



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA ANIMALE, IGIENE E SANITA' PUBBLICA
VETERINARIA

CORSO DI DOTTORATO IN
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE
CICLO XXIII

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**NUOVI SISTEMI DI INDAGINE PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLA
QUALITA' DELLA CARNE BOVINA**
VET/05 - AGR/19

DOTTORANDO:
ALESSANDRO GAVIRAGHI

TUTOR:
Ch.mo PROF. LUIGI BONIZZI

COORDINATORE DELLA SCUOLA DI DOTTORATO:
Ch.mo PROF. FULVIO GANDOLFI

A.A. 2009/2010

RINGRAZIAMENTI

Rivolgo i miei più sentiti ringraziamenti alla Dott.ssa Paola Roncada per avermi accolto nuovamente nel suo laboratorio, per avermi trasmesso ancora una volta la passione per le proteine e per la proteomica e per avermi accompagnato durante questi tre anni di dottorato.

Ringrazio il Prof. Luigi Bonizzi per avermi dato la possibilità di svolgere questa tesi e per essere stato il mio docente guida.

Un dovuto ringraziamento al Dott. Emiliano Lasagna dell'Università degli Studi di Perugia per il prezioso lavoro di campionamento presso il mattatoio comunale di Senigallia e alla Cooperativa Zootecnica Scaligera per la prova di alimentazione supplementata con antiossidanti.

Ringrazio l'ItPA per avermi concesso una borsa per giovani ricercatori che mi ha permesso di recarmi presso il laboratorio della Dott.ssa Angela Amoresano presso il Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica dell'Università Federico II di Napoli per svolgere parte delle analisi di spettrometria di massa.

Infine desidero ringraziare tutti i miei colleghi di laboratorio, Francesca, Alessio, Cristian e Hany per il loro aiuto, la loro competenza e la loro incondizionata disponibilità in questi tre anni.

Simboli e abbreviazioni

P.A.C.: politica agricola comune dell'Unione Europea

ATP: adenosina trifosfato

DNA: acido desossiribonucleico

RNA: acido ribonucleico

mRNA: RNA messaggero

QTL: quantitative trait loci

ST: muscolo semitendinoso

LD: muscolo longissimus dorsi

EAAP-CEE: tabella comunitaria di classificazione delle carcasse bovine

SEUROP: griglia europea di valutazione della carcassa

AMG: aumento medio giornaliero

IEF: isoelettrofocalizzazione

IPG: gel in gradiente di pH immobilizzato

PAGE: elettroforesi su gel di poliacrilammide

Elettroforesi 2D: elettroforesi bidimensionale

2DE: elettroforesi bidimensionale

2-D PAGE: elettroforesi bidimensionale su gel di poliacrilammide

SDS: sodiododecilsolfato

SDS-PAGE: elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS

DTT: ditioneitrato

IAA: iodoacetamide

TEMED: tetrametilendiammina

APS: ammonio persolfato

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansolfato

EDTA: acido etilendiamminotetracetico

Tris: tris(idrossimetil)amminometano

MALDI: matrix assisted laser desorption ionization

TOF: time of flight

ESI: electrospray ionization

MS: analisi di spettrometria di massa

PCA: analisi delle componenti principali

INDICE

1 – INTRODUZIONE	6
1.1 – Il mercato e la produzione della carne in Italia	6
1.2 – La qualità della carne	9
1.2.1 – L'allevamento	10
1.2.2 – Il trasporto	14
1.2.3 – La macellazione	15
1.2.4 – La lavorazione	16
1.3 – Proteomica	18
1.3.1 – Metodologie in proteomica	22
1.3.1.1 – Preparazione del campione	22
1.3.1.2 – Prima dimensione – Isoelettrofocalizzazione	25
1.3.1.3 – Seconda dimensione – SDS-PAGE	26
1.3.1.4 – Colorazione del gel	28
1.3.1.5 – Analisi di immagine	30
1.3.1.6 – Database di mappe bidimensionali	31
1.3.1.7 – Spettrometria di massa	32
1.4 – Proteomica e qualità della carne: stato dell'arte	34
2 – SCOPO DEL LAVORO	41
3 – MATERIALI E METODI	46

3.1 – Campionamento e animali in esperimento	46
3.2 – Estrazione delle proteine	48
3.3 – Elettroforesi monodimensionale SDS-PAGE	49
3.4 – Elettroforesi bidimensionale	49
3.5 – Spettrometria di massa	51
3.6 – Analisi statistica	52
4 – RISULTATI	53
4.1 – Prova vitelloni razza Marchigiana	53
4.2 – Prova somministrazione integratore alimentare	71
4.3 – Mappa master	73
5 – CONCLUSIONI	76
6 – BIBLIOGRAFIA	82

1. INTRODUZIONE

1.1 Il mercato e la produzione della carne in Italia

La filiera della carne bovina è un settore dell'industria agroalimentare molto articolato sia dal punto di vista strutturale sia da quello organizzativo. Le cause di tale complessità sono varie, da un lato attribuibili all'elevata numerosità degli operatori presenti dovuta alla considerevole frammentazione della filiera sia in ambito strettamente agricolo sia in ambito industriale, dall'altro all'esistenza di notevoli flussi di importazione, europea e mondiale, di animali e carni. In Italia le importazioni di animali vivi si aggirano intorno al 45% del patrimonio di bovini allevati. L'import di animali vivi, prevalentemente destinati all'allevamento, rappresenta circa il 35% del totale importato, mentre l'acquisto di carni costituisce la quota maggiore raggiungendo il 65% della quota di mercato. Questi ingenti flussi in entrata rendono il settore, il cui tasso di auto approvvigionamento medio è del 60%, fortemente dipendente dall'estero. Il settore è quindi caratterizzato da un deficit strutturale della bilancia commerciale. Un altro problema che riguarda il mercato della carne bovina è rappresentato dai diversi interessi ed obiettivi dei settori che compongono l'intera filiera di produzione. Molto spesso, infatti, gli interessi sono settoriali e non convergono verso un obiettivo comune che dovrebbe essere quello di soddisfare le esigenze del consumatore. Generalmente gli allevatori tengono conto dei problemi quantitativi legati alla produzione, i

trasformatori pongono l'attenzione sull'aspetto remunerativo del prodotto, mentre i distributori mirano a privilegiare un rapido smercio a svantaggio della frollatura (Resconi et al., 2010; Destefanis G. e Barge M. T., 1990) provocando un peggioramento della qualità del prodotto finale, non bene accetto al consumatore. I requisiti essenziali che un consumatore moderno cerca al momento dell'acquisto di un prodotto carneo fresco sono: tenerezza, apprezzabilità/sapidità e ovviamente economicità.

Dal punto di vista produttivo la filiera presenta differenze di tipo organizzativo e strutturale negli allevamenti. Vi sono infatti aziende caratterizzate dalla presenza di strutture di dimensioni elevate e altamente specializzate localizzate generalmente nelle regioni settentrionali, in numero esiguo rispetto al totale, contrapposte ad un grande numero di piccoli e piccolissimi allevamenti, spesso a conduzione familiare e ubicati in zone marginali e/o in regioni meridionali.

Vi sono tre diverse categorie merceologiche che caratterizzano la filiera produttiva. La prima è costituita dal vitello proveniente da razze da latte, alimentato prevalentemente con polvere di latte sino al raggiungimento di 230-250 kg di peso vivo all'età di 5-6 mesi. La maggior parte di questo prodotto proviene da zone decisamente vocate per la produzione di latte quali la Lombardia ed il Veneto. Questo settore rappresenta circa il 12% della produzione e proviene per circa il 97% dagli allevamenti nazionali da latte. La seconda categoria è rappresentata dalla vacca a fine carriera proveniente sempre da allevamenti italiani da latte e pertanto anche questa prevalentemente localizzata nel Nord-Est, che rappresenta circa il 13% del

mercato. La terza categoria, che sicuramente riveste un ruolo di primaria importanza in questo comparto, è rappresentata dal vitellone che, con oltre il 74% dell'offerta complessiva, rappresenta il cuore della filiera della carne bovina. La maggior parte degli animali avviati al macello deriva da aziende nazionali che ingrassano soggetti di origine estera (45%) e/o di origine nazionale, sia provenienti da allevamenti specializzati da carne sia da latte. Per effetto della notevole varietà tra i modelli di allevamento esistenti che è conseguenza delle razze allevate, del sistema di alimentazione, della localizzazione, etc., si può operare un'ulteriore distinzione. Si può infatti parlare di vitellone "intensivo", allevato in ambiente confinato nella pianura Padano-Veneta (Veneto, Piemonte, Emilia Romagna, Lombardia), alimentato con insilato di mais e concentrato, e di vitellone "estensivo" che viene allevato, solitamente in forma brada o semibrada, in Piemonte, nell'Appennino centro-meridionale e nelle isole. Il vitellone "estensivo" appartiene per lo più alle razze tipiche italiane e viene allevato seguendo la tecnica della linea vacca-vitello: alimentato al pascolo integrato con concentrato e macellato, dopo un periodo di finissaggio in stalla, al raggiungimento del peso finale di circa 650 kg. (Federici e Rama, 2008). L'aumento dell'offerta dei paesi Sud-Americani e dei paesi Asiatici, la riforma della politica agricola comune (P.A.C.), la flessione dell'economia e dei redditi dei paesi comunitari, l'allargamento ai paesi dell'est dell'Europa, le nuove esigenze del consumatore unite alle necessità interne di ciascuna impresa operante nel settore della carne bovina, hanno portato alla realizzazione di progetti volti all'ottenimento di un prodotto

qualitativamente valido e sempre più uniforme e standardizzato, che risponda alle attuali richieste dei consumatori. In questo quadro risulta estremamente difficile per gli allevatori realizzare gli investimenti necessari a sviluppare politiche di qualità, fatta eccezione per gli interventi minimali richiesti dalla normativa e dal mercato.

Un'eccezione è rappresentata dalle aziende che producono per i mercati di nicchia; queste ultime potrebbero riscuotere un certo successo, soprattutto puntando sulle strategie di diversificazione basate sull'allevamento di razze autoctone, su marchi di tutela comunitaria di denominazioni geografiche, su metodi di produzione biologica o su sistemi comunque percepiti dal consumatore come naturali. Altra possibilità per garantire una maggiore remunerazione del prodotto potrebbe essere quella della filiera corta. Questa soluzione commerciale consente di recuperare la marginalità della produzione sfruttando canali locali grazie ad accordi diretti con la distribuzione, anche se non garantisce gli attuali livelli di autoapprovvigionamento.

1.2 – La qualità della carne.

Lo studio della qualità della carne bovina si presenta indubbiamente complesso e molto articolato. La carne è, infatti, un alimento caratterizzato da un'ampia eterogeneità provocata da una serie di fattori, più o meno variabili, presenti lungo tutta la filiera produttiva.

La qualità della carne è una caratteristica complessa influenzata sia da componenti genetiche sia da fattori ambientali come l'alimentazione e il management degli animali durante la crescita, il trasporto, la macellazione e le corrette procedure di trattamento e frollatura della carne durante e dopo la macellazione.

1.2.1 L'allevamento

L'allevamento rappresenta chiaramente il punto di partenza di tutte le filiere produttive degli alimenti di origine animale. Nell'allevamento degli animali da carne sono molteplici i fattori che possono influenzare la qualità del prodotto finale. Oltre ai fattori tipici dell'allevamento, quali management aziendale, strutture ed alimentazione, è necessario considerare le caratteristiche intrinseche degli animali che portano alla produzioni di carcasse molto spesso differenti tra loro. I fattori intrinseci degli animali che influenzano la qualità della carne sono la razza, il tipo e la natura delle fibre muscolari, il sesso e l'età di macellazione.

Per quanto concerne la razza, la prima grandissima distinzione da fare è dovuta all'attività produttiva per la quale sono state selezionate. Il prodotto carne che si ottiene dalle razze selezionate per la produzione della carne non è comparabile dal punto di vista qualitativo con quello ottenuto da animali selezionati per la produzione di latte e che finiscono nel circuito della produzione della carne a seguito della loro riforma. Le differenze fra queste

due tipologie di prodotto sono evidenti e influenzate dalla selezione genetica e dall'alimentazione degli animali.

Tra le razze selezionate per la produzione della carne vi sono molti fattori che possono influenzare la qualità della carne. Questo perché spesso ad una certa razza è abbinata anche una certa tipologia di allevamento e quindi di alimentazione degli animali. Tra i parametri che maggiormente influenzano la qualità della carne ci sono la differente precocità, le caratteristiche delle fibre muscolari, la presenza dell'ipertrofia muscolare, la differente distribuzione del grasso, ecc (Marshall D.M., 1994). Vi sono evidenze che i soggetti appartenenti a razze caratterizzate da ipertrofia muscolare sono più suscettibili agli eventi stressanti, meno resistenti allo sforzo fisico e dotati di un minor potenziale respiratorio, condizioni che in presenza di una gestione inadeguata degli animali nelle fasi che precedono la macellazione si possono riflettere in valori di pH finale elevati e, conseguentemente, in carni più a rischio di colore scuro. Schakelford et al. (1994) infatti in uno studio comparativo evidenziano una maggior incidenza di carni scure in bovini di razza Chianina e Piemontese, mentre un colore rosso vivo caratterizza con maggiore frequenza la carne dei bovini di razza Angus, seguiti da Charolaise, Saler e Limousine. La carne dei bovini con ipertrofia muscolare, se adeguatamente gestiti e alimentati, risulta però potenzialmente più tenera a seguito di una minore presenza di collagene intramuscolare e attività della calpastatina, l'enzima che si oppone alla trasformazione del muscolo in carne (Wiener et al., 2009).

Infine per quanto riguarda la tessitura questa risulta molto fine nell'Angus e Limousine, fine nel Saler, Simmental, Piemontese e Chianina mentre in merito alla compattezza della carne livelli crescenti sono presenti nella razza Charolaise, Piemontese, Simmental, Angus, Limousine e Chianina (Monson et al., 2004).

Come si può notare la componente razza coinvolge molte possibili variabili e quindi ne deriva che la sua scelta è un parametro di estrema importanza.

Per quanto riguarda le fibre muscolari, la loro disposizione nel muscolo e il loro metabolismo sono le variabili principali responsabili di differenze nella qualità del prodotto finale (Wegner et al., 2000). La variabilità nella tenerezza della carne dipende inoltre dalle differenze delle caratteristiche delle fibre muscolari (taglia e tipo, capacità ossidative e glicolitiche), dal contenuto in glicogeno e dal contenuto in collagene e sua solubilità. Tali caratteristiche metaboliche e biochimiche variano da muscolo a muscolo e perciò la composizione muscolare ha sicuramente un effetto di primaria importanza. Diversi studi sull'origine e sull'evoluzione delle caratteristiche del muscolo animale hanno dimostrato la correlazione esistente tra il tipo e la taglia della fibra muscolare e la qualità della carne (in particolare la tenerezza).

Anche il sesso degli animali è un parametro che può influenzare le caratteristiche di qualità di carne. Il suo principale effetto è dovuto alla differente precocità che contraddistingue maschi e femmine che può portare a differenze anche ampie dello stato di ingrassamento e nell'età alla macellazione, caratteristiche che sono in grado di condizionare

notevolmente la qualità del prodotto finale. Differenze nella tenerezza possono essere spiegate da variazioni nelle caratteristiche delle fibre collagene (Purchas et al., 2005; Purrlslow P.P., 2005). Il collagene che si forma per stimolazione di testosterone tra i 9 e 12 mesi è caratterizzato da elevata solubilità, condizione che conferisce alle carni di questi soggetti una tenerezza simile a quella di femmine e castrati. Dopo i 16 mesi invece il contenuto di collagene tende a valori pressoché costanti ma perde progressivamente di solubilità rendendo la carne più dura (Marchello et al., 1970; Choat et al., 2006). E' importante notare anche come l'età alla quale l'animale viene macellato possa influenzare la qualità della carne, soprattutto per quanto riguarda il parametro della tenerezza (Shortose et al., 1990).

Per quanto riguarda i fattori più strettamente connessi con le pratiche di allevamento l'alimentazione è l'aspetto di fondamentale importanza per un allevamento da carne. Tale fattore ha rilevanza sia da un punto di vista economico; il costo dell'alimentazione (mangimi, foraggi) incide per circa il 49% sul costo di produzione della carne (French et al., 2000) sia dal punto di vista qualitativo. (Gatellier et al., 2005; Morbidini et al., 2005; O'sullivan A. et al.; 2003, French et al., 2001; French et al., 2000; Mandell et al., 1998).

Anche la tecnica di allevamento, sebbene strettamente correlata all'alimentazione e alla razza degli animali allevati, può influenzare la qualità della carne influenzando sia le performance produttive sia le caratteristiche chimico-fisiche, organolettiche e nutrizionali delle carni.

(Iacurto et al., 2005; Keane M.G. et al., 1998; Keane M. G., 2004; Maltin et al., 1998; Sinclair et al., 1998; Razminiwicz et al., 2006).

1.2.2 Il trasporto

Oltre ai fattori intrinseci e più strettamente correlati alla produzione degli animali in vita, notevole importanza rivestono anche i trattamenti che precedono la macellazione, con particolare riferimento alle condizioni di stress imputabili al trasporto (Schaefer et al., 1997; Knowles T.G., 1999; Maria G.A. et al., 2003; Hogan et al., 2007) ed alla sosta al macello (Gregory, 1996). Durante le normali situazioni di manipolazione, trasporto nonché di attesa della macellazione, i bovini possono essere soggetti a condizioni di stress che comportano la mobilitazione delle loro riserve energetiche e il depauperamento del glicogeno muscolare (Poso et al., 2005; Lacourt et al., 1895). Tali circostanze non permettono il raggiungimento di un normale pH acido durante le fasi post mortem. Si ricorda che il pH è il parametro chimico che influenza la shelf-life e di come un suo abbassamento a valori acidi influenzi la qualità della carcassa nonché l'idoneità della carne ai vari processi industriali di trasformazione. Un impedimento al raggiungimento di valori di pH ottimali, causato da un ridotto contenuto di glicogeno a livello muscolare, può determinare inconvenienti legati alla contaminazione microbica e quindi alla conservabilità del prodotto, quali la comparsa di un colore scuro e una

consistenza sgradevole (carne Dark Firm Dry) (McVeigh et al., 1982) che molto spesso causa gravi perdite economiche per i produttori per una mancata commercializzazione di carni con questa anomalia.

