamic Monitoring of Glutathione in Erythrocytes, without a Separation Step, in the Presence of an Oxidant Insult. *Anal. Chem.*, **78**, 8556-8560.
- [69] Berlett, B. S.; Stadtman E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* **272**, 20313-20316.
- [70] Mandal, D.; Moitra, P. K.; Saha, S.; Basu, J. (2002) Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett.*, **513**, 184-188.
- [71] Matarrese, P.; Straface, E.; Pietraforte, D.; Gambardella, L.; Vona, R.; Maccaglia, A.; Minetti, M.; Malorni, W. (2005) Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J.*, **19**, 416-418.
- [72] Herbert, B.; Galvani, M.; Hamdan, M.; Olivieri, E.; MacCarthy, J.; Pedersen, S.; Righetti, P. G. (2001) Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? *Electrophoresis*, **22**, 2046-2057.

- [73] Mastro, R.; Hall, M. (1999) Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **273**, 313-315.
- [74] Sheehan, D. (2006) Detection of redox-based modification in two-dimensional electrophoresis proteomic separations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 455-462.
- [75] Davies, K. J. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I general aspects. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895-9901.
- [76] Anniss, A. M.; Glenister, K. M.; Killian, J. J.; Sparrow, R. L. (2005) Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products. *Transfusion*, **45**, 1426-1433.
- [77] Kriebardis, A. G.; Antonelou, M. H.; Stamoulis, K. E.; Economou-Petersen, E.; Margaritis, L. H.; Papassideri, I. S. (2006) Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells. *Blood Cells Mol. Dis.*, **36**, 279-282.
- [78] Bode, A. P.; Norris, H. T. (1992) The use of inhibitors of platelet activation or protease activity in platelet concentrates stored for transfusion. *Blood Cells*, **18**, 361-380.
- [79] Winchester, R. V.; Lynn K. R. (1970) X- and gamma-radiolysis of some tryptophan dipeptides. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **17**, 541-548.
- [80] Inaba, M.; Gupta, K. C.; Kuwabara, M.; Takahashi, T.; Benz, E. J. Jr.; Maede, Y. (1992) Deamidation of human erythrocyte protein 4.1: possible role in aging. *Blood*, **79**, 3355-3361.
- [81] Ingrosso, D.; D'angelo, S.; Di Carlo, E.; Perna A. F.; Zappia V.; Galletti, P. (2000) Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4397-4405.
- [82] Akoev, V. R.; Matveev, A. V.; Belyaeva, T. V.; Kim, Y. A. (1998) The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1371**, 284-294.

- [83] Beppu, M.; Nagoya, M.; Kikugawa, K. (1986) Role of heme compounds in the erythrocyte membrane damage induced by lipid hydroperoxide. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 5063-5070.
- [84] Corry, W. D.; Meiselman, H. J.; Hochstein, P. (1980) t-Butyl hydroperoxide-induced changes in the physicochemical properties of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 224-234.
- [85] Caprai, P.; Bozzi, A.; Malori, W.; Bottini, A.; Losi, F.; Santini, M. T.; Salvati, A. M. (1995) Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of tert-butylhydroperoxide oxidative damage. *Chem. Biol. Interact.*, **94**, 243-258.
- [86] Wagner, G. M.; Chiu, D. T.; Qju, J. H.; Heath, R. H.; Lubin B. H. (1987) Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. *Blood*, **69**, 1777-1781.
- [87] Yoshida, T.; AuBuchon, J. P.; Tryzelaar, L.; Foster, K. Y.; Bitensky, M. W. (2007) Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions. *Vox Sang.*, **92**, 22-31.

### CAPITOLO 3

- [88] Speers, A. E.; Wu, C. C. (2007) Proteomics of integral membrane proteins-theory and application. *Chem. Rev.*, **107**, 3687-3714.
- [89] Krause, F. (2006) Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*, **27**, 2759-2781.
- [90] Wilkins, M. R.; Gasteiger, E.; Sanchez, J. C.; Bairoch, A.; Hochstrasser, D. F. (1998) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis*, **19**, 1501-1505.
- [91] McDonough, J.; Marban, E. (2005) Optimization of IPG strip equilibration for the basic membrane protein mABC1. *Proteomics*, **5**, 2892-2895.

