

**Università degli Studi di Milano**  
**Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare**  
**Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche**

Curriculum di Genomica, Proteomica e Tecnologie correlate  
Ciclo XXIV  
Anno Accademico 2010/2011

**Dottorando: Renzo VANNA**  
Matricola: R08140

**CARATTERIZZAZIONE  
DELL'ORGANELLO DI NEUROMELANINA  
DELLA SUBSTANTIA NIGRA UMANA  
CON APPROCCIO PROTEOMICO**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Mario Clerici  
**Tutore:** Prof.ssa Cecilia GELFI  
**Correlatore:** Dott. Luigi ZECCA



## SOMMARIO

*La substantia nigra umana è l'area del cervello principalmente colpita dalla malattia di Parkinson. La caratteristica più evidente della substantia nigra è la presenza di neuromelanina (NM), un particolare pigmento melanico che si accumula nei neuroni all'interno di organelli circondati da membrana e ricchi di lipidi (dolicoli). La singolare presenza di elevate quantità di organelli di NM all'interno dell'area cerebrale più vulnerabile alla malattia di Parkinson è fonte di molto interesse. Ad oggi, non è stato chiarito in che modo la presenza di organelli di NM possa interferire con la vulnerabilità dei neuroni durante l'invecchiamento. D'altra parte, negli ultimi anni sta emergendo una forte correlazione tra invecchiamento e neurodegenerazione, e l'accumulo di materiale intracellulare difficilmente degradabile (proteine danneggiate, corpi di inclusione, lipofuscine, ecc.). L'accumulo di materiale intracellulare può infatti essere fonte di stress cellulare e fattore di rischio per la neurodegenerazione.*

*In questo lavoro di tesi sono stati preparati campioni di organelli di NM (integri e trattati con shock termico per la rimozione delle membrane) e di pigmento di NM, isolati da tessuto umano (substantia nigra) da soggetti sani post-mortem. I campioni sono stati analizzati in replicato per la definizione del profiling proteomico attraverso tecnologia proteomica MudPIT. Il profiling consiste in 1142 proteine totali delle quali 48 sono state definite con buona confidenza come rappresentative dei campioni. Alcune proteine sono state localizzate nelle diverse regioni dell'organello (pigmento, membrane e parte solubile) grazie al confronto tra i campioni.*

*Dall'analisi proteomica emerge il carattere lisosomiale dell'organello di NM: tra le 48 proteine rappresentative, più di 20 sono di origine lisosomiale. Vengono identificate anche proteine coinvolte nel folding proteico ( $\alpha$ -crystallin), nella degradazione di proteine (ubiquitin), nell'omeostasi del ferro (ferritin L), nei meccanismi antiossidanti e nella formazione di aggregati intracellulari. Sono state osservate anche proteine di accumulo (mitochondrial subunit c, saposin) tipiche di malattie lisosomiali. Dalle analisi non risulta però né la presenza di enzimi per la sintesi di lipidi né la presenza di proteine potenzialmente coinvolte nella biosintesi di composti melanici.*

*L'organello di NM possiede quindi le caratteristiche di un organello di origine lisosomiale/autofagica caratterizzato anche dall'accumulo di materiale indegradabile e da una probabile perdita di efficienza degradativa. I dati ottenuti sono in accordo con recenti ipotesi secondo le quali l'organello si formerebbe attraverso il sequestro di NM e di altre molecole potenzialmente tossiche per il neurone (proteine e lipidi danneggiati, metalli). Dai dati di proteomica sembra che questo meccanismo protettivo, con il passare del tempo, porti all'accumulo di materiale difficilmente degradabili e questo implicherebbe una probabile diminuzione della capacità degradativa della cellula.*

*L'organello di NM potrebbe quindi avere un ruolo protettivo ma allo stesso tempo potrebbe aumentare la vulnerabilità del neurone durante l'invecchiamento.*

## ABSTRACT

*Substantia nigra is the most affected brain region in Parkinson's disease. Substantia nigra is characterized by strong pigmentation derived by the presence of neuromelanin (NM), a particular melanic pigment that accumulates during aging in neurons in typical membrane-bounded organelles with high levels of lipids (dolichols). The occurrence of an elevated number of NM organelles in the most vulnerable brain region during Parkinson's disease is of special interest. It is not clear if NM organelles may interfere with the vulnerability of neurons during aging. Nevertheless, many evidences support the correlation between aging and neurodegeneration, and the accumulation of intracellular indigestible materials (damaged proteins, inclusion bodies and lipofuscins). The accumulation of indigestible materials inside the cell may increase cellular stress and neurodegeneration.*

*In this study, samples of NM organelles (whole and without membranes) and NM pigment were isolated from human post-mortem tissue (substantia nigra) of healthy subjects. Samples were analysed in duplicate to obtaining the proteomic profile of the NM organelle using MudPIT proteomic technology. A total of 1142 proteins were identified, of which 48 were observed with high confidence as representative of samples. Comparing results from different samples, some proteins were assigned to different regions of the NM organelle (NM pigment, membrane, soluble portion).*

*From the proteomic profile emerges the lysosomal nature of the NM organelle: among the 48 representative proteins, more than 20 are lysosomal proteins. In addition, other groups of proteins were identified: proteins involved in protein folding (alpha-crystallin) and degradation (ubiquitin), proteins important to iron homeostasis (ferritin L), antioxidant proteins and proteins involved in intracellular aggregates formation. Furthermore, typical biomarkers of lysosomal storage disease are observed (mitochondrial subunit c, saposins). On the other hand, any enzyme potentially involved in the melanogenic process and any lipids biosynthetic enzyme were identified.*

*This study demonstrates that the NM organelle has the features of both a lysosomal/autophagic organelle and an aged and damaged lysosome accumulating indigestible material. These data are in agreement with recent hypothesis suggesting that the NM organelle formation originate by sequestration of NM and other potentially toxic molecules as damaged proteins, damaged lipids and metals. Our data suggest that this protective mechanism, during aging, may induce accumulation of indigestible material inside the NM organelles and, as consequence, a decreased degradative function of the cell.*