1.2.3 La macellazione

Il momento iniziale del processo di macellazione prevede lo stordimento del soggetto, pratica che consente di evitare all'animale la coscienza e, di conseguenza, la percezione del dolore nelle fasi successive, come descritto dalla Council Directive 93/119 della Comunità Europea del 22 Dicembre 1993, normativa Europea che regolamenta la tutela degli animali in sede di macellazione.

Subito dopo lo stordimento viene eseguita la iugulazione cioè il taglio dei principali vasi sanguigni che interrompe l'afflusso del sangue al cervello provocando la morte dell'animale per dissanguamento. La non corretta esecuzione di tali fasi può compromettere la qualità della carne, infatti lo stordimento impreciso aumenta l'incidenza della "puntinatura" ("Blood Splash") (Lammens et al., 2006; Gregory , 2005) sui tagli di prima qualità, causando un peggioramento della qualità della carne dal punto di vista organolettico (sapore di sangue) e tecnologico (riduzione della shelf-life).

Il successivo dissanguamento degli animali ha un ruolo determinante; lo svuotamento parziale dei vasi sanguigni, infatti, può provocare il ristagno di sangue in alcune zone della carcassa, provocando problemi microbiologici

(aumento della proliferazione batterica), produttivi (aumento degli scarti di dissezione e conseguente riduzione delle rese allo spolpo), qualitativi per la possibile presenza di colore, sapori o odori anomali (con rifiuto del consumatore all'acquisto) (Gregory, 2005).

1.2.4 La lavorazione

La carne è il risultato delle trasformazioni biochimiche alle quali va incontro il muscolo subito dopo l'abbattimento dell'animale (Ouali A. et al., 2006). Durante questa fase i vari procedimenti adoperati possono influire con ampia variabilità sulle caratteristiche del prodotto finale. La conversione del muscolo in carne si realizza attraverso cambiamenti fisici, metabolici e strutturali del tessuto in cui il glicogeno, che forma le riserve energetiche nel tessuto muscolare, svolge un ruolo importante. Immediatamente dopo la macellazione, all'interno del muscolo, come in tutti gli altri organi, avviene una brusca alterazione dei processi biochimici in risposta al blocco del sistema respiratorio e della circolazione sanguigna. Iniziano una serie di reazioni biochimiche che caratterizzano la trasformazione del muscolo in carne. Con l'arresto della respirazione viene bloccato il sistema enzimatico dei citocromi e quindi le cellule non sono più in grado di produrre ATP utilizzando la via aerobica della fosforilazione ossidativa. Per generare ATP, molecola indispensabile per la sopravvivenza delle cellule, il glicogeno viene trasformato attraverso la glicolisi anaerobica in acido lattico che,

accumulandosi nel muscolo, determina un progressivo abbassamento del pH muscolare da 7,0 a 5,6 nel corso di 24 ore. L'abbassamento della temperatura corporea e le alterazioni a carico del reticolo sarcoplasmatico, che perde la capacità di recuperare gli ioni calcio, causano un aumento della concentrazione di Ca^{2+} libero. Tali condizioni rendono le proteine muscolari suscettibili alla denaturazione e pertanto facilmente attaccabili da complessi enzimatici in grado di idrolizzarle e cioè le calpaine e catepsine. Nel periodo post mortem incomincia, infatti, il processo degradativo a carico della struttura muscolare nella quale si susseguono reazioni enzimatiche che provocano un'attenuazione della durezza e altre reazioni quali l'ossidazione dei lipidi e la formazione di nucleotidi quali l'ipoxantina, potenziatore dell'aroma. Si ha, inoltre, la formazione di ammoniaca, idrogeno solforato, acetaldeide, acetile e acetone che sono, entro certi limiti, favorevoli per il sapore. È stato dimostrato che le calpaine scindono le proteine della linea Z: troponina T, troponina I, tropomiosina, α -actinina, titina, desmina e nebulina (Koohmaraie, 1992). I principali cambiamenti nella struttura del muscolo riguardano: la scomparsa della linea Z e della linea M, la perdita dell'allineamento trasversale dei dischi Z, della linea M e degli altri elementi contrattili, la scomparsa della troponina-T, la degradazione della desmina che porta alla frammentazione delle miofibrille, probabilmente attraverso la distruzione del legame tra le miofibrille, la degradazione della titina e della nebulina (Ouali et al., 2006).

L'attività delle proteasi è condizionata dalla temperatura e dal pH e non solo in termini di valori assoluti ma anche dalla velocità con la quale vengono

raggiunti. Le fasi che portano al raffreddamento della carcassa devono rispettare delle tempistiche dettate dalle caratteristiche stesse della carcassa quali dimensioni della carcassa, sviluppo muscolare e copertura di grasso. Elevate temperature della carcassa, dovute ad un non adeguato raffreddamento, determinano alterazioni nella consistenza, colore, capacità di ritenzione idrica e tenerezza della carne. Di contro, un rapido raffreddamento della carcassa può portare al fenomeno conosciuto come contrattura da freddo che causa un aumento della durezza delle carni. Per tale motivo esiste una stretta ed importante relazione tra le modalità di raffreddamento post mortem, l'attività delle proteasi muscolari e le caratteristiche del prodotto finale carne.

Da quanto esposto emerge chiaramente come il raggiungimento di un elevato standard qualitativo della carne bovina rappresenti un processo articolato, complesso e delicato, dove non considerare con attenzione le numerosissime variabili in grado di interferire sulle adeguate modalità produttive e di trasformazione del muscolo in carne, si traduce in un peggioramento della qualità del prodotto finale.

1.3 La proteomica

Il termine proteoma fu coniato da Wilkins et al. nel 1996 per identificare tutte le proteine espresse da un genoma in un determinato momento della vita cellulare. Pertanto il proteoma rappresenta il complemento proteico di

un organismo o di un genoma in un determinato momento fisiologico. Nella cascata di eventi regolatori che portano dal gene alla proteina attiva da esso codificata, il proteoma può essere visto come il prodotto finale del genoma. Sebbene il proteoma di una data cellula in ogni momento rappresenti solo l'espressione di una parte del genoma, esso è molto complesso. Esistono, infatti, molte potenziali variazioni molecolari tra un gene ed il suo corrispondente prodotto attivo. Queste includono soppressioni, amplificazioni, splicing e modificazioni co- e post- traduzionali. Ciò può far capire l'importanza e il perché dello studio del proteoma e perché questo deve essere considerato una scienza su larga scala al pari dello studio del genoma e forse anche di più. Proprio i progetti genoma hanno rappresentato negli ultimi anni la base della ricerca biologica e dell'industria biotecnologica. Sequenziando l'intero genoma di un organismo, per la prima volta in biologia si è arrivati a capire la complessità di un organismo dal punto di vista del contenuto d'informazione (Williams e Hochstrasser, 1997). Come spesso però accade nel mondo scientifico, una volta ottenuti i primi genomi completi è subito apparso evidente il limite dell'informazione che questi potevano fornire (Nowak, 1995). Questi limiti non sono dovuti a deficienze tecnologiche associate alla costruzione di mappe di DNA, ma piuttosto al limite di informazioni che si possono ricavare sulla regolazione molecolare e tutti i conseguenti processi coinvolti che si svolgono all'interno della cellula. L'enorme mole di informazioni contenuta nel genoma fornisce un elenco di proteine che possono essere espresse da quel genoma in qualsiasi cellula componga l'organismo studiato, ma non

fornisce nessuna informazione sulle proteine che verranno effettivamente espresse in un determinato tessuto o in un determinato tipo cellulare. Infatti, l'identificazione di un Open Reading Frame (ORF) non implica necessariamente l'esistenza di un gene funzionale codificante per una proteina. In secondo luogo, la conoscenza della sequenza nucleotidica di un gene non consente di predire il tipo cellulare in cui la proteina codificata verrà espressa, né indica in quale stadio dello sviluppo o del differenziamento o in risposta a quale stimolo questa espressione si potrà verificare. A questo va aggiunto che la conoscenza della sequenza nucleotidica di un gene non consente neanche di predire le eventuali modificazioni post-traduzionali alle quali il polipeptide potrà andare incontro dopo la sua sintesi. Anche un approccio basato solo sull'analisi degli RNA messaggeri non permette di ottenere indicazioni sulla presenza e sul livello di espressione di una proteina in quanto non vi è una correlazione fra tra quantità di mRNA e quantità di proteina (Gygi et al., 1999). Occorre quindi sottolineare che il dogma dei biologi "un gene una proteina" ormai è stato superato da una realtà che è invece molto più complessa. In un organismo il genoma può essere visto quindi come l'insieme delle regole che decidono come si legheranno insieme gli amminoacidi per formare le proteine senza però fornire poi indicazioni su espressione e modificazioni a cui tale proteina potrà andare incontro. Conseguentemente, la presenza di un gene all'interno della molecola di DNA non indica se e quando è tradotto, o in che quantità o la natura della sua competenza funzionale. Nella cellula il DNA rappresenta una "molecola della memoria" relativamente statica, che

rimane come tale durante tutta la vita dell'organismo. Le proteine rappresentano le “molecole di lavoro” e quindi il loro studio mediante l'analisi del proteoma rappresenta il passo fondamentale per lo studio e la comprensione degli eventi biologici a livello molecolare.

Le tecnologie necessarie per un progetto proteoma sono molte e più complicate che quelle utilizzate per il sequenziamento del DNA. Come prima cosa, l'alfabeto di base è maggiore, quattro nucleotidi per il DNA contro i 20 amminoacidi normali più tutti quelli modificati per le proteine. Si deve considerare inoltre, l'editing dell'mRNA che porta a messaggeri modificati e di conseguenza a tipi differenti di polipeptidi. Anche le proteine stesse possono venire modificate dopo la loro sintesi, con tagli o aggiunte di vari gruppi come zuccheri, fosfati, solfati, metili, acetili, lipidi.

Tra le tecnologie disponibili l'elettroforesi bidimensionale rappresenta la tecnica di elezione perché attualmente è l'unica che consente di separare migliaia di proteine contemporaneamente e su di un unico gel con una risoluzione ed una riproducibilità adeguata (Görg et al., 2004). La comprensione del network delle proteine e delle loro variazioni quantitative in un contesto globale, come può essere quello di un estratto cellulare, dipende fortemente dalla capacità di analizzare le proteine contemporaneamente e di riuscire a quantificarne le variazioni nell'espressione (Marcus et al., 2009).

Si definisce separazione bidimensionale quella tecnica per mezzo della quale il campione è soggetto a due processi distinti di separazione, orientati tra loro ad angolo retto (Gidding et al., 1984). Nell'elettroforesi

bidimensionale le proteine sono separate in prima dimensione secondo il loro punto isoelettrico ed in seconda secondo il loro peso molecolare. Questa tecnica, che inizialmente prevedeva l'uso di anfoliti carrier per la formazione del gradiente di pH (O'Farrel, 1975), è stata successivamente migliorata con l'avvento delle Immobiline che hanno permesso l'ottenimento di un gradiente di pH immobilizzato nel gel (Bjellqvist et al. 1982, Westermeier et al., 1983, Görg et al, 2000). L'introduzione dei gradienti immobilizzati nelle prima dimensione dell'elettroforesi bidimensionale, ha consentito di avere un'altissima riproducibilità tra laboratori differenti, consentendo di potere costruire delle mappe elettroforetiche di riferimento da potere inserire in banche dati specifiche. Di seguito verranno analizzate in maggiore dettaglio tutte le metodologie coinvolte in un'analisi proteomica.

1.3.1 Metodologie in proteomica

1.3.1.1 Preparazione del campione

La preparazione del campione è il passaggio più importante e critico dell'analisi proteomica tanto che la sua accuratezza può influenzare la buona riuscita dell'esperimento. Non esiste un protocollo universale di preparazione del campione perché i campioni che si possono analizzare presentano natura e caratteristiche diverse; si pensi ad esempio a tessuti o a

fluidi biologici. E' molto difficile, infatti, trovare un unico protocollo capace di solubilizzare tutti i polipeptidi presenti nel campione che possono avere caratteristiche chimiche differenti fra loro. Primo passaggio sarà quindi quello di studiare un'ottimale protocollo di preparazione del campione in relazione alla natura del campione stesso ed alle caratteristiche delle proteine che si vogliono studiare. Per ovviare a tutti questi problemi attualmente esistono protocolli di solubilizzazione studiati per avere una buona solubilità sia di proteine idrofobiche, sia di idrofiliche sia polipeptidi ricchi in cisteine evitando anche la degradazione proteolitica. Un'ottimale preparazione del campione prevede la preparazione delle proteine per l'analisi successiva. A tale scopo le proteine devono essere estratte dal campione biologico, liberate da sostanze che possono interferire con la tecnica analitica ed essere mantenute in soluzione durante l'intero processo di separazione. Questi tre passaggi rappresentano il processo di solubilizzazione delle proteine. Quindi la solubilizzazione può essere definita come il processo che rompe le interazioni tra le sostanze da analizzare e le sostanze interferenti eliminando così il rischio di una riaggregazione degli analiti durante il processo di separazione. Si tratta quindi di un processo che attraverso l'uso di sostanze chimiche presenti nel tampone di solubilizzazione del campione, rompono le interazioni non covalenti tra proteine e tra queste e le sostanze interferenti l'analisi (acidi grassi, DNA, RNA ecc.) (Rabilloud 1999; Herbert, 1999). Lo scopo del tampone di solubilizzazione sarà quello di ridurre tutte le proteine alla loro struttura primaria, prevenirne la riaggregazione, prevenire ed inibire la

formazione di modificazioni proteiche, disattivare le proteasi e rompere i ponti disolfuro ed i legami idrogeno srotolando i peptidi in modo da esporre tutti gruppi al tampone di lisi. Un ottimale tampone di solubilizzazione deve contenere una concentrazione elevata di agenti caotropici, un detergente zwitterionico ed un riducente per fornire un ambiente denaturante efficace.

L'urea, in aggiunta a piccole quantità di tiourea nel caso di presenza di proteine altamente idrofobiche, è l'agente caotropo maggiormente utilizzato. La sua funzione è quella di srotolare le proteine nella loro struttura primaria rompendo i ponti idrogeno intra e inter-molecolari.

I detergenti vengono aggiunti per rompere interazioni idrofobiche e incrementare la solubilità proteica al relativo punto isoelettrico. Come detergenti vengono utilizzati quelli non ionici, come Triton X-100, o quelli zwitterionici tra i quali il CHAPS è quello maggiormente utilizzato.

I riducenti hanno la funzione di rompere i ponti disolfuro presenti mantenendo quindi le proteine nel loro stato più ridotto.

Per campioni particolarmente ricchi in cisteine, dopo il passaggio di riduzione dei ponti disolfuro, si può procedere all'alchilazione delle cisteine libere che consiste nel legame covalente di un gruppo alchilico al sito attivo della cisteina così da prevenire la formazione di nuovi ponti disolfuro. Il reagente maggiormente utilizzato per l'alchilazione delle proteine è la Iodoacetamide.

A questi composti possono essere anche aggiunti inibitori di proteasi utili a prevenire la degradazione dei polipeptidi ad opera di enzimi proteolitici che conservano una certa attività in presenza di urea e detergenti.

Una volta ottenuta la solubilizzazione delle proteine i campioni sono pronti per essere analizzati mediante elettroforesi bidimensionale.

1.3.1.2 Prima dimensione - Isoelettrofocalizzazione

L'isoelettrofocalizzazione è un metodo di separazione delle proteine che, sfruttando la loro carica elettrica, permette di separarle in base al loro punto isoelettrico. Le proteine sono delle molecole anfotere, cioè sono molecole che variano la loro carica a seconda del pH del mezzo in cui esse si trovano. Quando si analizza una miscela proteica con questo metodo, le proteine tenderanno a migrare verso l'anodo o verso il catodo a seconda della loro carica netta. Questa è definita come la somma di tutte le cariche positive e di quelle negative di tutti gli amminoacidi formanti la catena polipeptidica (Westermeier, 2001). Per definizione il punto isoelettrico di una proteina coincide con il valore di pH in cui la proteina ha carica netta uguale a zero. Quindi una proteina sarà caricata positivamente a valori di pH inferiori al suo punto isoelettrico mentre lo sarà negativamente a quelli superiori. Una proteina posta in un gradiente di pH sotto l'influenza di un campo elettrico si muoverà verso il suo punto isoelettrico, cioè sino al punto in cui avrà carica netta uguale a zero. Fino a quando è applicato un campo elettrico l'effetto della diffusione delle proteine non sarà presente in quanto alla diffusione si oppone la forza elettromotrice che riporta ogni proteina al suo punto isoelettrico ottenendo così bande molto ben risolte. Questa tecnica

elettroforetica viene quindi utilizzata per la separazione di proteine in miscele complesse sfruttando la capacità intrinseca di questo metodo di discriminare tra punti isoelettrici che differiscono anche solo di 0,01 unità di pH. Attualmente il gradiente di pH viene ottenuto mediante la miscelazione 'utilizzo delle Immobiline, che sono dei derivati dell'acrilammide sintetizzati in modo da avere differenti gruppi funzionali che conferiscono una rosa di pK ben distribuiti e compresi in un range da 1 a 12.

Tali composti hanno struttura generale:



Dove R sarà un gruppo amminico o carbossilico in relazione al pK di quella determinata Immobilina. Tali composti vengono co-polimerizzati nel gel determinando così un gradiente di pH immobilizzato che garantisce un'elevatissima stabilità nel tempo (Gorg et al., 2000). Il pH del gradiente sarà in funzione della quantità di Immobiline con determinati pK usati nella polimerizzazione del gel. Grazie a tali molecole si possono ottenere gradienti di pH lineari o estesi e i range di pH possono essere vari, dallo standard 3-10 a gradienti di pH molto ristretti che possono anche essere di una sola unità di pH.