- [92] Timperio, A. M.; D'Amici, G. M.; Barta, C.; Loreto, F.; Zolla, L. (2007) Proteomic, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *J Exp Bot.*, **doi:10.1093/jxb/erm219**
- [93] Schägger H, Cramer WA, von Jagow G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **217**: 220-230.
- [94] Eubel, H., Braun, H. P.; Millar, A. H. (2005) Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods.*, **16**, 1:11.
- [95] Kügler, M.; Jänsch, L.; Kruff, V.; Schmitz, U.K.; Braun, H. P. (1997) Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Photosynth Res.*, **53**, 35-44.
- [96] Suorsa, M.; Regel, R. E.; Paakkarinen, V.; Battchikova, N.; Herrmann, R. G.; Aro, E. M. (2004) Protein assembly of photosystem II and accumulation of subcomplexes in the absence of low molecular mass subunits PsbL and PsbJ. *Eur. J.Biochem.*, **271**, 96-107.
- [97] Kügler, M.; Jänsch, L.; Kruff, V.; Schmitz, U.K.; Braun, H. P. (1997) Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). *Photosynth Res.*, **53**, 35-44.
- [98] Aro, E. M.; Suorsa, M.; Rokka, A.; Allahverdiyeva, Y.; Paakkarinen, V.; Saleem, A.; Battchikova, N.; Rintamaki, E. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.*, **56**, 347-356.
- [99] Ciambella, C.; Roepstorff, P.; Aro, E. M.; Zolla, L. (2005) A proteomic approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics*, **5**, 746-757.
- [100] Rexroth, S.; Meyer, Z. U.; Tittingdorf, J. M.; Krause, F.; Dencher, N. A.; Seelert, H. (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis*, **24**, 2814-2823.

- [101] Heinemeyer, J.; Eubel, H.; Wehmhoner, D.; Jansch, L.; Braun, H. P. (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochem.*, **65**, 1683-1692.
- [102] Fandino, A. S.; Rais, I.; Vollmer, M.; Elgass, H.; Schagger, H.; Karas, M. (2005) LC-nanospray-MS/MS analysis of hydrophobic proteins from membrane protein complexes isolated by blue-native electrophoresis. *J Mass Spectrom.*, **40**, 1223-1231.
- [103] (23) Schagger, H.; Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.*, **19**, 1777-17783.
- [104] Wittig, I.; Braun, H. P.; Schagger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc.*, **1**, 418-428.
- [105] Farhoud, M. H.; Wessels, H. J.; Steenbakkens, P. J.; Mattijssen, S.; Wevers, R. A.; van Engelen, B. G.; Jetten, M. S.; Smeitink, J. A.; van den Heuvel, L. P.; Keltjens, J. T. (2005) Protein complexes in the archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus* analyzed by blue native/SDS-PAGE and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1653-1663.
- [106] Wittig, I.; Schagger, H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. (2005) *Proteomics*, **5**, 4338-4346.
- [107] Brobey, R. K.; Soong, L. (2007) Establishing a liquid-phase IEF in combination with 2-DE for the analysis of *Leishmania* proteins. *Proteomics*, **7**, 116-120.
- [108] Seshi, B. (2007) Proteomics strategy based on liquid-phase IEF and 2-D DIGE: Application to bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Proteomics*, **7**, 1984-1999.
- [109] Gazzana, G.; Borlak, J. (2007) Improved Method for Proteome Mapping of the Liver by 2-DE MALDI-TOF MS. *J. Proteome Res.*, **6**, 3143-3151.
- [110] Jackowski, G.; Kacprzak, K.; Jansson, S. (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of Photosystem II (LHC II). *Biochim. Biophys Acta*, **1504**, 340-345.
- [111] Neff, D.; Dencher, N. A. Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1-ATP synthase, CFo and CF1 by

blue native electrophoresis. (1999) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 259, 569-575.