*In summary, we suggest that NM organelle could confer protection to neurons and, at the same time, could increase cellular vulnerability in aging conditions.*

# INDICE

<b>SOMMARIO</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DELLE ABBREVIAZIONI</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 INVECCHIAMENTO: CARATTERISTICHE E MECCANISMI COINVOLTI</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1 Caratteristiche dell'invecchiamento</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.2 Accumulo di proteine e meccanismi degradativi</b> .....	<b>2</b>
1.1.2.1 Sistema ubiquitina/proteasoma e invecchiamento .....	2
1.1.2.2 Lisosomi e invecchiamento.....	2
1.1.2.3 Autofagia e invecchiamento.....	3
<b>1.2 LA MALATTIA DI PARKINSON</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.1 Cenni storici</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.2 Sintomatologia</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.3 Neurochimica e neuropatologia del PD</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.4 Eziologia del PD</b> .....	<b>9</b>
1.2.4.1 Cause genetiche per comprendere la patogenesi del PD.....	9
1.2.4.2 Fattori ambientali.....	13
<b>1.2.5 Ipotesi recenti sulla patogenesi del PD</b> .....	<b>15</b>
1.2.5.1 Stress ossidativo .....	17
1.2.5.2 Difunzione mitocondriale.....	17
1.2.5.3 Omeostasi delle proteine: proteasoma, lisosomi e autofagia.....	17
1.2.5.4 Infiammazione e microglia .....	18
<b>1.3 MELANINE</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3.1 Principali studi sulle melanine</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3.2 Principali funzioni delle melanine</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.3 La biogenesi dei melanosomi</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.4 Proteine del melanosoma</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4 NEUROMELANINA</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4.1 Brevi cenni storici delle prime caratterizzazioni della neuromelanina</b> <b>24</b>	
<b>1.4.2 Composizione, struttura e caratteristiche della NM</b> .....	<b>25</b>
1.4.2.1 Caratteristiche melaniche della NM .....	25
1.4.2.2 Struttura tridimensionale .....	25
1.4.2.3 Componente alifatica .....	26
1.4.2.4 Dolicoli.....	27
1.4.2.5 Componente peptidica .....	27
1.4.2.6 Interazione della NM con il ferro e altri metalli.....	27
1.4.2.7 Interazione della NM con i composti organici .....	30
<b>1.4.3 L' organello di NM</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4.4 Accumulo di NM nelle diverse aree del cervello e durante</b> <b>l'invecchiamento</b> .....	<b>31</b>
<b>1.4.5 Ipotesi sulla biosintesi della NM e dell'organello di NM</b> .....	<b>32</b>
1.4.5.1 Formazione del pigmento di NM.....	32
1.4.5.2 Formazione dell'organello di NM .....	34
<b>1.4.6 Ruolo della NM: Neurodegenerazione, tossicità, protezione</b> .....	<b>35</b>
1.4.6.1 Correlazione tra pigmentazione e vulnerabilità neuronale .....	35
1.4.6.2 Possibile ruolo protettivo della NM .....	36
1.4.6.3 Possibile tossicità della NM .....	36

<b>1.5</b>	<b>TECNOLOGIE PER L'ANALISI PROTEOMICA ATTRAVERSO SPETTROMETRIA DI MASSA</b>	<b>39</b>
1.5.1	Metodi di separazione .....	40
1.5.1.1	Separazione in HPLC .....	40
1.5.1.2	Separazione multidimensionale .....	40
1.5.2	Analisi della massa .....	41
1.5.3	Ionizzazione .....	42
1.5.3.1	MALDI .....	42
1.5.3.2	ESI.....	42
<b>2</b>	<b>SCOPO.....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>45</b>
3.1	PRELIEVO E DISSEZIONE DEI TESSUTI CEREBRALI UMANI .....	45
3.2	PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ANALIZZATI.....	45
3.2.1	Isolamento della NM da substantia nigra umana.....	45
3.2.2	Esperimento per la verifica delle possibili proteine aspecifiche legate alla NM	46
3.2.3	Isolamento degli organelli di NM da substantia nigra umana .....	46
3.2.4	Rimozione delle membrane lipidiche dal campione di organelli di NM	47
3.3	ANALISI DELLE PROTEINE CON TECNOLOGIA MUDPIT .....	47
3.3.1	Solubilizzazione e digestione triptica .....	47
3.3.2	Analisi proteomica MudPIT.....	48
3.3.3	Identificazione delle proteine .....	48
3.4	MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM) DEL TESSUTO CEREBRALE UMANO.....	49
<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>51</b>
4.1	PROTEINE LEGATE AL PIGMENTO DI NEUROMELANINA .....	53
4.1.1	Studio preliminare: proteomica della neuromelanina isolata da tessuto (NM-0).....	53
4.1.2	Proteomica della neuromelanina isolata da tessuto con proteinasi (NM-1 e NM- 2).....	55
4.1.2.1	Campione NM-1 .....	55
4.1.2.2	Campione NM-2 .....	55
4.1.2.3	Proteine comuni ai due campioni (NM-1,2) .....	56
4.1.2.4	Altre proteine di interesse osservate nel pigmento di neuromelanina isolato da tessuto (NM-1 e NM-2).....	58
4.1.2.5	Verifica delle possibili proteine aspecifiche legate al pigmento di neuromelanina isolato da tessuto (NM-3, NM3-TIS).....	58
4.2	PROTEINE DELL'ORGANELLO DI NEUROMELANINA ISOLATO DA SUBSTANTIA NIGRA UMANA .....	60
4.2.1	Proteomica dell'organello di neuromelanina isolato in toto (ORG-A1 e ORG-A2).60	
4.2.1.1	Campione ORG-A1 .....	60
4.2.1.2	Campione ORG-A2 .....	61
4.2.1.3	Proteine comuni ai due campioni di organelli isolati in toto (ORG-A1,2)....	62
4.2.1.4	Altre proteine di interesse osservate nei campioni di organelli isolati in toto (ORGA-1 e ORG-A2) .....	64
4.2.2	Proteomica dell'organello di neuromelanina dopo trattamento con shock termico per la rottura delle membrane (ORG-B1 e ORG-B2) .....	65
4.2.2.1	Campione ORG-B1 .....	65
4.2.2.2	Campione ORG-B2.....	66