1.3.1.3 Seconda dimensione – SDS-PAGE

La seconda dimensione è una elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE). E' un metodo elettroforetico

di separazione delle proteine in funzione del loro peso molecolare. Si tratta di separare in un campo elettrico le proteine dopo averle denaturate e caricate negativamente in modo uniforme con l'SDS, un detergente ionico, usando come supporto un setaccio tridimensionale di acrilammide polimerizzata (gel). L'SDS una volta posto in soluzione acquosa forma delle micelle che si legano alle proteine mascherandone le loro cariche intrinseche in modo da conferire loro la stessa densità di carica. Tale detergente si lega con grande affinità alle proteine causandone la denaturazione. La separazione elettroferetica avverrà quindi in base alla massa molecolare delle proteine. Il gel viene polimerizzando da monomeri di acrilamide con l'ausilio di reagenti (in genere N,N-metilenbisacrilammide) che creano legami trasversali formando così una maglia i cui pori hanno il diametro voluto. La reazione di polimerizzazione vede l'uso di ammoniopersolfato come catalizzatore e del TEMED che provvede attraverso i suoi amminogruppi al rilascio dei radicali che daranno il via alla reazione. La dimensione dei pori può essere controllata in modo da avere pori delle dimensioni volute, omogenei e riproducibili attraverso la variazione delle due variabili T e C della relazione seguente:

$$T = \frac{(a+b) \times 100}{V} [\%] \qquad C = \frac{b \times 100}{a + b} [\%]$$

dove a rappresenta il peso dell'acrilammide nel gel, b il peso della metilenbisacrilammide e V il volume in ml della soluzione.

Quando C rimane costante e T aumenta, il diametro dei pori decresce; quando invece T rimane costante e C aumenta, la dimensione dei pori ha un andamento a parabola dove a bassi ed alti valori di C i pori sono larghi ed il minimo si raggiunge dove C è uguale al 4%.

Mediante l'utilizzo di gradientatori è possibile ottenere gel in gradiente con differente percentuale di acrilammide, dove le dimensioni dei pori saranno decrescenti dall'alto verso il basso.

1.3.1.4 Colorazione del gel

La colorazione ha lo scopo di visualizzare le proteine separate sul gel. Le caratteristiche di un'ottimale tecnica di colorazione sono una elevata sensibilità e linearità, essere quantitativa, inoltre dovrebbe essere compatibile con le successive analisi di identificazione delle proteine o delle loro modificazioni post-traduzionali ed essere semplice ed economica. Una colorazione che possiede tutte queste caratteristiche non esiste, tutte presentano dei vantaggi e degli svantaggi. Attualmente le tecniche basate sulla fluorescenza sono in rapido sviluppo perchè presentano delle ottimali caratteristiche di accuratezza a livello quantitativo, presentano un'elevata sensibilità e sono compatibili con le metodiche di identificazione delle proteine e modificazioni post-traduzionali. Svantaggi principali sono i costi ancora elevati e la laboriosità del metodo.

Le colorazioni attualmente maggiormente utilizzate sono quelle organiche con Coomassie (R e G) e quella al nitrato d'argento. Le metodiche di colorazione basate sull'utilizzo del Coomassie sono stabili, riproducibili, veloci e quantitative e sono anche compatibili con l'analisi di massa. Lo svantaggio principale di queste colorazioni è la sensibilità, anche se dopo la messa a punto di colorazioni al Coomassie G colloidale si è ottenuto un grande miglioramento della sensibilità di tale tecnica (Candiano et al., 2004).

Le tecniche di colorazione che utilizzano l'argento nitrato sono basate sulla saturazione del gel con gli ioni argento e sul legame tra questi ultimi e le proteine che determina la formazione di argento metallico che precipitando determina la colorazione della superficie delle proteine. Questi metodi hanno limiti di rilevazione molto bassi arrivando anche ad un nanogrammo di proteina ma non hanno un ampio range di linearità che non permette un loro uso per studi quantitativi. Per bloccare la reazione di rivelazione delle proteine è necessario utilizzare una soluzione di stop che prevede l'uso di sostanze in grado di chelare gli ioni argento. La durata della fase di rivelazione è pertanto arbitraria, quindi potrebbero esserci possibili problemi di riproducibilità. Altro importante svantaggio è che le normali tecniche che utilizzano il nitrato d'argento come colorante non sono compatibili con le analisi di spettrometria di massa, si stanno quindi mettendo a punto delle colorazioni modificate che ne rendano possibile la compatibilità con le analisi di identificazione delle proteine (Jin et al., 2004).

Attualmente stanno acquistando importanza e vi sono studi sulla messa a punto di colorazioni specifiche per le modificazioni post-traduzionali. Tali colorazioni, basate su tecniche di fluorescenza, permettono di avere informazioni su modificazioni che avvengono dopo la traduzione dell'RNA in proteine, quindi non identificabili mediante analisi genomiche e trascrittomiche. E' importante ricordare che tali modificazioni sono estremamente importanti nella regolazione dell'attività o nella modulazione della funzione proteica.

1.3.1.5 Analisi di immagine

Le informazioni ottenute in un gel di elettroforesi bidimensionale sono elevate ed una loro corretta analisi prevede l'utilizzo di software dedicati all'analisi dell'immagine. Per questo le mappe bidimensionali vengono digitalizzate utilizzando appositi scanner densitometrici che garantiscono un'ottima risoluzione. Le immagini ottenute vengono quindi analizzate con software specifici per individuare differenze quantitative e qualitative tra gli spot. L'analisi di immagine si compone di vari passaggi di elaborazione che vengono effettuati sulle immagini. Tali passaggi prevedono l'individuazione degli spot (detection), un loro confronto fra gel differenti (matching), la quantificazione dei volumi, l'ottenimento di profili d'espressione e l'analisi statistica dei dati. Il principale problema dei software attualmente in commercio è nella loro non completa automatizzazione che permette

un'analisi completa e precisa senza l'intervento manuale da parte dell'operatore. Il passaggio più critico è quello dell'identificazione degli spot (spot detection), infatti è in questo passaggio che è richiesto l'intervento dell'operatore per validare l'operato del software. E' infatti possibile che il software riconosca come spot un rumore di fondo o non riconosca come spot una proteina presente in bassa quantità. Dopo l'identificazione di uno spot vengono fornite a quest'ultimo una serie di caratteristiche quali area, volume, coordinate x/y ecc.

Passaggio successivo è quello del confronto tra due o più mappe bidimensionali basato anche sulla creazione di gel virtuali di riferimento che contengono la totalità degli spot rilevati in un determinato esperimento. In tale passaggio i singoli spot vengono sovrapposti al gel di riferimento o con altri gel facenti parte dell'esperimento per valutarne il livello di espressione e la presenza in tutti i gel e quindi in tutti i campioni in esame. L'analisi statistica finale ci permette di valutare le differenze nei livelli di espressione dei singoli spot e quindi delle singole proteine.

1.3.1.6 Database di mappe bidimensionali

Come descritto in precedenza, l'introduzione dei gradienti immobilizzati in prima dimensione ha permesso l'ottenimento di un elevato grado di riproducibilità nell'esecuzione di mappe bidimensionali anche tra laboratori differenti. Ciò ha permesso la costruzione di mappe elettroforetiche di

riferimento caratteristiche di differenti tessuti, organi, cellule, microorganismi ecc. Tali mappe sono state poi inserite in banche dati specifiche che contengono mappe con iper-link degli spot identificati. Le informazioni presenti in queste banche dati non si limitano alle immagini dei gel ma contengono tutte le informazioni esistenti sulle proteine in questione. Attualmente i data base sono sempre più specifici e informativi contenendo informazioni non solo sulla singola proteina, ma anche sulle modifiche post-traduzionali, sulla struttura e, quando note, sulle interazioni con altre proteine.

L'elevata riproducibilità ottenuta nell'esecuzione di gel bidimensionali permette il riconoscimento di spot basandosi sul confronto (matching) della mappa prodotta con mappe presenti in data base o pubblicate da altri autori (Bini et al., 1997). Tale metodologia permette un'identificazione degli spot che sfrutta esperimenti già pubblicati in cui il riconoscimento delle proteine viene ottenuto mediante analisi di spettrometria di massa. Tale metodo permette un semplice riconoscimento di quegli spot proteici ben caratterizzati mentre non può essere utilizzato per l'identificazione di quegli spot non ancora identificati.

1.3.1.7 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente di misurare la massa di molecole ed atomi attraverso la conversione degli analiti in ioni

gassosi ad elevata mobilità che vengono poi analizzati. Il principio di funzionamento di tali strumenti si può suddividere in due parti principali: 1) una fonte di ionizzazione che introduce il campione nella macchina; 2) un apparato di misura della massa degli ioni introdotti. Esistono principalmente due tipi di spettrometri utilizzati negli studi proteomici e precisamente “matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), che genera ioni da campioni in fase solida e misura la loro massa in un tubo dove gli ioni volano in tempi diversi in base alla loro massa e “electrospray ionization mass spectrometry” (ESI-MS), che genera ioni da campioni in fase liquida e ne misura la massa o tramite un apparecchio definito quadrupolo o in un tubo di volo come quello descritto sopra.

L'abbinamento dell'elettroforesi 2D alla spettrometria di massa prevede l'excissione degli spot o delle bande di interesse dal gel e, dopo la decolorazione per eliminare possibili interazioni del colorante, una digestione delle proteine mediante proteasi. Ogni proteina è caratterizzata da un insieme specifico di peptidi che è specifico e caratteristico per ogni proteasi utilizzata e può essere definito come impronta digitale della proteina. La proteasi maggiormente utilizzata è la tripsina. Il digerito triptico, che si ottiene per digestione in situ della proteina con tripsina, viene successivamente analizzato mediante spettrometria di massa e la massa dei singoli peptidi viene determinata. L'insieme dei peptidi che si ottengono mediante digestione di una proteina è caratteristico e quindi una loro analisi permette l'identificazione della proteina. Le masse dei peptidi del campione

analizzato vengono confrontate con quelle teoriche generando una serie di punteggi che rappresentano il confronto fra la massa teorica e quella determinata sperimentalmente. La proteina risultata come la più probabile sarà quella che darà la migliore sovrapposizione tra la massa dei peptidi analizzati con quelli dei dati teorici. Il numero di peptidi osservati e l'accuratezza della loro misurazione concorreranno a dare sicurezza e attendibilità all'identificazione.

1.4 Proteomica e qualità della carne: stato dell'arte

La proteomica offre un potente strumento con cui identificare le proteine e studiarne le modificazioni che possono essere coinvolte, o che possono dare un'indicazione, di alterazioni nella qualità della carne (Carbonaro, 2004). Vi sono molti lavori in cui la proteomica è stata impiegata per studi sul metabolismo muscolare, la crescita e lo sviluppo del tessuto muscolare, sulle modificazioni che avvengono durante il post-mortem e durante l'invecchiamento della carne. Come è stato descritto in precedenza, la qualità della carne è una caratteristica complessa, influenzata sia da componenti genetiche, sia da fattori ambientali come l'alimentazione, la gestione degli animali durante la crescita, il trasporto e le corrette procedure di trattamento e frollatura della carne durante e dopo la macellazione. La sfida maggiore negli studi sulla qualità della carne è rappresentata dall'incrementare le conoscenze sulla variabilità della tenerezza delle carni.

Nonostante molti dei fattori biochimici siano ben noti (Koochmaraie, 1996; Maltin et al., 2003) e un numero di QTL per la tenerezza siano stati determinati (Burrow et al., 2001; Rothschild, 2004) lo studio dei complessi meccanismi che avvengono durante il post-mortem e portano alla trasformazione del muscolo in carne rappresenta un argomento di grande attualità ed interesse. Inoltre, la comprensione dei meccanismi molecolari che influenzano la capacità di ritenzione dell'acqua e le interrelazioni tra la crescita muscolare, lo sviluppo e le caratteristiche di qualità della carne sarebbe di grande aiuto nel miglioramento dei metodi di produzione e delle tecnologie di lavorazione delle carni.

La letteratura esistente riporta lavori di proteomica applicata allo studio della crescita e dello sviluppo muscolare, del metabolismo post-mortem, del ruolo svolto dalle calpaine nell'influenzare la tenerezza della carne e sulla capacità di ritenzione idrica della carne.

I tessuti muscolari scheletrici sono popolazioni eterogenee di fibre muscolari e generalmente vengono classificati in base alle loro caratteristiche metaboliche e alle loro proprietà contrattili. In tutte le specie animali le proprietà delle fibre muscolari vengono modificate durante la vita post-natale in relazione all'età, sesso, razza (Picard et al., 2002). A tale riguardo lo studio della crescita e dello sviluppo muscolare rappresenta un fattore di estrema importanza nello studio della qualità della carne. Infatti, le relazioni fra i tipi di fibre presenti nel muscolo e le caratteristiche di qualità della carne come succosità, sapore e tenerezza è un argomento ancora molto

dibattuto e, in particolare, l'influenza dei tipi di fibre sulla tenerezza della carne rimane poco chiaro.

Diversi studi di proteomica sono stati effettuati al fine di descrivere tutte le diverse proteine che sono presenti in un campione di carne. Questo approccio, di tipo puramente descrittivo, può essere visto come la mappatura del proteoma. Uno studio volto a caratterizzare tutte le proteine espresse nel muscolo bovino semitendinoso (ST) è stato effettuato mediante la combinazione della 2-DE e della spettrometria di massa ed ha portato all'individuazione di 500 differenti spot proteici presenti nel gel. Di questi, 129 sono stati analizzati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF e hanno portato all'identificazione di 75 diversi prodotti genici. Circa il 25% delle proteine identificate erano coinvolte in vie metaboliche mentre il 17% erano associate alla struttura, il 16% alla difesa e il 14,5% era rappresentato da proteine con funzione contrattile (Bouley et al., 2004). Tuttavia, come queste proteine siano legate alla qualità della carne non è stato indagato in questo studio.

Un notevole contributo nella comprensione di come la crescita muscolare e la qualità della carne siano correlati è stato dato dallo studio dell'ipertrofia muscolare nei bovini (fenotipo a doppia coscia) e il callipyge, ipertrofia muscolare dei quarti posteriori e dei lombi negli ovini (Fiems et al., 1995; Taylor e Koohmaraie, 1998). Recentemente è stato riportato un lavoro di proteomica volto a caratterizzare il meccanismo molecolare della miostatina associato al fenomeno dell'ipertrofia muscolare nei bovini (Bouley et al., 2005). Questo lavoro ha descritto marcatori molecolari associati ad una

delezione di 11 paia di basi nel gene della miostatina. Tale mutazione è responsabile della produzione di una proteina inattiva ma espressa a livelli normali. Il confronto fra il profilo proteomico ottenuto dall'analisi del muscolo semitendinoso di giovani tori di razza Blu Belga con e senza mutazione nel gene della miostatina ha mostrato 13 proteine differenzialmente espresse associate al metabolismo e alla contrazione muscolare. L'aspetto di maggior interesse è rappresentato dal fatto che sembra che il pattern di isoforme della troponina T sia influenzato dalla mutazione della miostatina. Gli autori suggeriscono che la miostatina controlli la proliferazione delle fibre muscolari a contrazione rapida ("fast-twitch") caratterizzate da una grande attività glicolitica e che queste siano presenti in rapporto maggiore nei muscoli di quei soggetti caratterizzati dall'ipertrofia muscolare. Ulteriori studi proteomici associati alla crescita muscolare sono riportati in bovini (Chaze et al., 2008), ovini (Hamelin et al., 2006), polli (Doherty et al., 2004) e suini (Kim et al., 2007). Tali studi hanno consentito di ampliare le conoscenze e di comprendere meglio le fasi chiave della miogenesi.

La comprensione delle relazioni fra metabolismo post-mortem e qualità della carne rappresenta il punto chiave per chi si occupa dello studio della qualità della carne. Come è noto gli eventi biochimici che avvengono durante il periodo post-mortem influenzano pesantemente la qualità della carne. Vi sono molteplici fattori che influenzano le reazioni biochimiche durante il post mortem, fra questi possiamo citare modificazioni correlate a fattori fisico-chimici (Goll et al., 1964), proprietà istochimiche dei muscoli

(Brocks et al., 1998), temperatura di conservazione della carcassa (Monin et al., 1995), genotipo dei soggetti (Warner et al., 2010), ecc. Una serie di studi hanno descritto come la degradazione post-mortem delle proteine miofibrillari possa essere coinvolta nella tenerezza della carne, ed in particolare sono stati descritti i meccanismi di degradazione delle proteine contrattili. La proteomica è stata utilizzata per studiare i cambiamenti che si verificano nel muscolo durante la conservazione post-mortem. L'analisi degli estratti proteici totali ottenuti da campioni di *longissimus dorsi* (LD) di suino prelevati a 0, 4, 8, 24 e 48 ore dopo la macellazione, ha dimostrato un cambiamento nell'espressione di 15 proteine. Alcune di queste proteine mostravano un aumento mentre altre un calo durante la conservazione post-mortem (Lametsch et al., 2001; Lametsch et al., 2002). Molte di queste proteine sono state identificate come frammenti di proteine strutturali quali l'actina, la catena pesante della miosina e la troponina T. Ciò dimostra come l'analisi 2-DE sia utile nello studio delle modifiche delle proteine che si verificano nel muscolo di suino durante la conservazione post mortem della carcassa.

E' ormai noto che le calpaine giocano un ruolo chiave nell'intenerimento delle carni (Taylor et al., 1995), e che il fattore limitante è in realtà l'inibizione mediata dalla calpastatina sull'attività post-mortem della calpaina (Koohmaraie et al., 1992). Uno studio basato su tecniche di proteomica è stato condotto mediante la co-incubazione in vitro di sub-frazioni di proteine miofibrillari e calpaina per studiare l'attività di tale enzima sulle proteine miofibrillari (Lametsch et al., 2004). Il meccanismo di

degradazione dell'actina, della desmina, della troponina e di differenti isoforme della tropomiosina ad opera della calpaina è stato identificato. Attualmente si sta cercando di correlare il meccanismo e l'entità di degradazione di queste proteine con la tenerezza della carne.