## PUBBLICAZIONI

### Lavori accettati e in attesa di pubblicazione

**Coupling of native liquid phase isoelectrofocusing and BN-PAGE: a potent tool for native membrane multiprotein complex separation.** D'Amici G.M., Timperio A.M., Zolla L. *Journal of Proteome* in press.

**Separation of thylakoid membrane proteins by sucrose ultracentrifugation gradient or BN-SDS-PAGE two dimensional electrophoresis.** D'Amici G.M., Huber G.C., Zolla L. "Proteomic analysis of membrane proteins: methods and protocols". *Humana Press 'Methods in Molecular Medicine* in press.

### Lavori pubblicati

#### 2007

**Proteomic, pigment composition and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves.** Timperio A.M., D'Amici G.M., Barta C., Loreto F. and Zolla L. *Journal of Experimental Botany* 2007 Oct 10; doi:10.1093/jxb/erm219

**Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage.** D'Amici G.M., Rinalducci S., Zolla L. *Journal of Proteome research* 2007, 6, 3242-3255.

#### 2006

**Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*.** Benedetti S., Rinalducci S., Benvenuti F., Francogli S., Pagliarani S., Giorgi L., Micheloni M., D'Amici G.M., Zolla L., Canestrari F. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006, 833, 12-18.

## COMUNICAZIONE AI CONGRESSI

**26-29 Giugno 2007:** partecipazione al IInd ItPA (Italian Proteomic Association) Annual National Conference

Comunicazioni:

**Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during storage.**

Gian Maria D'Amici, Sara Rinalducci, Marco Fagioni, Lello Zolla.

**A new two dimensional blue native method coupled with mass spectrometry for proteomic study of thylakoid membrane proteins under stress conditions.**

Anna Maria Timperio, Sara Rinalducci, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni, Lello Zolla.

**10-15 Settembre 2006:** XXII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana sci 2006

Comunicazioni:

**Studio cinetico delle alterazioni subite dalle proteine della membrana eritrocitaria durante i 42 giorni di stoccaggio del sangue ad uso trasfusionale.**

Gian Maria D'Amici, Francesca Rosetto, Sara Rinalducci, Anna Maria Timperio, , Marco Fagioni, Lello Zolla.

**Proteome analysis in iron-deficient chloroplast of spinach.** Anna Maria Timperio,

Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni, Lello Zolla.

**2-4 Luglio 2006** partecipazione a Ist ItPA (Italian Proteomic Association) Annual National Conference.

Comunicazioni:

**Proteomic profile of iron-deficient spinach thylakoids by both blue native SDS-PAGE and chromatographic approaches.** Anna Maria Timperio, Gian Maria

D'Amici, Marco Fagioni, Lello Zolla.

**Proteomic study of protein alterations of erythrocyte membrane proteins during blood storage for clinical use.** Gian Maria D'Amici, Francesca Rosetto,

Sara Rinalducci, Marco Fagioni, Anna-Maria Timperio, Lello Zolla.

**5-8 Novembre 2005** Life in Extreme Environments, organizzato dalla European Science Foundation (ESF). Sant Feiu de Guixols (Catalonia), Spain.

Comunicazioni:

**Formation of truncated proteins and high-molecular-mass aggregates upon short (soft) illumination of thylakoid membrane.** Sara Rinalducci, Anna Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni, Lello Zolla.

**28 Giugno-1 Luglio 2005** partecipazione a Massa 2005 congresso organizzato dalla Divisione di Spettrometria di Massa della Società Chimica Italiana . Roma.

Comunicazioni:

**Protein pre-fractionation by three-phase system of thylakoid membrane proteins for facilitated 2D-IEF/SDS-PAGE and MS identification.** Gian Maria D'Amici, Sara Rinalducci, Paolo Antonioli, Corrado Ciambella, Marco Fagioni, Anna-Maria Timperio, Pier Giorgio Rigetti, Lello Zolla.