4.2.2.3	Proteine comuni ai due campioni di dell'organello di neuromelanina dopo trattamento con shock termico (ORG-B1,2).....	67
4.2.2.4	Altre proteine di interesse osservate in ORG-B1 e ORG-B2.....	69
<b>4.3</b>	<b>RIEPILOGO DELLE PROTEINE SIGNIFICATIVE.....</b>	<b>71</b>
<b>4.4</b>	<b>ANALISI ULTRASTRUTTURALI DELL'ORGANELLO DI NM .....</b>	<b>74</b>
4.4.1	Morfologia dell'organello di NM .....	74
<b>4.5</b>	<b>DISCUSSIONE DEI DATI OTTENUTI E IMPLICAZIONI BIOLOGICHE.....</b>	<b>76</b>
4.5.1	Confronto tra i campioni analizzati .....	76
4.5.2	Caratteristiche lisosomiali dell'organello di NM .....	80
4.5.2.1	Proteine della membrana lisosomiale.....	80
4.5.2.2	Proteine della matrice lisosomiale .....	83
4.5.3	<b>L'accumulo e la funzione dei dolicoli alla luce dei dati di proteomica</b> <b>86</b>	
4.5.3.1	Nell'organello non sono presenti né enzimi di sintesi né enzimi di degradazione dei dolicoli.....	86
4.5.3.2	Relazione tra dolicoli e l'organello di NM.....	87
4.5.4	<b>Confronto proteomico con i melanosomi dei tessuti periferici.....</b>	<b>88</b>
4.5.4.1	Nell'organello non si osservano enzimi melanogenici .....	88
4.5.4.2	GPNMB: proteina melanosomiale dell'organello di NM.....	88
4.5.5	<b>Proteine coinvolte nella formazione e degradazione di aggregati proteici tipici delle malattie neurodegenerative .....</b>	<b>89</b>
4.5.5.1	Alfa-cristallin catena beta .....	89
4.5.5.2	Ubiquitina .....	90
4.5.5.3	TPPP (Tubulin polymerization-promoting protein).....	91
4.5.5.4	Alpha-synuclein.....	91
4.5.6	<b>Proteine contro lo stress ossidativo.....</b>	<b>92</b>
4.5.6.1	Glutathione Peroxidase 4.....	92
4.5.6.2	Apolipoprotein D.....	93
4.5.7	<b>Traffico cellulare e corpi lipidici.....</b>	<b>93</b>
4.5.8	<b>Altre proteine .....</b>	<b>94</b>
4.5.8.1	ATP synthase lipid-binding protein (mitochondrial subunit c), un marker di lipofuscinosi.....	94
4.5.8.2	Phosfolipase D3.....	95
4.5.8.3	Ferritine .....	95
<b>4.6</b>	<b>IPOTESI SULLA FORMAZIONE DELL'ORGANELLO DI NM SULLA BASE DEI DATI DI PROTEOMICA.....</b>	<b>97</b>
<b>4.7</b>	<b>RUOLO DELL'ORGANELLO DI NM NELL'INVECCHIAMENTO .....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>APPENDICE.....</b>	<b>117</b>





## Lista delle abbreviazioni

2D PAGE	(two-dimensional polyacrilamine gel electrophoresis ) elettroforesi bidimensionale in gel di poliacrilammide
4-AHP	(aminohydroxyphenil-alanin) aminoidrossifenil-alanina
5-S-CD	(5-S-cysteinyldopa) 5-S-cisteinildopa
6-OHDA	(6-hydroxy dopamine) 6-idrossi dopamina
AD	(Alzheimer disease) malattia di Alzheimer
ALS	(amyotrophic lateral sclerosis) sclerosi laterale amiotrofica
APOD	apolipoprotein D
CID	(collision induced defragmentation) frammentazione indotta da collisione
CMA	(chaperone-mediated autophagy) autofagia mediata da chaperoni
<sup>13</sup> C-NMR	(carbon-13 nuclear magnetic resonance) risonanza magnetica nucleare del carbonio 13
DA	dopamina
DHI	(5,6-dihydroxy-indole) 5,6-diidrossiindolo
DHICA	(5,6-dihydroxyindol2-2-carboxyl) 5,6-diidrossiindolo-2-carbossile
Dj-1	protein DJ-1
EPR	(electron paramagnetic resonance ) risonanza paramagnetica elettronica
ESI	(electrospray ionization) ionizzazione a elettrospray
GBA	(glucosylceramidase) glucosilceramidasi
GC/MS	(gas chromatography-mass spectrometry) gascromatografia-spettrometria di massa
GPnMB	transmembrane glycoprotein NMB
GPX4	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
H2O2	perossido di idrogeno
HD	(Huntington disease) malattia di Huntington
<sup>1</sup> H-NMR	(proton nuclear magnetic resonance) risonanza magnetica nucleare del protone
HPLC	(high-pressure liquid chromatography) cromatografica liquida ad alte prestazioni
HSC70	heat shock cognate 71 kDa protein
IR	infrarossi
kDa	kilo Dalton
LAMP-1	lysosome-associated membrane glycoprotein 1
LAMP2A	lysosome-associated membrane glycoprotein 2
LAMP3	CD63 antigen
LB	(Lewy bodies) corpi di Lewy
LC	locus coeruleus
LC/MS	(liquid chromatography-mass spectrometry ) cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa
L-DOPA	L-3,4-diidrossifenilalanina
LIMP2	lysosome membrane protein 2
LRRK2	leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 1
LTQ	(linear quadrupole trap) trappola a quadrupolo lineare
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MAP6	microtubule-associated protein 6 o stable tubulin only polipeptides (STOP)
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
MPPP	l'1-metil-4-fenil-4-propionossipiperidina
MPS	mucopolisaccaroidosi
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiperidina

MS	(mass spectrometry) spettrometria di massa
MudPIT	multi-dimensional protein identification technology
NCL	(neuronal ceroid lipofuscinosis) lipofuscinosi ceroide neuronale
NK- $\kappa\beta$	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NM	neuromelanina
NO	(nitric oxide) ossido nitrico
NOS	(nitric oxide synthase inducibile) ossido nitrico sintasi inducibile
NPC2	epididymal secretory protein E1 o niemann-Pick disease type C2 protein
PARK2	(parkin) parkina
PD	(Parkinson disease) malattia di Parkinson
PDCA	(2,3-dicarboxylic acid) acido-2,3-dicarbossilico
PINK1	Serine/threonine-protein kinase PINK1
PLBD-2	phospholipase B-like 2
PLD3	phospholipase D3
PSAP	proactivator polipeptide - Cleaved into: Saposin-A,B,C,D
PTCA	(pyrrole 2,3,5-tricarboxylic acid) acido pirrolo 2-3-5-tricarbossilico
ROS	(reactive oxygen species) specie reattive dell'ossigeno
RP	(reverse phase column) colonna a fase inversa
SCX	(strong cation exchange column) colonna a forte scambio cationico
SDS	sodio dodecil-solfato
SN	(substantia nigra) sostanza nera
SNCA	(alpha-synuclein) alfa sinucleina
SNpc	substantia nigra pars compacta
SNpr	substantia nigra pars reticulata
STOP	stable tubulin only polipeptides o microtubule-associated protein (MAP6)
TAU	microtubule-associated protein tau
TH	(tyrosine hydroxylase) tirosina idrossilasi
TNF- $\alpha$	(tumor necrosis factor- $\alpha$ ) fattore di necrosi tumorale $\alpha$
TOF	(time of flight) tempo di volo
TPPP	tubulin polymerization-promoting protein
TYRP1	(DHICA oxidase) DHICA ossidasi
TYRP2	(L-dopachrome tautomerase) dopacromo tautomerasi
UCHL1 o PARK5	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1
UPS	(ubiquitin-proteasome system) sistema ubiquitina-proteasoma
UV	ultravioletto
VMAT2	(vesicular monoamine transporter 2) trasportatore vescicolare delle monoamine 2

### Campioni

NM-0	neuromelanina isolata da tessuto senza proteinasi
NM-1, NM-2, NM-3	neuromelanina isolata da tessuto con proteinasi
NM-3-TIS	neuromelanina isolata da tessuto con proteinasi con proteine aspecifiche
ORG-A1, ORG-A2	organello di neuromelanina isolato in toto
ORG-B1, ORG-B2	organello di neuromelanina dopo trattamento con shock termico per la rimozione delle membrane

# 1 INTRODUZIONE

*L'oggetto di questa tesi è lo studio dell'organello di neuromelanina, un organello che si accumula nei neuroni durante l'invecchiamento del cervello umano, soprattutto all'interno della substantia nigra, l'area principalmente colpita dalla malattia di Parkinson.*

*In questo capitolo vengono innanzitutto riassunti brevemente i meccanismi dell'invecchiamento, l'accumulo di materiale intracellulare e i processi principalmente coinvolti nella rimozione di materiale intracellulare potenzialmente citotossico.*

*Di seguito viene riportata un'introduzione sulla malattia di Parkinson, soprattutto in riferimento alla patogenesi e ai meccanismi molecolari che portano alla degenerazione dei neuroni.*

*Vengono poi riassunte le caratteristiche, le origini e il ruolo dei pigmenti melanici in genere, in particolare vengono riportate le caratteristiche della neuromelanina e le recenti ipotesi riguardo al suo ruolo nel cervello umano.*

*Infine, viene svolta una breve panoramica sulle più recenti tecnologie proteomiche e soprattutto sulla tecnologia MudPIT utilizzata in questa tesi.*

## **1.1 Invecchiamento: caratteristiche e meccanismi coinvolti**

Si osserva che la probabilità di essere colpiti da malattie neurodegenerative cresce drammaticamente con l'aumentare dell'età [1–3]. Esiste quindi una stretta correlazione tra l'invecchiamento cerebrale e la neurodegenerazione. Spesso, sintomi e marker patologici tipici di alcune malattie neurodegenerative sono riscontrabili, anche se in modo meno marcato, in soggetti anziani non affetti da alcuna malattia neurodegenerativa [4]. Fenomeni di neurodegenerazione si verificano nel momento in cui l'invecchiamento cellulare viene accelerato in modo complesso e articolato da fenomeni genetici o ambientali e quando diminuisce l'efficienza di alcuni meccanismi cellulari che normalmente agiscono per contrastarlo [4].

Ci interessa chiarire brevemente alcuni aspetti cellulari e molecolari che caratterizzano il normale invecchiamento cellulare concentrandoci soprattutto sull'accumulo di materiale intracellulare e sui meccanismi deputati alla rimozione di questo materiale.

### 1.1.1 Caratteristiche dell'invecchiamento

L'invecchiamento è un fenomeno fisiologico inevitabile caratterizzato dal progressivo accumulo di danni molecolari che causano l'aumento del rischio di morte cellulare [5]. Nel sistema nervoso si verificano soprattutto danni dovuti a stress ossidativo [6], [7], diminuzione dell'attività mitocondriale e metabolica [8], danni al DNA genomico e mitocondriale [9] e accumulo di proteine danneggiate e aggregati cellulari [10].

Il progressivo accumulo di radicali liberi è una delle principali cause di invecchiamento e di morte cellulare [11]. I radicali liberi o specie reattive all'ossigeno (ROS) sono ioni, o piccole molecole, con elevata reattività, capaci quindi di legare e danneggiare altre molecole presenti nella cellula [12] (fig.1.1). I ROS che non vengono bloccati da meccanismi antiossidanti possono causare cross-link tra le proteine, ossidazione dei lipidi, accumulo di radicali alchilici e danni al DNA [5]. Anche i mitocondri hanno un ruolo centrale nei meccanismi dell'invecchiamento; per esempio, sono la principale fonte di stress ossidativo della cellula [13]. In aggiunta, negli ultimi anni sta emergendo il ruolo cruciale dei mitocondri all'interno della patogenesi del PD e in altre malattie neurodegenerative [14], [15].