Infine, anche la capacità di trattenere acqua da parte di un muscolo è una caratteristica importante di qualità della carne ed è in stretta relazione alle variazioni del metabolismo nel periodo post-mortem. Ci sono evidenze di come la variazione di singoli geni possa influenzare la perdita di liquidi per sgocciolamento su carni suine. Tra i geni coinvolti in questo fenomeno sono note le variazioni a carico del recettore della rianodina (Ervasti et al., 1991), e le variazioni del gene PRKAG3, comunemente chiamato gene RN (Le Roy et al., 2000). Recentemente, uno studio proteomico comparativo ha messo in evidenza che mutazioni nel gene RN possono influenzare l'espressione di enzimi coinvolti nell'accumulo di glicogeno a livello muscolare (Hedegaard et al., 2004). Tale lavoro ha mostrato anche differenze nell'espressione di enzimi coinvolti nella glicolisi e nel ciclo dell'acido citrico. Studi di tali modificazioni possono essere di fondamentale importanza per indagare i meccanismi molecolari che influenzano la perdita per sgocciolamento in carni suine.

Uno studio effettuato mediante il confronto fra biopsie di muscolo (LD) prelevate da animali vivi e campioni di muscolo (LD) prelevati alla macellazione ha mostrato come vi sia un cambiamento nell'espressione di 24 proteine associate al metabolismo (Jia et al., 2006). Ciò mostra come il contributo di diversi fattori, quali il trasporto, la sosta, lo stordimento, il

dissanguamento e lo scuoiamento possa influenzare l'espressione proteica nell'animale. L'identificazione delle proteine mediante analisi di spettrometria di massa MALDI-TOF/TOF ha rivelato che una vasta gamma di enzimi metabolici e di proteine coinvolte con lo stress aumentano dopo la macellazione. Tra questi possiamo citare enzimi glicolitici come enolasi, aldeide deidrogenasi, fosfoglicerato chinasi o enzimi coinvolti nel metabolismo ossidativo come succinil-CoA deidrogenasi e isocitrato deidrogenasi. Questo indica che durante il post-mortem avviene il cambiamento atteso nel metabolismo energetico del muscolo con aumento della via glicolitica ma che durante la prima ora dopo la macellazione si osserva un aumento del metabolismo energetico aerobico.

2. SCOPO DEL LAVORO

La qualità della carne è una caratteristica complessa influenzata da componenti genetiche, dal sistema d'allevamento, dall'alimentazione, dal trasporto, dalla macellazione, dal trattamento della carne durante il processo di macellazione e dal processo di frollatura della carne. Le caratteristiche qualitative della carne sono quindi il risultato dei complessi processi biochimici che avvengono nel muscolo. Per definire dei parametri utili alla classificazione qualitativa delle carni da un punto di vista produttivo e commerciale, e per fornire indicazioni ai consumatori, vengono utilizzati dei parametri facilmente misurabili sulla materia prima carne, quali tenerezza, colore, consistenza, sapore, ecc. Tali parametri, utili da un punto di vista pratico, sono poco informativi sui processi biochimici che stanno alla base della trasformazione del muscolo in carne. Pertanto lo scopo di questo lavoro è stato la valutazione delle variazioni nel metabolismo o nella struttura del muscolo che influenzano la qualità della carne. A tale scopo l'approccio utilizzato prevede l'analisi di campioni di muscolo prelevati in fase di macellazione mediante tecniche proteomiche. La scelta di effettuare le analisi su campioni di muscolo prelevati subito dopo la macellazione dell'animale è dettata dall'importanza della caratterizzazione dello stato biochimico metabolico del muscolo prima dell'inizio del processo della proteolisi. Come riportato in precedenza i meccanismi di trasformazione del muscolo in carne sono il risultato di reazioni biochimiche a carico di proteine strutturali del muscolo che sono a loro volta influenzate dal

metabolismo muscolare nel post mortem. Variazioni nelle proteine strutturali della miofibrilla o nelle reazioni metaboliche che, sfruttando il glicogeno muscolare, portano all'acidificazione del muscolo e all'attivazione delle proteasi giocano un ruolo determinante nella determinazione dei parametri misurati per la valutazione della qualità della carne. Il vantaggio offerto dalla proteomica è quello di avere in una sola separazione elettroforetica bidimensionale un quadro completo delle proteine espresse in quel dato momento e in quel determinato muscolo in esame. Lo scopo del lavoro è stato anche quello di identificare potenziali marcatori in grado di predire determinati parametri di qualità della carne.

Per quanto riguarda la parte inerente l'alimentazione degli animali, lo scopo del lavoro è stato la valutazione dell'effetto della somministrazione di un integratore alimentare contenente vitamina C, selenio e vitamina E (ai limiti massimi di dosaggio consentiti per legge) sulla qualità della carne e del momento ottimale per la sua somministrazione per ottimizzare i benefici dell'attività antiossidante dei suoi componenti nel miglioramento della qualità della carne. Come è noto eventi stressanti portano alla formazione di specie ossidative che andranno poi ad agire a livello proteico o di lipidi della membrana cellulare che portano poi ad un peggioramento della qualità della carne. Questo scadimento spesso è associato a modificazioni del metabolismo muscolare. A tale scopo si è valutata l'espressione proteica mediante l'analisi proteomica di muscoli di soggetti alimentati a tempi diversi con l'integratore alimentare e di soggetti controllo che non ricevevano l'integrazione.

Questo lavoro è stato eseguito nell'ambito di due progetti di ricerca nazionali finanziati dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali dal titolo:

- Valorizzazione e Standardizzazione di una filiera carne dall'allevamento alla distribuzione (Standbeef) .
- Ricerca ed innovazione nelle attività di miglioramento genetico animale mediante tecniche di genetica molecolare per la competitività del sistema zootecnico nazionale (SELMOL).

La scelta della razza di bovini e del muscolo da utilizzare per le analisi è stata differente nei due progetti e dettata dagli scopi finali del progetto.

Nel caso del progetto Standbeef la prova è stata effettuata in un allevamento della pianura veronese dove la produzione di carne si basa sull'ingrasso di broutard acquistati sul mercato francese di razza Limousine. Il muscolo utilizzato per le analisi è il *longissimus thoracis* ed il prelievo per il campione di carne su cui fare le analisi è stato effettuato in corrispondenza della nona vertebra toracica. Tale muscolo è quello maggiormente utilizzato in letteratura per analisi fisiche di qualità della carne.

La finalità del progetto SELMOL, che vede coinvolte 16 Università italiane, le associazioni degli allevatori e altri centri di ricerca nazionali, è quello di realizzare un modello organico ed integrato tra le conoscenze di genetica molecolare e quelle tecniche-operative degli schemi di selezione animale, al fine di validare sperimentalmente le conoscenze acquisite a sostegno del progresso genetico delle produzioni animali. Per quanto riguarda la parte

inerente la produzione della carne si è deciso di lavorare sulla razza Marchigiana. Questa, è una razza bovina di origine podolica derivante dai bovini asiatici giunti in Italia nel IV secolo d.C. con le invasioni barbariche successivamente migliorata mediante incrocio con soggetti di razza chianina e successivamente all'unione delle bovine meticce Chianine-Podoliche con tori di razza Romagnola. Dal 1928 fu sospesa ogni forma di incrocio per procedere al miglioramento mediante selezione morfo-funzionale effettuato secondo direttive che prevedessero l'iscrizione ai libri genealogici. La Marchigiana si presenta come un bovino di notevole sviluppo somatico, caratterizzato da elevata capacità di accrescimento e ottima precocità. Il mantello è bianco, talvolta con sfumature grigie nei maschi; la pigmentazione della cute e delle mucose è nera. La testa è leggera con corna brevi. Il tronco è lungo e cilindrico, con ottimo sviluppo delle masse muscolari, particolarmente nella natica e nella coscia. Le vacche sono ottime madri e partoriscono naturalmente vitelli del peso medio di 45 Kg. La capacità di accrescimento è eccellente, avendo raggiunto nei migliori esemplari punte di 2 Kg al giorno. Le vacche pesano tra i 7 ed i 9 quintali ed i maschi adulti 12-15. Razza precoce, raggiunge il peso ideale a 15-16 mesi, con rese fino al 67%.

Per le analisi il muscolo scelto è lo *sternocleidomastoideo* che è un muscolo della regione anterolaterale del collo che origina, come dice il nome stesso, da due capi, il capo sternale ed il capo clavicolare. Il capo sternale origina dalla parte alta della faccia anteriore del manubrio dello sterno mentre quello clavicolare origina dal quarto mediale della faccia superiore della

clavicola. Questi due capi si inseriscono con un tendine comune a livello del processo mastoideo dell'osso temporale e del terzo laterale della linea nucale superiore. Tale muscolo è responsabile dei movimenti del capo, la contrazione dello *sternocleidomastoideo* da un solo lato produce flessione del capo da quel lato e la rotazione del capo dal lato opposto; la contrazione contemporanea dei due muscoli flette il capo. La scelta di tale muscolo è dovuta al suo facile reperimento in sede di macellazione e al suo scarso valore dal punto di vista commerciale che di fatto non incide con il deprezzamento della carcassa successivo al prelievo. La scelta di tale muscolo è stata anche determinata dalla presenza in bibliografia di molti lavori che utilizzano tale muscolo per le analisi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento e animali in esperimento

Progetto SELMOL

Per le analisi proteomiche, al momento della macellazione, su 172 vitelloni maschi di razza Marchigiana iscritti al libro genealogico e provenienti da allevamenti diversi, è stato effettuato il prelievo di circa 20 gr di muscolo *sternocleidomastoideo*.

Su ciascun soggetto è stato rilevato il peso della carcassa a caldo subito dopo la macellazione per la determinazione della resa, la valutazione della conformazione della carcassa in base alla griglia SEUROP e lo stato di ingrassamento degli animali, attribuendo un punteggio da 1 a 5 alle diverse regioni della carcassa secondo i criteri e le metodologie EAAP-CEE. Il prelievo è stato eseguito su tutti gli animali al medesimo tempo post-mortem e i campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento delle analisi.

Progetto Standbeef

La prova è stata effettuata in un allevamento della pianura veronese dove la produzione si basa sull'ingrasso di broutard acquistati sul mercato francese di razza Limousine. Per le analisi proteomiche relative alla prova sull'uso di antiossidanti nella dieta, alla macellazione su 90 Vitelloni maschi di razza Limousine, è stato effettuato il prelievo di circa 20 gr di muscolo

longissimus thoracis in corrispondenza della nona vertebra toracica che è stato poi conservato congelato fino all'esecuzione delle analisi.

Il piano sperimentale ha previsto la divisione dei 90 animali in 3 gruppi omogenei da 30 animali ciascuno:

- Gruppo di controllo: somministrazione di zeolite;
- Gruppo 1: somministrazione dell'integratore alimentare gli ultimi 30 giorni di allevamento;
- Gruppo 2: somministrazione dell'integratore alimentare gli ultimi 60 giorni di allevamento.

La somministrazione della zeolite al gruppo di controllo si è resa necessaria visto la sua utilizzazione come supporto inerte per la somministrazione dell'integratore alimentare agli animali in prova.

Sui soggetti in prova sono state compilate delle schede benessere mirate alla valutazione dello stato degli animali in due punti differenti del ciclo produttivo: inizio prova in cui tutti gli animali venivano alimentati con la razione di ingrasso e dopo 20 giorni dalla prima somministrazione della razione di finissaggio. In base ai dati ottenuti dall'analisi dei risultati delle schede benessere, sono stati definiti poi due gruppi formati dai soggetti definiti "migliori", che non presentavano problemi durante la fase di allevamento, e dai soggetti "peggiori" rappresentati da quegli animali che hanno presentato problemi durante l'allevamento.

3.2 Estrazione delle proteine

Dopo aver eseguito differenti prove di solubilità, per l'estrazione delle proteine del muscolo è stata scelta la metodica che prevede l'uso dell'OMNIZol (Euroclone). Si tratta di un kit per l'estrazione contemporanea di acidi nucleici e proteine dallo stesso campione. In questo modo si ottiene la rimozione degli acidi nucleici dal pellet proteico e la rimozione dei lipidi, in modo da avere un estratto purificato e senza sostanze che interferiscano con l'elettroforesi. Per ogni campione di muscolo sternocleidomastoideo, 100 mg di tessuto sono stati sospesi in 1ml di OMNIZol con aggiunta di 10 μ l di inibitori di proteasi (Ettan Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare) e 20 μ l di EDTA 0.25M. Dopo omogeneizzazione in ghiaccio, l'estrazione delle proteine è stata effettuata tramite OMNIZol utilizzando il protocollo fornito dal produttore (Euroclone). I pellet proteici ottenuti sono stati pesati e, dopo essere stati sminuzzati, sono stati posti in agitazione con ancorotta magnetica overnight in tampone di solubilizzazione/denaturazione contenente 8M Urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% Ampholine 3.5-10, 15mM Tris. La diluizione è stata effettuata in rapporto 1:4 peso/volume.

La quantificazione delle proteine totali è stata eseguita usando un kit dedicato (2D Quant Kit GE Healthcare) basato sul metodo di Bradford ma modificato per renderlo compatibile con i reagenti utilizzati nel tampone di estrazione.

3.3 Elettroforesi monodimensionale SDS-PAGE

Gli estratti proteici sono stati analizzati in monodimensionale su gel di SDS-PAGE al 10% di acrilamide. Per ciascun pozzetto sono stati seminati 10 µg di proteina, la separazione è stata eseguita utilizzando il seguente protocollo:

- Primo step 10mA gel per 15 minuti
- Secondo step 20 mA gel fino al completamento della corsa elettroforetica

I gel ottenuti sono stati colorati con coomassie G250 colloidale e le immagini sono state acquisite mediante il sistema per l'acquisizione delle immagini Pharos FX (Bio-Rad). L'analisi delle immagini è stata effettuata utilizzando il software Quantity One 4.6.3 (BIORAD).

Al fine di limitare la variabilità causata dalle procedure sperimentali ciascun campione di carne analizzato è stato seminato in tre pozzetti.

3.4 Elettroforesi bidimensionale

La separazione delle proteine in prima dimensione è stata eseguita utilizzando IPG-strip pH 4-8 di 7 cm di lunghezza preparate nel nostro laboratorio e IPG-strip 3-10 di 18 cm (GE Healthcare). Sono stati caricati 300µg di proteine mediante cup loading al catodo e la separazione è stata eseguita utilizzando il seguente protocollo:

- 50 V per 1 ora

- 100 V per 1 ora
- 500 V per 2 ore
- 1000 V per 2 ore
- 2000 V per 2 ore
- 4000 V per 2 ore
- 5000V fino a fine focalizzazione.

L'IEF è stata effettuata utilizzando lo strumento Ettan IPGPhor III (GE Healthcare) fino al raggiungimento di 81KV/h totali.

Dopo l'equilibratura delle strip, la seconda dimensione è stata eseguita in una cella Bio-Rad PROTEAN II xi (Bio-Rad) utilizzando gel di acrilammide al 10%. In seguito i gel ottenuti sono stati colorati utilizzando la colorazione al Coomassie G250 colloidale. Le immagini dei gel, dopo essere state acquisite mediante scansione con il sistema per l'acquisizione delle immagini Pharos FX (Bio-Rad), sono state analizzate con software dedicati Image Master 2D Platinum (GE Healthcare), PD Quest (Bio-Rad) e Progenesis (nonlinear dynamics). Questi software, dedicati all'analisi di mappe bidimensionali, permettono di analizzare gli spot presenti in un gel e di quantificare le differenze di espressione delle proteine.

Al fine di limitare la variabilità causata dalle procedure sperimentali sono state eseguite tre repliche per ciascun campione di carne analizzato.

3.5 Spettrometria di massa

Gli spot di interesse sono stati excisi dal gel, decolorati e disidratati con 100 µl di aceto nitrile. Successivamente, per effettuare la digestione in situ delle proteine, si è proceduto alla reidratazione degli spot con una soluzione contenente tripsina.

Per l'acquisizione degli spettri MALDI/MS è stato utilizzato uno spettrometro di massa MALDI Voyager-DE STR (Applied Biosystems). I dati raccolti mediante MALDI/MS sono stati utilizzati per l'identificazione delle proteine in banca dati con il software Mascot utilizzando la procedura nota come Peptide Mass Fingerprinting. La ricerca è stata effettuata nella banca dati NCBIInr.

L'analisi mediante spettrometria di massa delle proteine è stata possibile grazie alla collaborazione con la Dott.ssa A. Amoresano del Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica dell'Università Federico II di Napoli e grazie all'ItPA (Italian Proteomic Association) la quale ha finanziato una borsa di studio che mi ha permesso di trascorrere una settimana presso il laboratorio della Dott.ssa A. Amoresano per svolgere una parte degli esperimenti di spettrometria di massa necessari allo sviluppo del presente lavoro.

3.6 Analisi statistica

Tutte le differenze di espressione considerate sono state valutate mediante il test T student. Sono state considerate statisticamente significative tutte le differenze tra i gruppi sperimentali che riportavano un valore di $p \leq 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 Prova su vitelloni di razza Marchigiana

Al macello sono stati selezionati 172 vitelloni maschi di razza Marchigiana iscritti al libro genealogico sui quali sono stati registrati i dati produttivi. Tali dati produttivi, riportati in tabella 1, riguardano l'età di macellazione, il peso della carcassa, la classificazione secondo la griglia SEUROP, l'incremento ponderale, la quantità di massa magra e la quantità di massa grassa. I dati produttivi sono stati analizzati mediante il software SAS che ci ha permesso di ottenere il clustering dei campioni mostrato in figura 1. Come si evince dalla figura, i soggetti sono stati suddivisi in 5 gruppi in base a caratteristiche riguardanti l'età, l'incremento ponderale la quantità di massa grassa e la quantità di massa magra. Il gruppo con le migliori performance è rappresentato da quel gruppo di soggetti caratterizzato da ottimi incrementi di peso, migliore conformazione della carcassa e adeguata copertura di grasso. Gli altri gruppi rappresentano una progressiva diminuzione della qualità fino ad arrivare al gruppo peggiore che è caratterizzato da bassi incrementi ed elevata quantità di grasso.