**27-29 Maggio 2005** partecipazione al 2nd IPSO Congress. Viterbo.

Comunicazioni:

**Proteomics of thylakoid membranes proteins from iron-deficient spinach plants.** Corrado Ciambella, Peter Roepstorff, Sara Rinalducci, Anna-Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni, Lello Zolla.

**Multidimensional proteomic analysis of photosynthetic membrane proteins by liquid extraction-ultracentrifugation-liquid chromatography –mass spectrometry.** Christian G. Huber, Walcher W., Anna-Maria Timperio, Troiani Sonia, Gian Maria D'Amici, Marco Fagioni , Lello Zolla.

**Proteomic analysis of photosystem I components from different plant species.** Sara Rinalducci, Corrado Ciambella, Anna-Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Lello Zolla.

**6-7 Maggio 2005** partecipazione all'incontro "Stress Cellulare". San Martino al Cimino (VT).

Comunicazioni:

**Coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno nella degradazione di proteine e oligonucleoditi.** Sara Rinalducci, Corrado Ciambella, Gian Maria D'Amici, Anna Maria Timperio, Lello Zolla.

**27-29 Maggio 2004** partecipazione al Ist IPSo Congress Verona.

Comunicazioni:

**Proteomics of thylakoid membranes from barley by 2D-BN/SDSPAGE and tandem ESI-MS/MS.** Corrado Ciambella, Peter Roepstorff, Sara Rinalducci, Anna-Maria Timperio, Gian Maria D'Amici, Eva-Mari Aro, Lello Zolla.

**Proteomics of photosystem I protein components in different plant species performed by HPLC on line with ESI-MS.** Anna-Maria Timperio, Sara Rinalducci, Corrado Ciambella, Gian Maria D'Amici, Christian G. Huber, and Lello Zolla.

## **PREMI E RICONOSCIMENTI**

**Novembre 2007.**

Vincitore del secondo contributo di mobilità ItPA 2007

**Luglio 2006 1st ItPA Congress. Pisa.**

Vincitore Borsa di Studio per meriti conseguiti nello studio del proteoma.

La comunicazione: Proteomic profile of iron-deficient spinach thylakoids by both blue native SDS-PAGE and chromatographic approaches è risultata essere la terza classificata nel concorso su votazione dei soci ItPA.

**Maggio 2006.**

Vincitore domanda di finanziamento CIB (Consorzio Interuniversitario Biotecnologie) contributi per attività di formazione in biotecnologie presso laboratori stranieri (1° bando 2006)

**Maggio 2005 IInd IPSO Congress. Viterbo.**

Vincitore “IPSO Organizing Committee grant award” per meriti conseguiti nello studio del proteoma.

## RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo lavoro di tesi desidero ringraziare tutti coloro che sono stati presenti in questi anni e che mi hanno permesso di compiere quest'esperienza.

Un ringraziamento particolare e molto sentito va al Prof. Lello Zolla che ha permesso, come mai nessuno prima, la libera espressione delle mie idee indirizzandole saggiamente verso dei risultati concreti.

Ringrazio la Dott.ssa Anna Maria Timperio per gli innumerevoli consigli e per la sua costante presenza durante il mio cammino di dottorato.

Ringrazio la Dott.ssa Sara Rinalducci un punto di riferimento e confronto insostituibile oltre che una grande Amica pronta sempre ad aiutarmi senza chiedere nulla in cambio.

Ringrazio il Dott. Marco Fagioni il mio vero ed unico Amico viterbese che tanto mi ha sopportato in questi anni nei miei continui sbalzi di umore. "*Marco sei un grande*".

Ringrazio il Dott. Corrado Ciambella un amico a cui devo molto dato che mi ha iniziato alla tecnica della 2D-BN-SDS-PAGE.

Per concludere voglio ringraziare una persona molto speciale la Dott.ssa Ilaria Ingrosso, con la quale spero di condividere molto.