### 1.1.2 Accumulo di proteine e meccanismi degradativi

Un'altra delle principali alterazioni riportate nel cervello durante l'invecchiamento è l'accumulo di aggregati intracellulari. Le malattie neurodegenerative più note come le malattie di Alzheimer (AD), di Parkinson (PD), di Huntington (HD) e la sclerosi laterale amiotrofica (ALS), sono caratterizzate dall'accumulo di aggregati proteici insolubili all'interno o all'esterno dei neuroni [16], [17].

Le cellule eucariotiche possiedono due principali sistemi per la degradazione delle proteine: il sistema ubiquitina/proteasoma (UPS) e il sistema lisosomiale/autofagico [18].

#### 1.1.2.1 Sistema ubiquitina/proteasoma e invecchiamento

Il proteasoma è presente nel citosol, nel nucleo e nei microsomi, e ha la capacità di riconoscere e degradare selettivamente proteine ubiquitinate [19]. L'accumulo di proteine danneggiate e ossidate è una delle conseguenze della diminuzione dell'attività del sistema UPS [20]. Durante l'invecchiamento non è stata osservata un'evidente perdita di attività del proteasoma [19] ma, l'accumulo di proteine ubiquitinate all'interno della cellula è una caratteristica tipica dell'invecchiamento [21]. L'accumulo di proteine ubiquitinate può avvenire in seguito all'aumento di ROS, all'aumento di danni al DNA e alla perdita di efficienza del sistema UPS; di conseguenza, le proteine ubiquitinate non vengono rimosse efficacemente e possono causare PD, AD e altre malattie neurodegenerative [19].

#### 1.1.2.2 Lisosomi e invecchiamento.

Il lisosoma, scoperto negli anni '50 da Christian de Duve, è il principale organello con funzioni di degradazione e riciclo [22]. Il lisosoma è un organello circondato da membrana, contenente più di 50 enzimi digestivi e capace di degradare proteine, acidi nucleici, zuccheri e lipidi. Una delle funzioni di questo compartimento è la distruzione di proteine e organelli danneggiati, garantendone il riciclo e impedendo il loro accumulo nella cellula [23]. Al microscopio elettronico il lisosoma appare solitamente come un organello sferico e contenente materiale elettron-denso, in alcuni casi può assumere però forme e densità differenti ed eterogenee a seconda

del materiale contenuto al suo interno. Un'altra caratteristica essenziale del lisosoma è un pH interno acido dovuto alla presenza di pompe protoniche. Ci sono diversi modi con i quali il lisosoma riceve materiale da degradare, i principali sono la fusione con endosomi che trasportano materiale extracellulare [23], la fusione con autofagosomi che sequestrano e trasportano al lisosoma principalmente materiale intracellulare [24] e l'internalizzazione selettiva di proteine target attraverso autofagia mediata da chaperoni (CMA) [25].

La diminuzione dell'attività proteolitica durante l'invecchiamento è stata osservata in molti organismi come causa del progressivo accumulo intracellulare di proteine danneggiate [26]. Infatti, l'inibizione farmacologica delle proteasi lisosomiali porta all'accumulo di lipofuscine e materiali di accumulo simili a quelli osservati durante l'invecchiamento [27]. Le lipofuscine, sono vacuoli contenenti materiale autofluorescente non degradabile derivato da proteine e lipidi danneggiati da stress ossidativo [28], [29]. Alcuni autori propongono che la formazione di lipofuscine difficili da degradare deriverebbe da un livello elevato di danni da perossidazione causati da reazioni di Fenton, dovute a loro volta all'aumento di ferro nel lisosoma (in seguito all'internalizzazione di ferritine, complessi della catena respiratoria mitocondriale, e altre proteine ricche in ferro) [30].

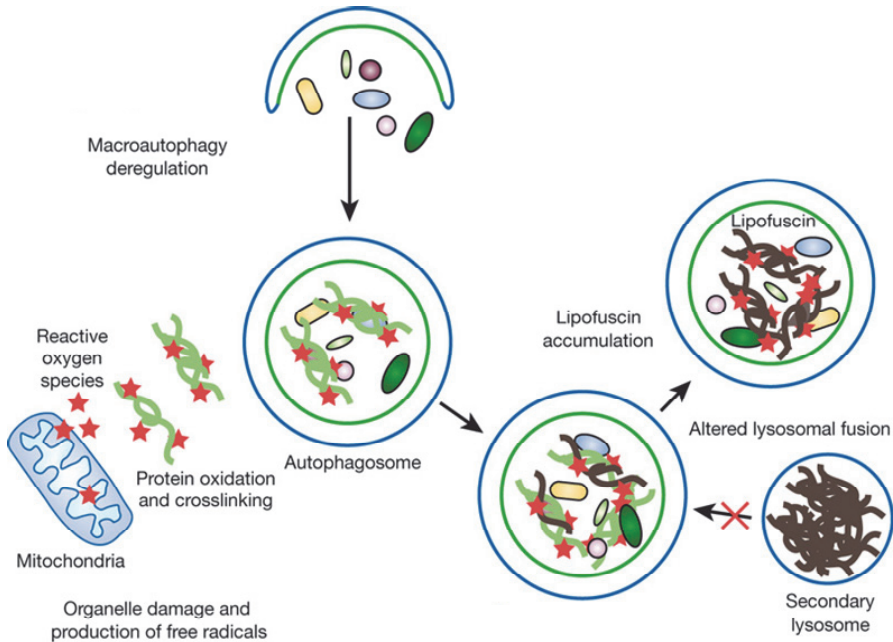
L'accumulo di materiale indegradabile nella cellula porta alla riduzione della capacità lisosomiale [27] e a possibile neurodegenerazione, come dimostrato in modelli murini della malattia di Alzheimer [31]. In particolare, se le cellule che si differenziano possono dividersi riducendo così il loro contenuto di materiale indegradabile, le cellule post-mitotiche come quelle del sistema nervoso non hanno questa capacità e sono perciò più suscettibili all'accumulo queste molecole e alla perdita dell'efficienza lisosomiale [5].