SOG_MATR	MAC_ETA	PESO_CAR	NUM_SEUROP	GRASSO	DELTA_CAR	DELTA_AMG	PRO_PROV	AMG_CAR	CONF_SEUR
IT041990037617	699	617	5	3	165,85	0,239	55	0,883	E
IT041990042669	728	596	5	2	146,37	0,223	55	0,819	E
IT041990042246	728	569	5	3	119,37	0,186	55	0,782	E
IT041990036383	628	564	5	3	115,94	0,162	55	0,898	E
IT041990034113	646	563	5	3	113,24	0,156	55	0,872	E
IT041990044862	569	550	5	3	111,86	0,181	55	0,967	E
IT041990043678	691	561	5	2	109,71	0,156	55	0,812	E
IT043990032055	721	556	5	2	105,85	0,163	54	0,771	E
IT041990037819	692	550	5	2	98,73	0,141	55	0,795	E
IT043990033879	722	548	5	3	97,92	0,153	54	0,759	E
IT042990012777	543	528	5	3	96,35	0,172	52	0,972	E
IT041990044861	572	528	5	3	89,19	0,139	55	0,923	E
IT041990035274	646	531	5	3	81,24	0,106	55	0,822	E
IT042990015404	666	532	5	2	81,08	0,108	52	0,799	E
IT041990038635	660	531	4	3	80,35	0,106	55	0,805	U
IT042990015974	711	531	5	2	80,28	0,123	52	0,747	E
IT041990042672	656	527	5	2	76,57	0,099	55	0,803	E
IT041990043019	715	527	5	3	76,49	0,119	55	0,737	E
IT041990041013	639	524	5	2	74,83	0,096	55	0,820	E
IT041990042668	689	523	5	3	71,70	0,100	55	0,759	E
IT041990045128	574	510	5	3	70,76	0,106	55	0,889	E
IT041990037815	692	518	4	2	66,73	0,095	55	0,749	U
IT041990025029	630	515	5	2	66,72	0,083	55	0,817	E
IT043990028013	710	517	5	2	66,24	0,102	54	0,728	E
IT041990029863	570	502	4	2	63,63	0,096	55	0,881	U
IT041990033352	532	492	5	3	63,48	0,120	55	0,925	E
IT041990038896	722	508	5	2	57,92	0,098	55	0,704	E
IT041990036377	619	503	5	3	56,02	0,068	55	0,813	E
IT041990036946	713	504	5	2	53,38	0,086	55	0,707	E
IT041990043213	728	502	5	2	52,37	0,094	55	0,690	E
IT041990036386	569	490	5	3	51,86	0,075	55	0,861	E
IT041990045130	565	489	5	2	51,77	0,077	55	0,865	E
IT041990043725	648	500	5	2	50,09	0,058	55	0,772	E
IT041990032748	675	501	5	2	49,81	0,063	55	0,742	E
IT041990035043	711	500	5	2	49,28	0,079	55	0,703	E

IT041990041501	679	500	5	2	48,74	0,063	52	0,736	E
IT041990045129	568	486	5	3	48,08	0,069	55	0,856	E
IT041990035636	713	498	5	2	47,38	0,077	55	0,698	E
IT041990044863	559	483	5	3	47,20	0,072	55	0,864	E
IT042990018182	611	490	5	2	44,11	0,049	52	0,802	E
IT041990042670	728	492	5	2	42,37	0,080	55	0,676	E
IT041990036385	632	489	4	2	40,51	0,042	55	0,774	U
IT043990028016	698	490	5	2	38,83	0,057	54	0,702	E
IT041990043726	647	484	4	2	34,17	0,033	55	0,748	U
IT043990029860	720	484	5	2	33,79	0,063	54	0,672	E
IT043990024421	728	483	4	3	33,37	0,067	54	0,663	U
IT041990038930	714	482	4	2	31,43	0,056	55	0,675	U
IT041990042710	490	445	5	2	30,59	0,094	55	0,908	E
IT042990014099	609	476	5	2	30,40	0,027	52	0,782	E
IT041990043682	724	480	4	2	30,06	0,060	55	0,663	U
IT041990033353	532	458	5	2	29,48	0,056	55	0,861	E
IT041990043060	645	478	5	2	28,32	0,024	55	0,741	E
IT043990028960	707	479	4	2	28,11	0,047	54	0,678	U
IT041990036354	658	478	4	3	27,45	0,025	55	0,726	U
IT041990036367	663	478	4	3	27,21	0,026	55	0,721	U
IT041990035637	709	478	5	2	27,19	0,046	55	0,674	E
IT041990040404	643	475	5	3	25,48	0,019	55	0,739	E
IT041990036393	628	472	4	3	23,94	0,016	55	0,752	U
IT041990036391	629	472	4	2	23,83	0,015	55	0,750	U
IT043990033376	690	474	4	3	22,71	0,030	54	0,687	U
IT041990035276	645	472	4	3	22,32	0,015	55	0,732	U
IT043990033380	678	473	4	3	21,76	0,023	54	0,698	U
IT041990042632	622	469	5	3	21,64	0,012	55	0,754	E
IT041990045087	567	459	5	2	21,31	0,023	55	0,810	E
IT041990045089	520	446	5	2	21,17	0,049	55	0,858	E
IT041990036392	629	468	4	3	19,83	0,009	55	0,744	U
IT042990017143	621	466	5	3	18,77	0,007	52	0,750	E
IT041990043729	514	440	4	2	17,11	0,046	55	0,856	U
IT041990043957	472	424	5	3	16,67	0,084	55	0,898	E
IT041990037124	723	466	4	2	15,99	0,041	55	0,645	U
IT041990042630	675	467	3	3	15,81	0,013	55	0,692	R
IT042990014884	647	465	4	2	15,17	0,004	52	0,719	U

IT043990028015	708	466	4	2	15,15	0,029	54	0,658	U
IT041990040400	711	461	5	2	10,28	0,024	55	0,648	E
IT041990025030	580	450	4	3	9,50	-0,003	55	0,776	U
IT043990023337	703	460	5	2	8,96	0,017	54	0,654	E
IT041990040225	502	427	5	2	8,21	0,038	55	0,851	E
IT042990014280	673	459	5	2	7,86	0,000	52	0,682	E
IT041990043684	719	457	4	2	6,72	0,025	55	0,636	U
IT043990028012	729	456	4	2	6,45	0,032	54	0,626	U
IT041990036356	647	456	5	3	6,17	-0,010	55	0,705	E
IT041990043728	597	448	4	2	4,32	-0,015	55	0,750	U
IT042990018920	629	452	5	2	3,83	-0,016	52	0,719	E
IT041990045205	632	452	4	2	3,51	-0,017	55	0,715	U
IT042990013998	664	453	4	2	2,17	-0,012	52	0,682	U
IT042990011751	723	451	4	2	0,99	0,020	52	0,624	U
IT042990020455	590	443	4	2	0,56	-0,020	55	0,751	U
IT041990043958	472	406	4	3	-1,33	0,046	55	0,860	U
IT041990035638	707	448	4	2	-2,89	0,003	55	0,634	U
IT041990041128	580	437	5	3	-3,50	-0,026	55	0,753	E
IT041990036370	662	447	4	2	-3,75	-0,021	55	0,675	U
IT041990035279	658	445	4	2	-5,55	-0,025	55	0,676	U
IT043990024425	727	443	5	2	-6,71	0,012	54	0,609	E
IT042990010532	656	443	4	2	-7,43	-0,029	52	0,675	U
IT041990035789	706	443	5	2	-7,93	-0,006	55	0,627	E
IT042990013953	729	441	4	2	-8,55	0,011	52	0,605	U
IT041990035908	503	410	4	2	-9,14	0,003	55	0,815	U
IT043990018229	714	441	4	3	-9,57	-0,001	54	0,618	U
IT043990028959	724	440	4	2	-9,94	0,005	54	0,608	U
IT041990035050	651	440	4	2	-10,12	-0,034	55	0,676	U
IT041990043020	713	439	4	2	-11,62	-0,005	55	0,616	U
IT041990038222	699	438	4	2	-13,15	-0,017	55	0,627	U
IT043990033377	687	438	5	3	-13,31	-0,024	54	0,638	E
IT043990032787	614	433	5	2	-13,31	-0,045	54	0,705	E
IT042990015886	655	437	4	2	-13,37	-0,038	52	0,667	U
IT094990033095	700	437	4	3	-14,12	-0,018	54	0,624	U
IT042990017150	624	433	5	2	-14,60	-0,046	52	0,694	E
IT094990029706	708	433	4	3	-17,85	-0,017	54	0,612	U
IT043990023341	693	433	5	2	-18,26	-0,028	54	0,625	E

IT041990037133	627	428	4	2	-19,95	-0,054	55	0,683	U
IT041990035788	721	430	4	2	-20,15	-0,012	55	0,596	U
IT043990034692	699	431	4	2	-20,15	-0,027	54	0,617	U
IT042990017168	590	420	4	2	-22,44	-0,059	52	0,712	U
IT060990044687	688	428	4	3	-23,30	-0,038	56	0,622	U
IT041990038899	715	427	5	2	-23,51	-0,021	55	0,597	E
IT041990043951	529	404	4	3	-23,62	-0,042	55	0,764	U
IT041990043960	466	380	4	2	-24,83	0,001	55	0,815	U
IT042990014880	652	424	4	2	-26,19	-0,059	52	0,650	U
IT041990043058	679	424	4	2	-27,26	-0,049	55	0,624	U
IT041990036944	723	422	4	2	-28,01	-0,020	55	0,584	U
IT043990020207	720	420	4	3	-30,21	-0,026	54	0,583	U
IT043990032314	664	420	4	3	-30,83	-0,061	54	0,633	U
IT041990036607	713	419	4	2	-31,62	-0,033	55	0,588	U
IT042990017165	599	412	4	2	-32,02	-0,076	52	0,688	U
IT043990032797	547	397	4	2	-35,74	-0,072	54	0,726	U
IT041990035790	700	415	4	2	-36,12	-0,049	55	0,593	U
IT042990016343	724	413	4	2	-36,94	-0,033	52	0,570	U
IT041990038345	642	412	4	2	-37,44	-0,079	55	0,642	U
IT041990048845	471	369	3	2	-37,92	-0,031	55	0,783	R
IT042990018922	615	408	4	2	-38,45	-0,086	52	0,663	U
IT043990031274	681	412	4	2	-39,28	-0,065	54	0,605	U
IT041990035635	721	406	4	2	-44,15	-0,045	55	0,563	U
IT043990032316	659	406	4	2	-44,60	-0,084	54	0,616	U
IT043990034693	679	406	4	2	-45,26	-0,075	54	0,598	U
IT041990044157	688	406	4	2	-45,30	-0,070	55	0,590	U
IT043990023342	687	405	5	2	-46,31	-0,072	54	0,590	E
IT043990033378	682	404	4	2	-47,29	-0,077	54	0,592	U
IT094990035842	688	400	5	2	-51,30	-0,079	94	0,581	E
IT042990018820	558	384	5	2	-51,56	-0,104	55	0,688	E
IT042990014427	724	398	4	2	-51,94	-0,053	52	0,550	U
IT041990040704	596	391	4	2	-52,51	-0,110	55	0,656	U
IT042990013949	722	397	3	2	-53,08	-0,056	52	0,550	R
IT041990048844	527	373	3	2	-54,02	-0,098	55	0,708	R
IT042990014433	697	397	4	2	-54,20	-0,077	52	0,570	U
IT043990024422	723	393	4	2	-57,01	-0,060	54	0,544	U
IT043990032100	711	392	4	2	-58,72	-0,073	54	0,551	U

IT041990038221	721	390	4	2	-60,15	-0,067	55	0,541	U
IT041990035295	692	390	4	2	-61,27	-0,090	55	0,564	U
IT041990035293	722	388	5	2	-62,08	-0,069	55	0,537	E
IT043990031276	663	387	4	2	-63,79	-0,111	54	0,584	U
IT094990035845	723	385	4	2	-65,01	-0,071	94	0,533	U
IT043990023348	674	386	4	2	-65,16	-0,107	54	0,573	U
IT094990029609	725	382	3	2	-67,86	-0,074	94	0,527	R
IT042990014681	730	381	3	2	-68,47	-0,070	52	0,522	R
IT042990018485	693	381	5	2	-70,26	-0,103	52	0,550	E
IT041990043948	532	356	4	2	-72,52	-0,136	55	0,669	U
IT042990017057	727	374	3	2	-75,71	-0,083	52	0,514	R
IT042990014429	721	372	3	2	-78,15	-0,092	52	0,516	R
IT042990014432	699	372	3	2	-79,15	-0,112	52	0,532	R
IT041990043961	463	324	3	2	-79,56	-0,113	55	0,700	R
IT042990017058	726	370	3	2	-79,79	-0,089	52	0,510	R
IT042990014430	719	368	3	2	-82,28	-0,099	52	0,512	R
IT042990013947	718	366	4	2	-84,34	-0,103	52	0,510	U
IT042990017056	728	365	3	2	-84,63	-0,095	52	0,501	R
IT094990029607	728	364	3	2	-85,63	-0,096	94	0,500	R
IT094990029047	712	353	3	2	-97,67	-0,127	94	0,496	R
IT042990017144	627	349	3	2	-98,95	-0,180	52	0,557	R
IT043990032096	716	347	4	2	103,50	-0,131	54	0,485	U
IT041990043901	633	344	3	2	104,60	-0,188	55	0,543	R
IT042990013951	728	343	3	2	106,60	-0,125	52	0,471	R
IT094990029608	728	342	4	2	107,60	-0,126	94	0,470	U
IT043990032095	716	327	3	2	123,50	-0,159	54	0,457	R

Tabella 1: Dati produttivi rilevati in macello dei 172 vitelloni di razza Marchigiana.

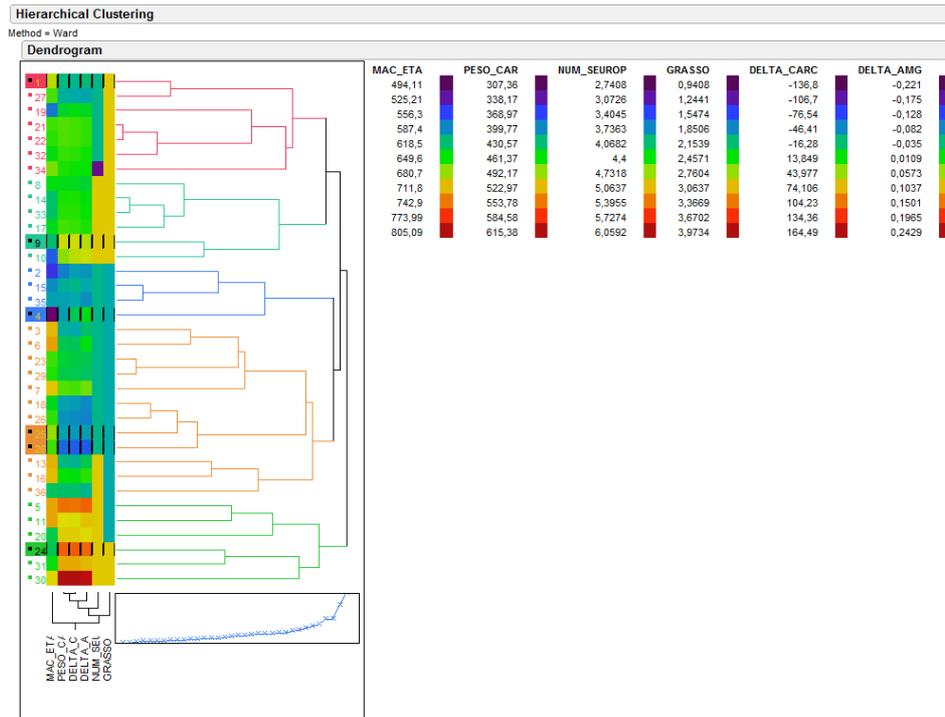


Figura 1: clustering dei campioni in relazione ai dati produttivi.

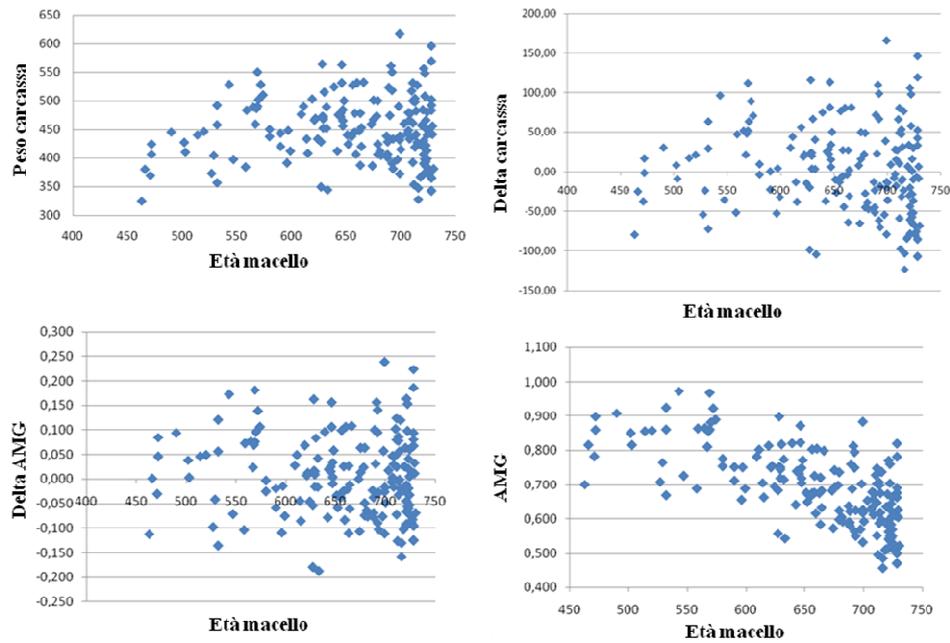


Figura 2: Grafici dei dati produttivi.

In figura 2 sono riportati i grafici relativi ai dati produttivi.

Da ogni bovino (172 campioni) sono stati prelevati 20g muscolo sternocleidomastoideo, ognuno di questi è stato congelato a -80° subito dopo il prelievo. Per la preparazione del campione per l'elettroforesi monodimensionale e bidimensionale i campioni sono stati scongelati e sono stati prelevati 50 microgrammi da utilizzare per l'analisi proteomica.

Per quanto riguarda l'elettroforesi monodimensionale, le proteine sono analizzate mediante SDS-PAGE al 10% e i gel ottenuti sono stati colorati mediante colorazione mediante Coomassie colloidale. Successivamente le

immagini ottenute sono state analizzate utilizzando il software Quantity One 4.6.3 (BIORAD). Per ogni singolo campione sono state effettuate tre ripetizioni variando il pozzetto in cui il campione veniva seminato per annullare eventuali effetti dovuti alla localizzazione della semina nel gel. Le lane e le bande sono state rilevate utilizzando una sensibilità intermedia per evitare il riconoscimento del rumore di fondo. Dopo sottrazione del background si è proceduto all'analisi statistica multivariata.

Il risultato ottenuto da tale analisi è rappresentato da una lista di bande caratterizzate da un valore di volume relativo. Il valore dell'espressione di ogni proteina (corrispondente ad una banda nell'elettroforesi monodimensionale) è stato analizzato dal punto di vista della correlazione con ogni valore che rappresenta un indice di qualità della carne quale: incremento ponderale, età al macello, quantità di massa magra e quantità di massa grassa. In figura 3 e 4 sono riportati i risultati delle analisi che hanno mostrato un indice di correlazione statisticamente significativo.

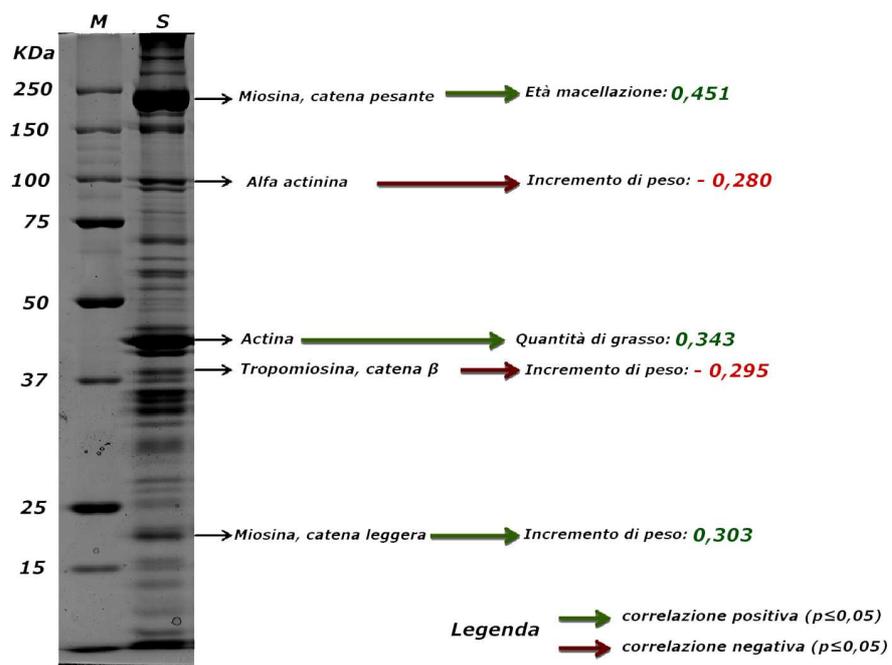


Figura 3. Indici di Correlazione fra proteine e dati produttivi.

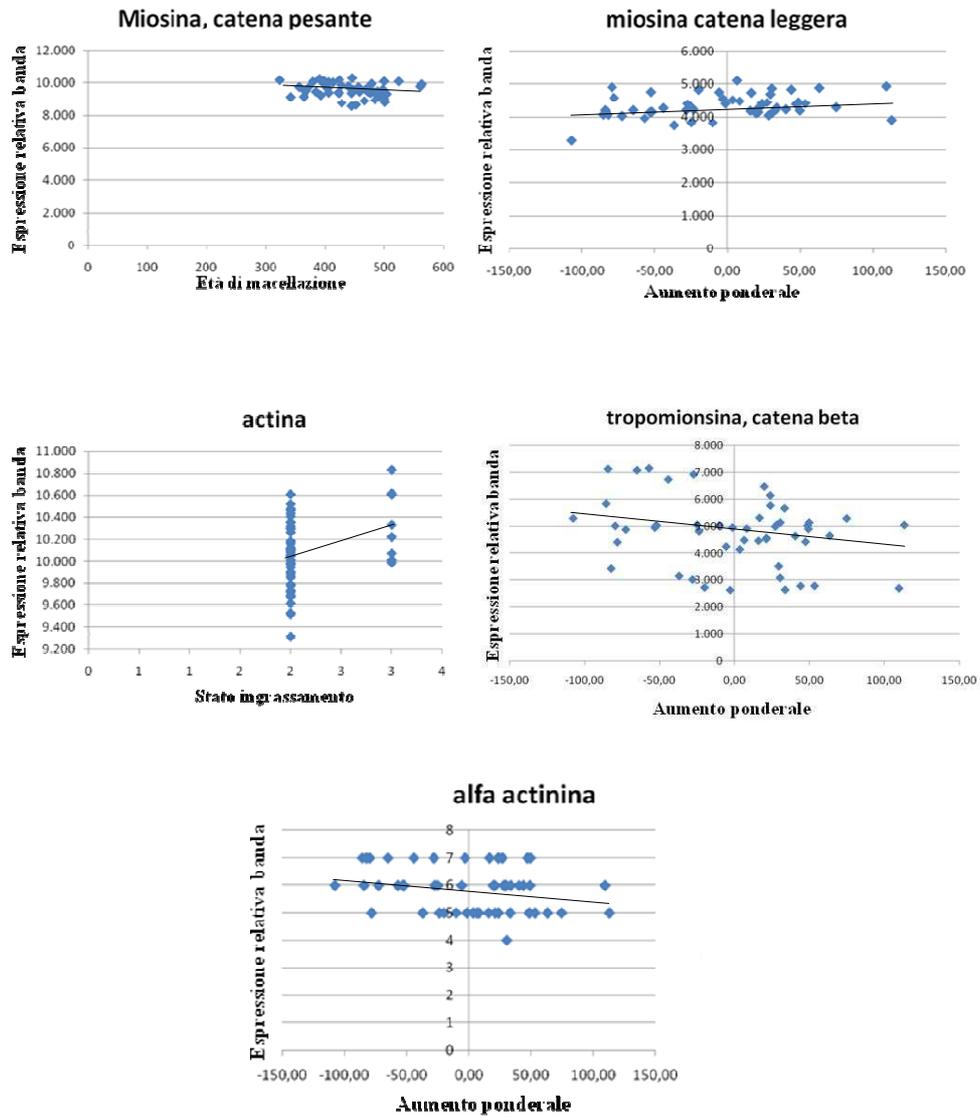


Figura 4. Proteine che hanno mostrato un indice di correlazione statisticamente significativo $p < 0,05$.

Dei 172 profili monodimensionali ottenuti, dopo analisi statistica, è stato possibile identificare 36 campioni rappresentativi assimilabili a 4 differenti gruppi con differenti caratteristiche nella qualità della carne.

Questi campioni sono stati riprocessati mediante elettroforesi monodimensionale e le immagini ottenute (figura 8) sono state montate in un'unica immagine e analizzate mediante il software Quantity One 4.6.3 (BIORAD).

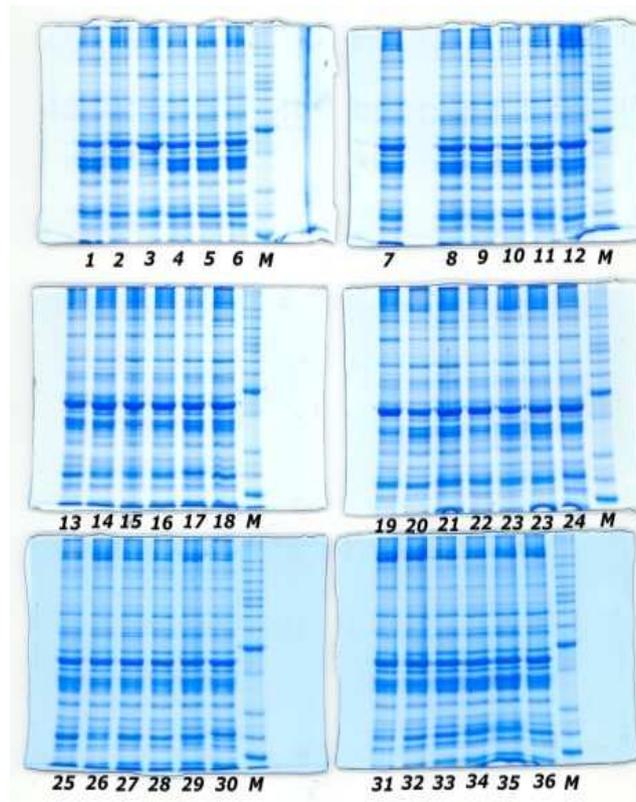


Figura 5: Profilo elettroforetico monodimensionale degli estratti proteici di muscolo sternocleidomastoideo

Le bande identificate mediante l'analisi di immagine dei gel monodimensionali sono state analizzate in base al valore di volume relativo calcolato dal software Quantity One 4.6.3 (BIORAD). Il calcolo del volume relativo viene effettuato prendendo in considerazione l'area della banda e l'intensità di densità associata alla banda, ciò è reso possibile dal sistema di acquisizione delle immagini Pharos FX (BIORAD) che permette un'analisi densitometrica delle bande stesse. Ogni banda viene quindi spazialmente rappresentata come un cono avente come base l'area della banda e come altezza l'intensità di colorazione della banda. In figura 6 e 7 sono riportate due schermate del software in cui si possono osservare l'identificazione delle bande e la quantificazione delle bande stesse mediante i profili di densitometria.

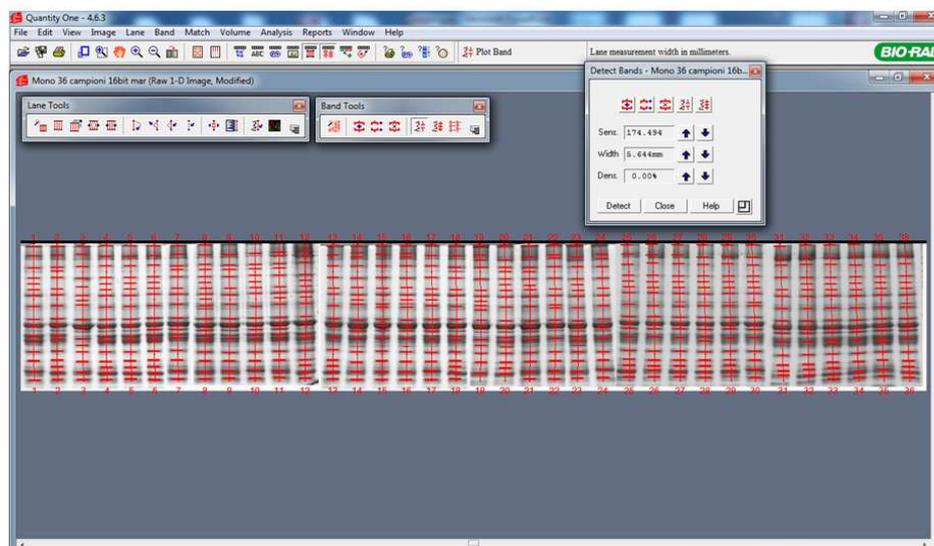


Figura 6: Schermata del modulo di riconoscimento delle bande del software di analisi Quantity One 4.6.3 (BIORAD)

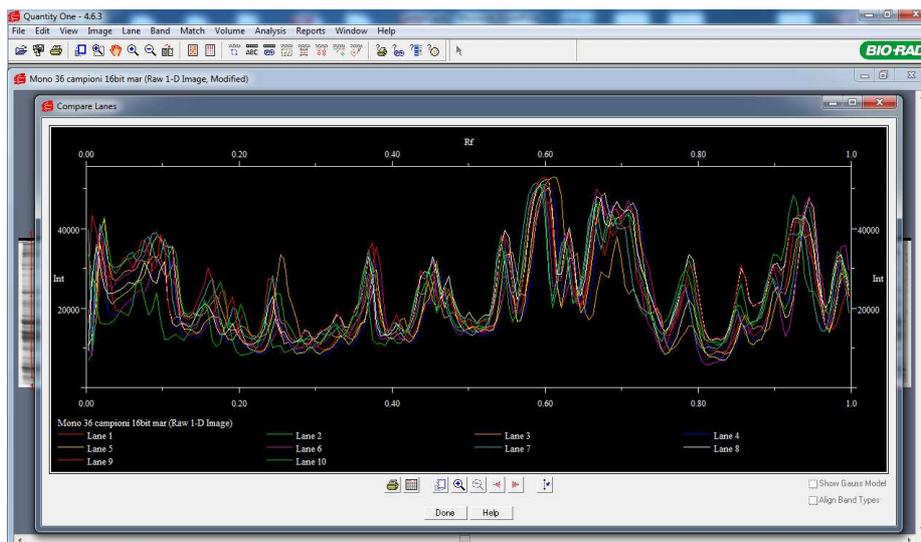


Figura 7: Schermata del modulo di analisi “quantitativa” del software di analisi Quantity One 4.6.3 (BIORAD)

Per valutare il grado di similarità dei campioni è stato utilizzato il modulo di clustering “Phylogenetic Tree”, la metodica selezionata per il clustering è stata il Neighbor Joining (NJ) (Saitou et al., 1987). Questo metodo produce alberi non radicati, seguendo la proprietà additiva (un albero è detto additivo se le distanze fra i taxa sono uguali alla somma delle lunghezze dei rami che li connettono). L'idea base di questo algoritmo è quella di confrontare tra loro coppie di dati e di costruire dei clusters che però non siano contenuti l'uno nell'altro, ma che anzi siano "separati" dal resto. Per far ciò i clusters costruiti da NJ sono formati dai cosiddetti vicini (neighbors) che sono definiti come due dati che sono in relazione tra loro più che con tutti gli altri

e che per questo sono connessi attraverso un solo nodo all'albero. Due campioni si dicono quindi “vicini” (neighbors) se sono connessi attraverso un solo nodo interno.

In figura 8 è riportato l’output del clustering che mostra come la distanza fra i 36 campioni.

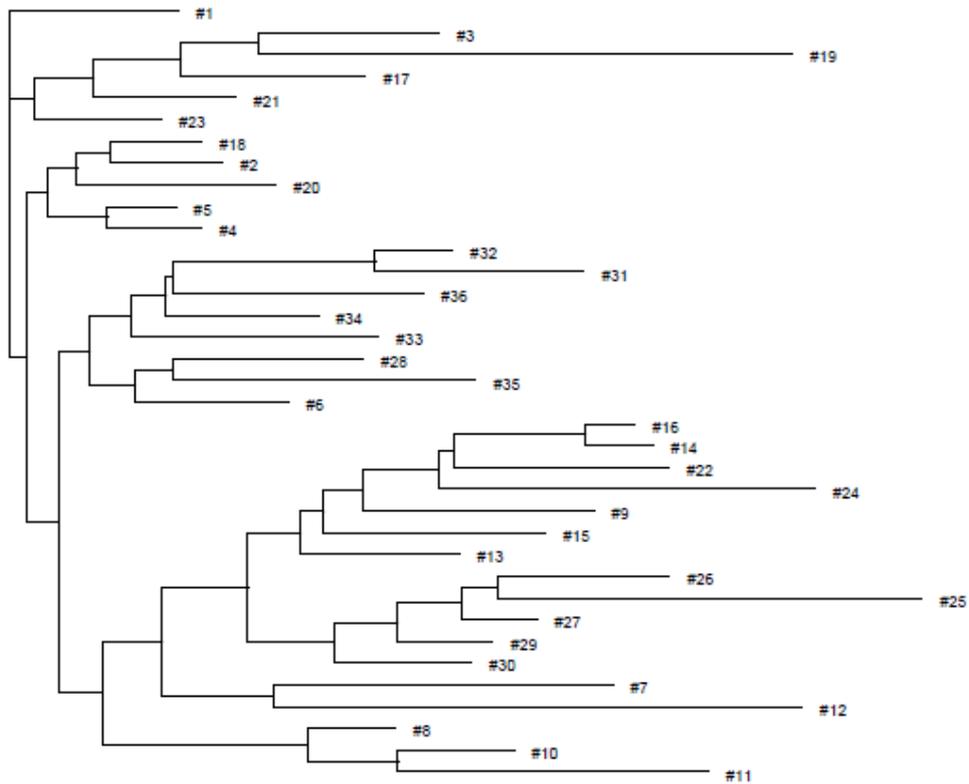


Figura 8: Cluster dei 36 campioni

Dai risultati della separazione in cluster possiamo vedere come vi siano campioni che presentano similarità maggiori mentre altri appaiano evidentemente distanti. Il campione 1 è stato scelto arbitrariamente come campione master per questo appare isolato e non aggregato ad altri. Dalla separazione in cluster possiamo notare una divisione dei campioni analizzati, che ricordiamo sono rappresentativi dei 172 soggetti iniziali, in 4 grosse “famiglie” al loro interno ulteriormente separate in gruppi.