### **1.1.2.3 Autofagia e invecchiamento**

L'autofagia è un processo conservato in tutte le cellule eucariotiche e consiste nella degradazione di porzioni di citoplasma attraverso meccanismi lisosomiali [32]. Esistono tre diverse forme di autofagia: la macroautofagia, la microautofagia e l'autofagia mediata da chaperoni (CMA) [24]. La forma più comune e coinvolta maggiormente nei fenomeni legati all'accumulo di materiale intracellulare è la macroautofagia. Questo processo è inducibile da stress, è responsabile della degradazione di proteine solubili, interi organelli e perfino interi organismi [33], ed è caratterizzato dal sequestro di intere regioni di citoplasma all'interno di una doppia membrana che va a formare un compartimento chiamato autofagosoma [34] (fig.1.1). L'autofagosoma va poi a fondersi con un lisosoma acquisendo così gli enzimi e le condizioni necessarie per la degradazione del materiale in esso contenuto; l'organello che deriva da questa fusione viene chiamato autolisosoma o autofagolisosoma [33]. L'ultima fase di questo processo è la degradazione di tutto il materiale originariamente contenuto nell'autofagosoma che viene riciclato in molecole utili al metabolismo cellulare.

Recentemente, sta diventando sempre più evidente il ruolo dell'autofagia nell'invecchiamento e nelle malattie dell'uomo; molto importante è il ruolo dell'autofagia in cellule post-mitotiche come i neuroni e i miociti che non si differenziano [24]. Ad esempio, è stato osservato che la soppressione neuro-specifica di geni per la macroautofagia (atg5, atg7) porta a progressivi deficit motori, rallentamento della risposta ai riflessi e accumulo di lipofuscine e corpi di inclusione positivi all'ubiquitina all'interno dei neuroni [35], [36] (fig. 1.1). Questi e altri studi recenti dimostrano che il riciclo del contenuto della cellula diventa

indispensabile per preservare la cellula da neurodegenerazione. Parallelamente, esperimenti di induzione farmacologica dell'autofagia attraverso rapamicina dimostrano la diminuzione dell'accumulo citosolico di proteine mutanti dell'alfa-sinucleina e dell'huntingtina, responsabili del PD e del HD rispettivamente [37].



**Fig. 1.1. Autofagia e invecchiamento.** In questo schema viene riassunto il ruolo dell'autofagia nella degradazione di materiale potenzialmente tossico all'interno della cellula. Vengono riportati alcuni possibili fattori che possono portare a una perdita di funzionalità dei processi autofagici con conseguente accumulo di materiale indegradabile e potenzialmente tossico come le lipofuscine, tipiche dell'invecchiamento. I fattori evidenziati come coinvolti nella disfunzione dell'autofagia sono la produzione di stress ossidativo (ROS) (soprattutto di origine mitocondriale), l'aumento dei danni alle proteine e agli organelli cellulari e la ridotta capacità di fusione tra l'autofagosoma e il lisosoma dovuta ai danni appena descritti (modificato da Mizushima et al 2008 [24]).

## **1.2 La malattia di Parkinson**

### **1.2.1 Cenni storici.**

Nel 1817, all'inizio della rivoluzione industriale, il Dr. James Parkinson pubblicò un importante trattato dal titolo "An Essay on the Shaking Palsy" [38]. Con questa monografia presentò uno studio a lungo termine di sei casi di ciò che lui descrisse come "Paralysis Agitans". Questi soggetti soffrivano di una malattia caratterizzata principalmente da tremore degli arti a riposo, rigidità nei movimenti e riduzione della mobilità autonoma. Quaranta anni dopo, Charcot descrisse di nuovo questa condizione clinica, chiamandola "morbo di Parkinson" (PD) [39].

Solo nel secolo successivo Carlsson [40] scoprì la presenza della dopamina (DA) nel cervello umano, e questo diede inizio a numerosi studi finalizzati alla comprensione delle alterazioni biochimiche che ne causavano i sintomi. Importanti furono gli studi di Hornykiewicz che identificarono alterazioni nei livelli della DA come principale alterazione biochimica del PD [41], [42].

### **1.2.2 Sintomatologia**

I tre sintomi principali del PD sono: tremore, rigidità e bradicinesia. Il tremore è il sintomo più caratteristico della malattia, compare quando i muscoli sono a riposo e solitamente diminuisce o scompare durante i movimenti volontari [43], [44]. La rigidità è un altro segno caratteristico e costante della malattia. Si apprezza in oltre un aumento della resistenza al movimento passivo, con caratteristiche di "plasticità". Con bradicinesia si intende invece la lentezza nell'eseguire movimenti, è solitamente associata ad una riduzione della motilità volontaria ed involontaria in generale. Dalla combinazione della lentezza nei movimenti, della rigidità muscolare e dell'instabilità posturale risulta la difficoltà nella deambulazione.

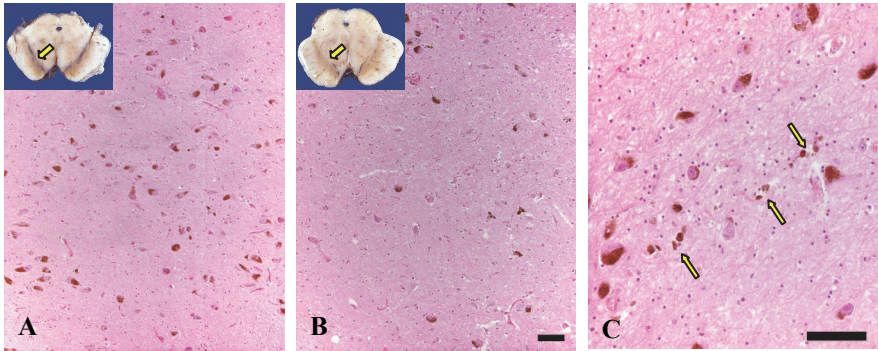
Altri sintomi sono la perdita dell'olfatto, depressione, demenza, disturbi del sonno, riduzione della dimensione della scrittura (micrografia), difficoltà nel parlare (disartria) e perdita dell'espressività facciale (ipomimia).