Gli estratti proteici di muscolo sono stati poi separati mediante 2DE (fig. 3). Inizialmente sono stati scelti 6 campioni ciascuno rappresentativo di un gruppo come mostrato nel clustering, successivamente sono stati analizzati tutti e 36 i soggetti. Le mappe bidimensionali ottenute da questi campioni sono state analizzate mediante il software Progenesis SameSpot. In questo caso per valutare la similarità tra i vari campioni e la bontà del clustering ottenuto con la prima analisi è stata utilizzata l'analisi delle componenti principali (PCA) integrata nel modulo stat di Progenesis. La valutazione è stata fatta seguendo due modalità:

- 1) utilizzando per la PCA i valori di espressione degli spot che risultavano statisticamente significativi all'ANOVA;
- 2) utilizzando valori di espressione degli spot che differivano tra i vari campioni di almeno 2 volte.

L'analisi delle componenti principali è stata eseguita utilizzando il dataset costituito dai volumi normalizzati di ciascuno spot proteico nei gel di elettroforesi bidimensionale.

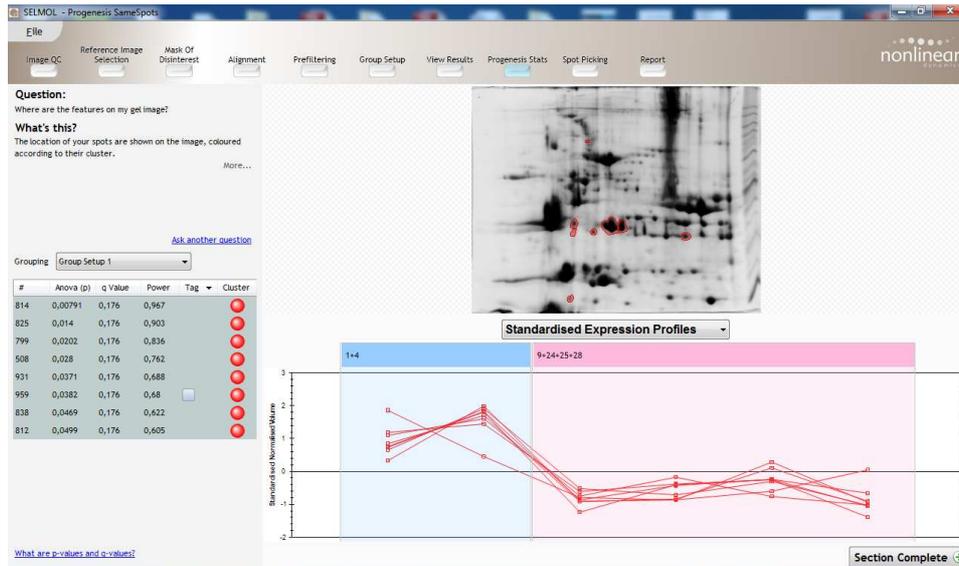


Figura 9. Risultati analisi di immagine

Sulla base delle 9 proteine differenzialmente espresse (figura 9) si è stati in grado di clusterizzare i campioni in 4 diversi gruppi di qualità della carne (figura 10). Il primo gruppo (cerchio rosso) è il gruppo con la migliore qualità di carne con il guadagno più alto peso e la quantità più bassa di grassi. Gli altri gruppi sono caratterizzati da una progressiva diminuzione della qualità in questo ordine: viola, giallo e blu. Il gruppo di campioni all'interno del cerchio blu è il gruppo con la qualità peggiore di carne con l'aumento di peso inferiore e la più alta quantità di grassi.

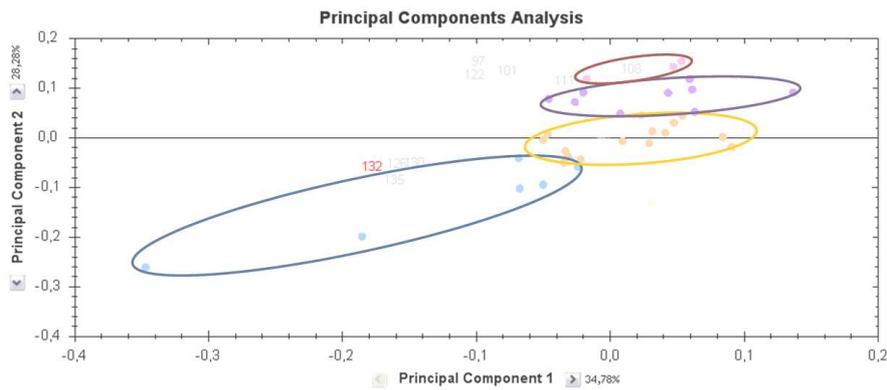


Figura 10. Clusterizzazione dei campioni dopo elettroforesi bidimensionale

Dall'analisi di immagine effettuata confrontando i gel bidimensionali ottenuti da soggetti caratterizzati da normali incrementi ponderali con quelli ottenuti da soggetti caratterizzati da bassi incrementi ponderali è stata osservata l'aumentata espressione della proteina α -B cristallina (Figura 11). Tale proteina è stata identificata mediante spettrometria di massa.

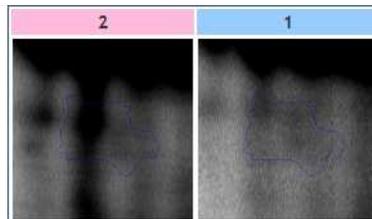
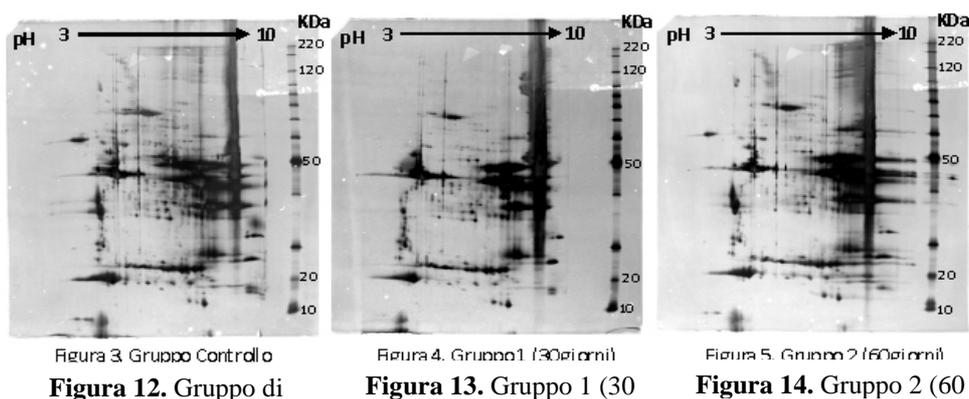


Figura 11. Differenza nell'espressione dell' α -B cristallina.
 Legenda: 2 soggetti caratterizzati da bassi incrementi ponderali;
 1 soggetti caratterizzati da buoni incrementi ponderali.

4.2 Prova somministrazione integratore alimentare

Per quanto riguarda la prova effettuata per valutare l'effetto della somministrazione a differenti tempi dell'integratore alimentare contenente vitamina C, selenio e vitamina E si sono trovate delle differenze nell'espressione proteica mentre non si sono osservate differenze statisticamente significative nell'espressione proteica in relazione allo stato di benessere degli animali sia all'interno dei gruppi con la medesima somministrazione di integratore, sia fra i gruppi con somministrazione differente.

In figura 12, 13 e 14 sono riportate le mappe di riferimento per i gruppi controllo (Figura 11), gruppo 1, somministrazione 30 gg. (Figura 12) e gruppo 2, somministrazione 60 gg. (Figura 13).



Dall'analisi di immagine effettuata, appaiono alcune differenze nell'espressione proteica imputabili alla dieta somministrata. In figura 15

vengono mostrati gli spot che presentano una differenza nell'espressione proteica nel confronto fra le diete somministrate.

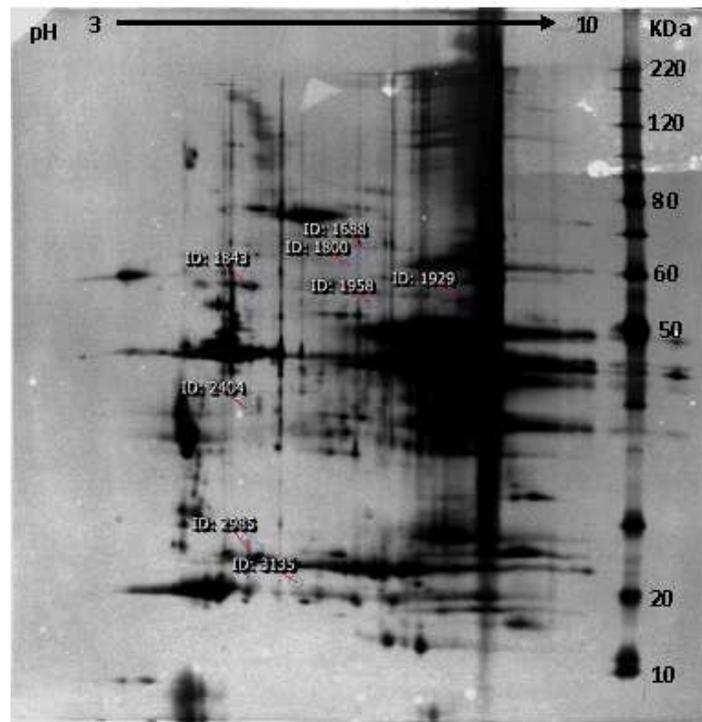


Figura 15. Spot che presentano modificazione nell'espressione proteica.

Il numero che appare a fianco di ogni spot è un numero automatico che il software attribuisce ad ogni spot riconosciuto nella mappa bidimensionale. In dettaglio, in figura 16 e 17, sono riportati gli spot che presentano una differenza di espressione statisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

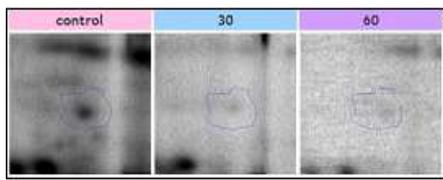


Figura 16. Spot 1800

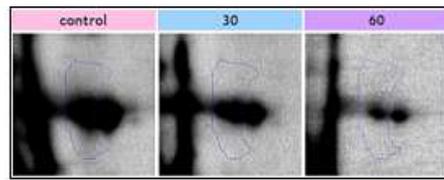


Figura 17. Spot 1843

I due spot rivelatisi statisticamente significativi dall'analisi d'immagine sono stati processati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF per l'identificazione delle proteine. Per quel che riguarda la tecnologia MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), l'identificazione avviene in seguito a proteolisi "in situ" degli spot excisi. Il digerito triptico viene successivamente depositato, fissato su matrice solida e analizzato. Il "peptide map" ottenuto dall'analisi dei digeriti triptici viene automaticamente confrontato con le mappe peptidiche predette dalle sequenze geniche e, se la sequenza genica è nota, la proteina viene identificata. Tali analisi hanno identificato lo spot 1800 come *fosfoglucomutasi 5 (PGM5)* e lo spot 1843 come *Desmina*.

4.3 Mappa master

Mediante l'utilizzo di software di analisi d'immagine dedicati quali il PDQuest (BIORAD) e l'Image Master 2D Platinum (Ge Healthcare) è stata

messa a punto una mappa master che è stata costruita tramite appositi algoritmi in grado di riassumere le informazioni di tutte le immagini dei gel effettuati (e quindi di tutte le analisi) in un'unica immagine riassuntiva contenente tutti gli spot proteici ottenuti nell'analisi di tutti i campioni di muscolo. Questa mappa master sintetica è in continuo aggiornamento infatti, più si amplia il campione analizzato, più si ottiene una mappa dettagliata di tutte le proteine espresse dal tessuto muscolare bovino. In figura 18 è riportata la mappa master in cui sono state annotate alcune proteine che sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

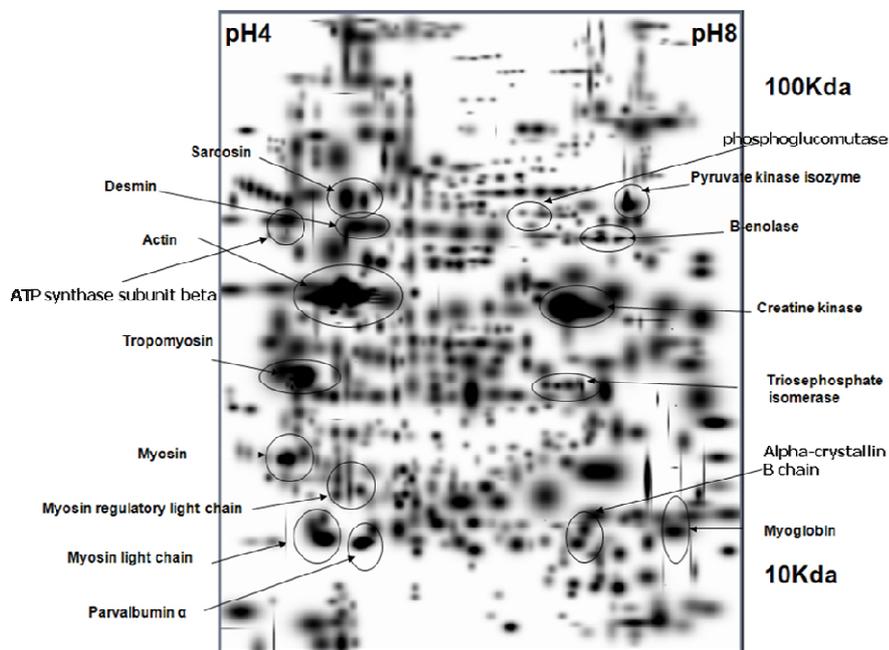


Figura 18: Mappa master di muscolo bovino

Il vantaggio di avere una mappa master sintetica sta nell'avere una mappa standard da utilizzare nelle successive analisi e con cui confrontare i gel ottenuti e identificare gli spot proteici.

5. CONCLUSIONI

I profili di espressione proteica ottenuti dalle analisi 1D e 2D contengono solitamente informazioni complesse che sono parzialmente nascoste se vengono utilizzati esclusivamente metodi statistici di tipo classico, e spesso i test statistici utilizzati per la selezione di marker non sono adeguati nel caso di molte variabili in gioco. L'utilizzo, come in questo caso, di metodi statistici multivariati permette di valutare in poco tempo un elevato numero di variabili (le proteine) e mettere in risalto eventuali differenze tra i vari campioni. La separazione dei campioni mediante analisi delle componenti principali (PCA) è risultata comparabile con quella ottenuta mediante clustering associata ad analisi monodimensionale. Il vantaggio dell'analisi bidimensionale associata alla PCA è quello di avere come output una lista di proteine che descrivono le differenze fra i gruppi. Tali proteine possono quindi essere utilizzate come potenziali marcatori utilizzabili nel differenziare univocamente i campioni di muscolo bovino e classificarli.

L'utilizzazione del clustering associato all'elettroforesi monodimensionale permette di separare e differenziare molti campioni (e quindi analizzare molti soggetti) in poco tempo essendo la 1-DE una tecnica veloce e robusta. La combinazione delle due tecniche permette di effettuare uno screening dei campioni con una tecnica veloce e poco costosa, rappresentata dalla monodimensionale a cui abbinare poi, su campioni scelti l'analisi proteomica al fine di individuare dei marcatori molecolari. Dai dati ottenuti da 1-DE e 2-DE la separazione dei vari campioni ottenuta mediante la PCA

è comparabile a quella ottenuta in prima analisi con il clustering, con il vantaggio, per la PCA, di poter avere una lista di spot e quindi di potenziali marcatori utilizzabili per differenziare univocamente i campioni di muscolo bovino e classificarli.

In questo studio sono stati comparati i profili proteomici di tessuto muscolare bovino per ottenere nuovi dati riguardanti biomarcatori proteici della qualità della carne. Mediante analisi monodimensionale sono state identificate delle correlazioni fra i livelli di espressione proteica di proteine deputate alla contrazione muscolare e parametri produttivi di qualità della carne. Tra le correlazioni ottenute mediante analisi monodimensionale le più importanti sono rappresentate dall'alfa actinina e dalle catene pesanti e leggere della miosina.

L'alfa actinina è una proteina strutturale del muscolo, svolge la sua funzione legando l'actinina alla linea z. Questa proteina è inversamente correlata all'aumento ponderale. Tale dato, seppur presentando una correlazione di modesta entità, appare di grande interesse in relazione alla possibile relazione fra presenza di alfa-actinina e tenerezza della carne. Una minor presenza di tale proteina nei soggetti che presentano migliori incrementi ponderali potrebbe indicare una propensione ad una maggior tenerezza della carne derivante da queste carcasse. In uno studio eseguito sui ratti è stato dimostrato che questa proteina è maggiormente espressa negli animali vecchi rispetto a quelli giovani (Brule et al.,2010).

La miosina è la maggior costituente delle fibre muscolari. E' formata dall'associazione di sei diversi polipeptidi: un paio a catena pesante, e due

paia a catena leggera. Presenta una coda formata da catene pesanti, strutturate ad elica e attorcigliate l'una con l'altra a formare una super elica, e una testa a cui sono associate catene leggere. I filamenti spessi sono il risultato di monomeri proteici di miosina. L'analisi monodimensionale mostra due correlazioni positive che coinvolgono differenti subunità della miosina. Le catene pesanti sono correlate all'età di macello mentre le catene leggere sono correlate con l'aumento ponderale. Tali correlazioni sono di estrema importanza in quanto in accordo con dati presenti in bibliografia che mostrano come l'espressione della miosina sia positivamente correlata alla tenerezza della carne ($r = +0.24$) e alla sua succosità ($r = +0.20$) (Oury et al., 2009).

Per quanto riguarda la valutazione dell'effetto dell'aggiunta di antiossidanti nella dieta di finissaggio, i risultati ottenuti mostrano l'influenza di tale somministrazione sull'espressione proteica. In particolare, le proteine che hanno presentato le maggiori differenze nell'espressione sono la fosfoglucomutasi e la desmina. La fosfoglucomutasi è un enzima appartenente alla classe delle isomerasi che catalizza la reazione di trasformazione del glucosio 1-fosfato a glucosio 6-fosfato. Questo enzima è di notevole importanza in quanto converte il glucosio 1-fosfato derivante dalle mobilitazione del glicogeno a glucosio 6-fosfato che è un intermedio glicosidico e che quindi può entrare direttamente nella glicolisi. Questa proteina si ritrova maggiormente espressa nei soggetti non trattati con l'integratore alimentare contenente vitamina C, selenio e vitamina E; mentre il livello di espressione è pressoché identico nei due gruppi con differenze

nel tempo di somministrazione. Ciò potrebbe essere dovuto ad eventi di stress occorsi nella fase pre-macello (del carico degli animali e di trasporto al macello) o nel processo di macellazione che hanno causato una degradazione delle riserve di glicogeno muscolare. Il trattamento con l'integratore alimentare potrebbe fornire una sorta di protezione verso quegli eventi stressanti che possono occorrere durante l'allevamento o in fase di macellazione e preservare quindi le riserve di glicogeno garantendo l'acidificazione della carne e l'abbassamento del pH a valori corretti durante i processi che portano alla trasformazione del muscolo in carne.