### **1.2.3 Neurochimica e neuropatologia del PD.**

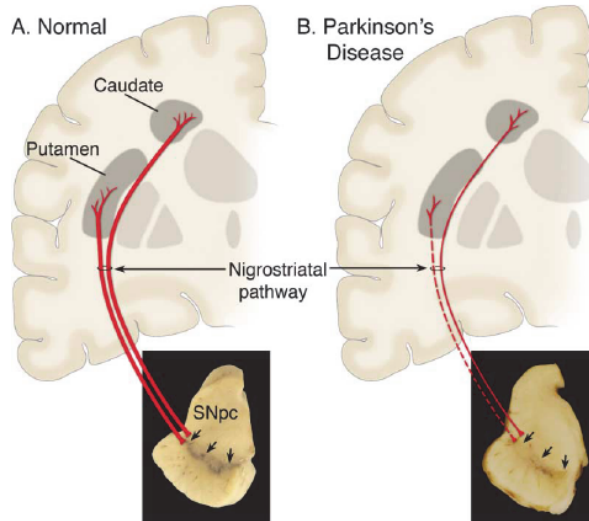
Le più importanti caratteristiche neuropatologiche della malattia sono la morte dei neuroni dopaminergici della substantia nigra (SN) e la presenza di inclusioni citoplasmatiche intraneuronali chiamate corpi di Lewy [44], [45].

La SN è situata tra il tegmento e il piede del mesencefalo e si presenta come una striscia scura per la presenza di neuroni che contengono elevate quantità del pigmento di neuromelanina (NM) [46]. La SN si divide in due parti (fig. 1.2): una parte più scura è chiamata SN pars compacta (SNpc), mentre quella più chiara è chiamata SN pars reticulata (SNpr). La SNpc è una porzione ad alta densità di neuroni contenenti notevoli quantità di NM (figura 1.2.A). I neuroni della SNpc ricevono stimoli inibitori dagli assoni collaterali dei neuroni della SNpr e proiettano i loro terminali assonici lungo la via nigrostriatale fino al putamen (principalmente) e al caudato (figura 1.3), rilasciando il neurotrasmettitore DA.

La degenerazione dei neuroni contenenti NM della SNpc è una delle due principali alterazioni patologiche del PD ed è rilevabile da una massiccia depigmentazione della SNpc (figura 1.2.B). Questa alterazione è accompagnata da un aumento delle cellule gliali (gliosi) e dalla presenza di neuromelanina nello spazio extracellulare.



**Figura 1.2.** SN umana colorata con ematossilina ed eosina. A. SNpc di un soggetto sano (71 anni) caratterizzata dalla presenza di molti neuroni pigmentati (marrone scuro). Nel riquadro superiore è rappresentata un'immagine della sezione di mesencefalo in cui è ben visibile la striscia scura (freccia) della SN. B. SNpc di un soggetto parkinsoniano (76 anni). E' evidente la massiccia diminuzione dei neuroni pigmentati. Anche a livello macroscopico è ben visibile la perdita di pigmentazione della SN (riquadro superiore). C. Ingrandimento della SNpc del soggetto parkinsoniano che dimostra la presenza di NM rilasciata nello spazio extracellulare (freccia) in seguito alla morte dei neuroni. Barra = 100  $\mu$ m.



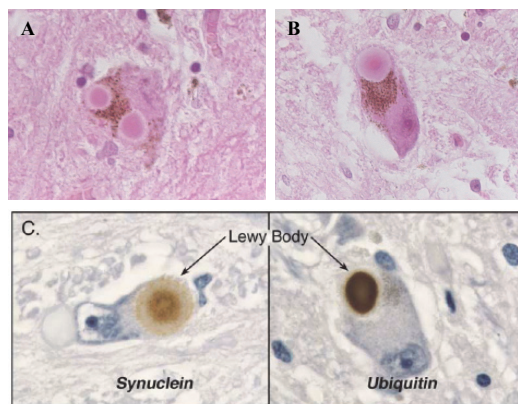
**Figura 1.3. Schema semplificato della via nigrostriatale.** A. Via nigrostriatale normale: i neuroni dopaminergici sono situati nella SNpc e proiettano i loro assoni allo striato (putamen e caudato). B. Nel PD la via nigrostriatale degenera: c'è una massiccia perdita di neuroni che proiettano nel putamen e una minore (ma importante) riduzione delle connessioni verso il caudato (da Dauer and Przedborski, 2003 [45]).



La conseguenza diretta della morte dei neuroni dopaminergici pigmentati della SNpc è la degenerazione della via nigrostriatale con conseguente deficit di DA (principale alterazione neurochimica del PD) nello striato, il quale è coinvolto nel controllo dei movimenti volontari (figura 1.3). Al momento della comparsa dei primi sintomi motori della malattia, il 60–70 % dei neuroni dopaminergici della SN sono già scomparsi [47], [48] e i livelli di DA striatali si sono ridotti dell'80 % .

La degenerazione, come anche la formazione delle inclusioni citoplasmatiche tipiche del PD (corpi di Lewy, vedere più avanti) avviene anche in altre aree cerebrali: nei neuroni noradrenergici del locus coeruleus (LC), nei neuroni serotoninergici (nuclei del raphe), nei neuroni colinergici (nucleo basale di Meynert, nucleo motore dorsale del vago) ma anche a livello della corteccia cerebrale, dell'ippocampo e del bulbo olfattorio. Questo è stato confermato da un importante studio in cui è stato dimostrato che la neurodegenerazione, e la comparsa dei corpi di Lewy durante il PD può essere suddivisa in diversi stadi [49].

La seconda caratteristica patologica del PD è la presenza di inclusioni citoplasmatiche chiamate corpi di Lewy (LB) all'interno dei neuroni [50]. Questi corpi sono inclusioni citoplasmatiche eosinofile di forma sferica costituite da aggregati proteici: le proteine che costituiscono i LB sono tipicamente l' $\alpha$ -sinucleina (proteina coinvolta nei meccanismi di trasporto delle vescicole sinaptiche), la parkina (è una E3 ubiquitina ligasi, componente del sistema ubiquitina–proteasoma, che lega le catene di poliubiquitina alle proteine destinate alla degradazione), l'ubiquitina (proteina che “marca” altre proteine destinate alla degradazione) e altre proteine [51], [52]. Hanno diametri maggiori di 15  $\mu\text{m}$  e presentano un nucleo denso circondato da un alone chiaro (figura 1.4). E' da notare che la presenza dei LB non è esclusiva del PD. Infatti sono stati osservati in altre patologie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer, in un tipo di demenza caratterizzata dalla presenza di queste inclusioni intraneuronali (demenza con LB) e anche in soggetti molto anziani ma senza sintomi di tipo neurodegenerativo [50].