La desmina è una proteina che appartiene alla classe III dei filamenti intermedi, costituisce parte del citoscheletro ed è il filamento intermedio caratteristico di tutti i tre tipi di cellule muscolari (scheletriche, cardiache e della muscolatura liscia). Forma una rete citoscheletrica lungo la fibra muscolare attorno al plasma e alla membrana nucleare ed è particolarmente localizzata sulla regione sub-plasmalemmale e sulla banda Z. L'andamento dell'espressione di questa proteina è di tipo decrescente con una maggiore espressione nei soggetti non trattati con l'integratore alimentare contenente vitamina C, selenio e vitamina E, e una minore espressione in quei soggetti con somministrazione dell'integratore alimentare negli ultimi 60 giorni di allevamento. Una diminuzione del livello di desmina è spesso associato ad una migliore performance di qualità della carne associata ad un miglioramento del colore della carne e della sua tenerezza.

Nei bovini caratterizzati da bassi incrementi ponderali e che presentavano problemi nella crescita si è osservato un aumento dell'espressione dell' α -B

cristallina. Questa proteina è una Chaperonina che in condizioni di stress lega le proteine non ripiegate per prevenirne un non corretto folding. Un aumento dell'espressione di tale proteina è osservato in risposta a differenti stress a livello muscolare e cardiaco (Arrigo et al., 2007). L'importanza della regolazione dell'espressione dell' α -B cristallina è evidente in quanto in letteratura sono riportati differenti lavori che associano mutazioni a carico di tale proteina e differenti patologie a livello muscolare e non solo (Reilicha et al., 2010). Un'aumentata espressione dell' α -B cristallina nei soggetti con problemi nella crescita potrebbe indicare la presenza di fattori stressogeni nella fase di allevamento degli animali che pregiudicano un corretto sviluppo e crescita muscolare.

I dati ottenuti mostrano come la qualità della carne da macello può essere valutata analizzando l'espressione delle proteine muscolari identificate che hanno mostrato importanti correlazioni con i parametri analizzati quali l'incremento ponderale, la quantità di grasso e l'età dei bovini. Un'accurata analisi di tutti questi parametri ed in particolare l'analisi delle mappe bidimensionali ha permesso l'identificazione di alcune proteine utilizzabili come marcatori in grado di fornire indicazioni sulla qualità della carne esaminata. L'integrazione dei dati ottenuti mediante l'indagine proteomica e quelli ottenuti mediante l'indagine genomica potrebbe fornire informazioni più utili e complete per quanto riguarda la tracciabilità permettendo anche l'effettuazione di uno screening completo del prodotto e di avere in breve tempo tutta una serie di informazioni qualitative. Queste informazioni hanno un'estrema utilità per la filiera produttiva sia perché in questo modo è

possibile selezionare gli animali in modo da avere un prodotto migliore sia perché permettono l'identificazione di marcatori molecolari utilizzabili per lo screening delle carni.

6. BIBLIOGRAFIA

- Arrigo A.P., Simon S., Gibert B., Kretz-Remy C., Nivon M., Czekalla A., Guillet D., Moulin M., Diaz-Latoud C., Vicart P. Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets, *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3665–3674.
- Bini L., Magi B., Marzocchi B., Arcuri F., Tripodi S., Cintonino M., Sanchez J.C., Frutiger S., Hughes G., Pallini V., Hochstrasser D.F., Tosi P. Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*, 1997; 18(15): 2832-2841.
- Bouley J., Chambon C., Picard B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 2004; 4: 1811–1824.
- Bouley J., Meunier B., Chambon C., De Smet S., Hocquette J. H., Picard B. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*, 2005; 5: 450-490.
- Brocks L., Hulsege B., Merkus G. Histochemical characteristics in relation to meat quality properties in the Longissimus lumborum of fast and lean growing lines of large white pigs. *Meat Science*, 1998; 50(4): 411–420.
- Brule, C.; Dargelos, E.; Diallo, R.; Listrat, A.; Bechet, D.; Cottin, P.; Poussard, S., Proteomic study of calpain interacting proteins during skeletal muscle aging. *Biochimie*, 2010 Sep 17. [Epub ahead of print]

- Burrow H. M., Moore S. S., Johnston D. J., Barendse W., Bindon B. M. Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2001; 41: 893–919.
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Görg A., Westermeier R., Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1982; 6: 317-339.
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004; 25(9): 1327-1333.
- Carbonaro M. Proteomics: present and future in food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 2004; 15: 209-216.
- Chaze T., Meunier B., Chambon C., Jurie C., Picard B. In vivo proteome dynamics during early bovine myogenesis. *Proteomics*, 2008; 8: 4236–4248
- Choat W.T., Paterson J.A., Rainey B.M., King M.C., Smith G.C., Belk K.E., Lipsey R.J. The effects of cattle sex on carcass characteristics and longissimus muscle palatability. *J. Anim Sci.* 2006; 84: 1820-1826.
- De Stefanis G., Barge M. T. Aspetti qualitativi della produzione della qualità della carne bovina. *Atti del convegno nazionale “Parliamo di...produzione della carne bovina”*. Fossano, 8-9 novembre 1990 pp. 59-80.

- Doherty, M. K., McLean, L., Hayter, J. R., Pratt, J. M., Robertson, D. H., El Shafei, A. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics*, 2004; 4: 2082-2093.
- Doherty M.K., McLean L., Beynon R.J. Avian proteomics: advances, challenges and new technologies. *Cytogenet. Genome Res.*, 2007; 117: 358-369.
- Ervasti J.M., Strand M.A., Hanson T.P., Mickelson J.R., Louis C.F. (1991). Ryanodine receptor in different malignant hyperthermia-susceptible porcine muscles. *American Journal of Physiology*, 1991: 260(1 Pt 1): C58–C66.
- Federici C., Rama D. Il mercato della carne bovina. Rapporto 2007, ISMEA-Osservatorio Latte. 2008 Franco Angeli, Milano.
- Fiems L. O., Hoof J. V., Uytterhaegen L., Boucque C. V., Demeyer D. (1995). Comparative quality of meat from doublemuscled and normal beef cattle. In A. Ouali, D. Demeyer, F. Smulders (Eds.), *Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality*. 1995 Eceeamst, Utrecht, pp. 381–391.
- French P., O’Riordan E.G., Monahan F.J., Caffrey P.J., Vidal M., Mooney M.T., Troy D.J., Moloney A.P. Meat quality of steers finished on autumn grass, grass silage or concentrate-based diets. *Meat Science*, 2000; 56: 173-180.

- French P., O’Riordan E.G., Monahan F.J., Caffrey P.J., Mooney M.T., Troy D.J., Moloney A.P. The eating quality of meat of steers fed grass and /or concentrates. *Meat Science*, 2001; 57: 379-386.
- Gatellier P., Mercier Y., Juin H., Renerre M. Effects of finishing mode (pasture or mixed-diet) on lipid composition, colour stability and lipid oxidation in meat from Charolais cattle. *Meat Science*, 2005; 69: 175-186.
- Gidding J.C. Two-dimensional separation: concept and promise. *Anal. Chem.*, 1984; 56: 1258A– 1260A, 1262A, 1264A.
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol.*, 1999; (3): 1720-30.
- Goll D.E., Henderson D.W., Kline E.A. Postmortem changes in physical and chemical properties of bovine muscle. *Journal of Food Science*, 1964; 29(5): 590–596.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000; 21: 1037-1053.
- Görg A., Weiss W., Dunn M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004; 4: 3665–3685
- Gregory N. G. Welfare and hygiene during preslaughter handling. *Meat Science*, 1996; 43: S35-S46.
- Gregory N. G. Recent concerns about stunning and slaughter. *Meat Science*, 2005; 70: 481-491.

- Hamelin M., Sayd T., Chambon C., Bouix J., Bibé B., Milenkovic D., Leveziel H., Georges M., Clop A., Marinova P., Laville E. Proteomic analysis of ovine muscle hypertrophy. *J. Anim. Sci.*, 2006; 84: 3266–3276.
- Hedegaard J., Horn P., Lametsch R., Møller H.S., Roepstorf P., Bendixen C., Bendixen E. UDP-Glucose pyrophosphorylase is upregulated in carriers of the porcine RN- mutation in the AMP-activated protein kinase. *Proteomics*, 2004; 4: 2448–2454.
- Herbert B. Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999; 20: 600-663.
- Hogan J.P., Petherick J.C., Phillips C.J. The physiological and metabolic impacts on sheep and cattle of feed and water deprivation before and during transport. *Nutr Res Rev.* 2007; 20(1): 17-28.
- Iacurto M., Failla S., Mormile M., Vincenti F., Gigli S. (2005). Confronto tra tecniche di allevamento di vitelloni Chianini alimentati secondo le norme I.G.P.: Performance produttive. 4th World Italian Beef Cattle Congress, April 29 th - May 1 st 2005; pp. 531-536.
- Jia X., Hollung K., Therkildsen M., Hildrum K.I., Bendixen E. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics*, 2006; 6(3): 936-944.
- Jin L.T., Hwang S.Y., Yoo G.S., Choi J.K. Sensitive silver staining of protein in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using an azo dye,

- calconcarboxylic acid, as a silver-ion sensitizar. *Electrophoresis*, 2004; 25: 2494-2500.
- Keane M.G., Allen P. Effects of production system intensity on performance, carcass, composition and meat quality of beef cattle. *Livestock Production Science*, 1998; 56: 203-204.
 - Keane M.G. Effects of production factors on beef carcass and meat quality. *Atti del 39° Simposio Internazionale di Zootecnia "Meat Science & Research"*, Rome 10 June 2004, pp. 7 -21.
 - Kim N. K., Lim J. H., Song M. J., Kim O. H., Park B. Y., Kim M. J., Hwang I. H., Lee C. S. Developmental proteomic profiling of porcine skeletal muscle during postnatal development. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2007; 20: 1612–1617.
 - Knowles TG. A review of the road transport of cattle. *Vet Rec.* 1999; 144(8):1 97-201.
 - Koochmaraie M. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle mu-calpain. *J Anim Sci.*, 1992;70(10): 3071-80.
 - Koochmaraie M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science*, 1996; 43: 193–201.
 - Lacourt A., Tarrant P. V. Glycogen depletion patterns in myofibres of cattle during stress. *Meat Science*, 1985; 15: 85-93.
 - Lametsch R., Bendixen E. Proteome analysis applied to meat science: characterizing post mortem changes in porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49: 4531-4537.

- Lametsch R., Roepstor V.P., Bendixen E. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 5508–5512.
- Lametsch R., Roepstorff P., Møller H.S., Bendixen E. Identification of myofibrillar substrates for I-calpain. *Meat Science*, 2004; 68(4): 515–521.
- Lammens V., Van de Water G., Coenegrachts J., Driessen B., Peeters E., Geers R. Head current during and blood splashes after electrical stunning in relation to characteristics of the pig's body. *Meat Science*, 2006; 72: 140-145.
- Le Roy P., Elsen J.M., Caritez J.C., Talmant A., Juin H., Sellier P., Monin G. Comparison between the three porcine RN genotypes for growth, carcass composition and meat quality traits. *Genet. Sel. Evol.*, 2000; 32(2): 165–186.
- Maltin C.A., Sinclair K.D., Warris P.D., Grant C.M., Porter A.D., Delday M.I., Warkup C.C. The effects of age at slaughter, genotype, and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. *Animal Science*, 1998; 66: 341-348.
- Maltin C., Balcerzak D., Tilley R., Delday M. Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003; 62(2): 337–347.
- Mandell I. B., Buchanan-Smith J G., Campbell C. P. Effects of forage vs grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition and

- beef quality in Limousine-cross steers when time and feed is controlled. *Journal of Animal Science*, 1998; 76: 2619-2630.
- Marchello J. A., Ray D. E., Hale W. H. Carcass characteristics of beef cattle as influenced by season, sex, and hormonal growth stimulants. *J. Anim. Sci.* 1970; 31: 690–696.
 - Marshall D.M. Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 1994; 72: 2745-2755.
 - Maria G.A., Villarroel M., Sañudo C., Olleta J.L., Gebresenbet G. Effect of transport time and ageing on aspects of beef quality. *Meat Science*, 2003; 65: 1335-1340.
 - Marcus K., Joppich C., May C., Pfeiffer K., Sitek B., Meyer H., Stuehler K. High-resolution 2DE. *Methods Mol Biol.*, 2009; 519: 221-40.
 - McVeigh M.J.M., Tarrant P.V. Behavioural stress and skeletal muscle glycogen metabolism in young bulls. *Journal of Animal Science*, 1982; 54: 790-800.
 - Monin G., Lambooy E., Klont R. Influence of temperature variation on the metabolism of pig muscle in situ and after exercise. *Meat Science*, 1995; 40(2): 149–158.
 - Monson F., Sañudo C., Sierra I. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. *Meat Science*, 2004; 68: 595-602.
 - Morbidini L., Lasagna E., Rossetti E., Vincenti F., Sbarra F., Cozza F., Sarti D. M. (2005). Effetto della differente fonte proteica e della linea genetica sulla qualità, chimica, fisica e sensoriale della carne di vitelloni

- di razza Chianina. 4th World Italian Beef Cattle Congress, April 29 th - May 1 st 2005; pp. 501-506.
- Nowak R. Bacterial genome sequence bagged. *Science*, 1995; 269: 468-470.
 - O'Farrell P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.*, 1975; 250(10): 4007-21.
 - O'Sullivan A., Galvin K., Moloney A.P., Troy D.J., O'Sullivan K., Kerry J.P. Effects of pre-slaughter rations of forage and/or concentrates on the composition and quality of retail packaged beef. *Meat Science*, 2003; 63: 279-286.
 - Ouali A., Herrera-Mendez C. H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 2006; 74: 44-58.
 - Oury, M. P.; Picard, B.; Briand, M.; Blanquet, J. P.; Dumont, R., Interrelationships between meat quality traits, texture measurements and physicochemical characteristics of M. rectus abdominis from Charolais heifers. *Meat Sci.*, 2009; 83(2): 293-301.
 - Picard B., Lefaucheur L., Berri C., Duclos M. J. (2002). Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development*, 2002; 42(5): 415–431.
 - Poso A.R., Puolanne E. (2005). Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*, 2005; 70: 423-434.

- Purchas R.W., Busboom J.R. The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme Q10 and creatine in beef muscle and liver. *Meat Science*, 2005; 70: 589-596.
- Purrlslo P.P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science*, 2005; 70: 435-447.
- Rabilloud T. Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods Mol Biol.* 1999; 112: 9-19.
- Razminiwicz R. H., Kreuzer M., Scheeder M. R. L. Quality of retail beef from two grass-based production systems in comparison with conventional beef. *Meat Science*, 2006; 73: 351-361.
- Reilicha P., Schosera B., Schrammb N., Krausea S., Schessla J., Kressd W., Müller-Höckerc J., Waltera M.C., Lochmullera H. The p.G154S mutation of the alpha-B crystallin gene (CRYAB) causes late-onset distal myopathy. *Neuromuscul. Disord.*, 2010; 20(4): 255-259.
- Resconi V.C., Campo M.M., Font i Furnols M., Montossi F., Sañudo C. Sensory quality of beef from different finishing diets. *Meat Sci.*, 2010; 86(3): 865-869.
- Rothschild M. F. Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. *Genetic Research*, 2004; 83(1): 1-6.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987; 4:406-425.

- Schaefer A.L., Jones S.D. M., Stanley R.W. The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *Journal of Animal Science*, 1997; 75: 258-265.
- Shackelford S. D., Koohmaraie M., Wheeler T. L., Cundiff L. V., Dikeman M. E. Effect of biological type of cattle on the incidence of the dark firm, dry condition in the Longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 1994; 72: 337-343.
- Shortose W. R. e Harris P. V. Effect of animal age on the tenderness of selected beef muscles. *Journal of Food Science*, 1990; 55: 1-8.
- Sinclair K. D., Cuthbertson A., Rutter A., Franklin M. F. The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the organoleptic properties and texture of bull beef from suckled calves. *Animal Science*, 1998; 66: 329-340.
- Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmaraie M., Goll D.E. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science*, 1995; 73(5): 1351–1367.
- Taylor R. G., Koohmaraie M. Effects of postmortem storage on the ultrastructure of the endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus. *Journal of Animal Science*, 1998; 76(11): 2811–2817.
- Warner RD, Greenwood PL, Pethick DW, Ferguson DM. Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Sci.*, 2010; 86(1): 171-83.
- Wegner J., Albrecht E., Fiedler I., Teuscher F., Papstein H.J., Ender K. Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *J Anim Sci.* 2000; 78(6): 1485-1496.

- Westermeier R., Postel W., Weser J., Görg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1983; 8: 321-330.
- Westermeier R. *Electrophoresis in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis*. WILEY-VCH, Weinheim (2001)
- Wiener P., Woolliams J.A., Frank-Lawale A., Ryan M., Richardson R.I., Nute G.R., Wood J.D., Homer D., Williams J.L. The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. *Meat Science*, 2009; 83(1): 127-134.
- Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K.L., Hochstrasser D.F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 1996; 14(1): 61-65.
- Williams K., Hochstrasser D. Introduction to the proteome. In Wilkins M., Williams K., Appel R., Hochstrasser D. (Springer, Berlin Heideberg New York) "Proteome research: new frontiers in functional genomics", 1997 pp. 1-12.