**Figura 1.4.** A, B. Colorazione con ematossilina ed eosina di un tessuto di SN. Nel corpo cellulare di un neurone possono trovarsi uno o più LB. E' visibile la tipica struttura: un nucleo denso e compatto più scuro circondato da una alone chiaro. C. Marcatura immunohistochemica dei LB utilizzando anticorpi anti  $\alpha$ -sinucleina e anti ubiquitina. L'  $\alpha$ -sinucleina è localizzata più al centro del LB ed è presente in maniera diffusa nell'alone periferico, mentre l'ubiquitina è presente in maniera diffusa in tutto il LB (C da Dauer and Przedborski, 2003 [45]).



## 1.2.4 Eziologia del PD

Ad oggi, la causa della malattia di Parkinson non è ancora stata chiarita. Molti passi avanti nella comprensione delle cause del PD sono stati fatti grazie alla comprensione dei fattori ambientali e soprattutto grazie alle recenti scoperte riguardo ai geni che se mutati portano alla degenerazione tipica di questa malattia [14]. Se per molto tempo si è pensato ad un uguale contributo dei fattori ambientali e genetici nell'origine del PD, recentemente è emerso che la predisposizione genetica sembra essere di maggiore influenza nella patologia. Inoltre i fattori genetici e ambientali sembra che agiscano più facilmente in condizioni in cui è presente vulnerabilità neuronale tipica del normale invecchiamento cerebrale [4] (vedi anche sez 1.1).

### 1.2.4.1 Cause genetiche per comprendere la patogenesi del PD

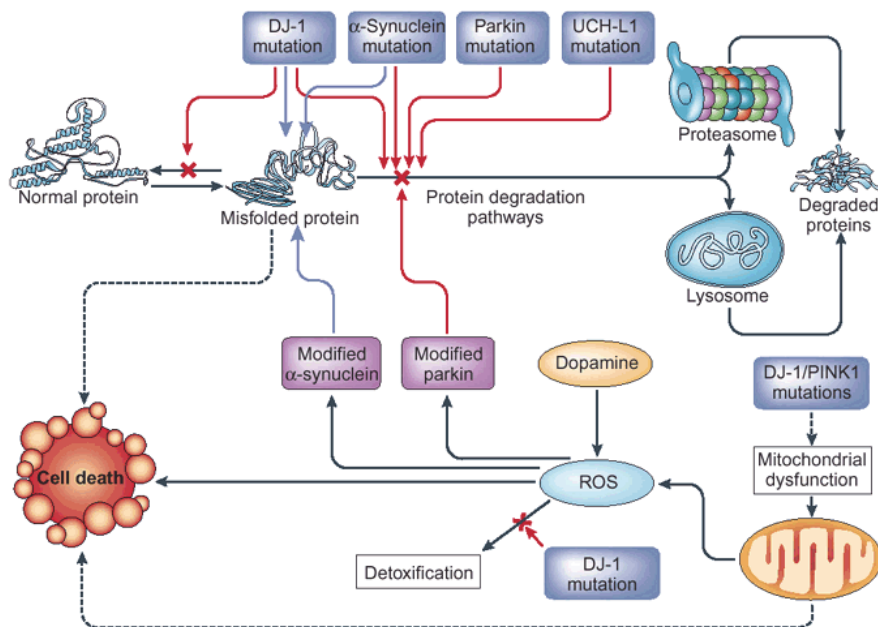
Il PD genetico o familiare (le cui mutazioni sono ereditate e seguono leggi mendeliane) è caratterizzato da una insorgenza in età giovanile (sotto i 50 anni), mentre la maggior parte dei casi di PD (sporadico, ad eziologia sconosciuta) si manifestano prevalentemente sopra i 60 anni di età [53]. Sebbene l'incidenza del PD genetico rappresenti solo una piccola percentuale (5-10 %) del totale dei casi, la scoperta dei geni correlati al PD ha permesso lo studio e la comprensione di molti aspetti dell'eziologia e della patogenesi di questa malattia (riepilogo in fig 1.5).

I loci mendeliani e il locus ad alto rischio "Gaucher's locus" sono correlati approssimativamente dal 10 al 40% del rischio di sviluppare PD a seconda della popolazione in esame [54]. Molte mutazioni producono fenotipi clinici e patologici differenti da quello tipico del PD; questo è in accordo con il fatto che differenti meccanismi patologici portano a manifestazioni cliniche correlate al PD [53]. Sebbene siano molti i geni associati PD (tabella 1.1), riepiloghiamo qui solo quelli confermati come chiaramente correlati alla patogenesi di questa malattia: alfa-sinucleina, LRRK2, PINK1, parkina e Dj-1.

Tabella 1.1 Geni e proteine associate a parkinsonismo. Modificata da Martin et al 2011 [53]

PARK locus	Gene	Protein	Clinical phenotype
PARK1/4	SNCA	Alpha-synuclein	Parkinsonism with common dementia
PARK2	parkin	Parkin	Early-onset, slowly progressing parkinsonism
PARK3	Unknown	Unknown	Late-onset parkinsonism
PARK5	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Late-onset parkinsonism
PARK6	PINK1	Serine/threonine-protein kinase PINK1	Early-onset, slowly progressing parkinsonism
PARK7	DJ-1	Protein DJ-1	Early-onset parkinsonism
PARK8	LRRK2	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 1	Late-onset parkinsonism
PARK9	ATP13A2	Probable cation-transporting ATPase 13A2	Early-onset parkinsonism with Kufor-Rakeb syndrome
PARK10	Unknown	Unknown	Unclear
PARK11	GIGYF2	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	Late-onset parkinsonism

PARK12	Unknown	Unknown	Unclear
PARK13	Omi/HTRA2	Serine protease HTRA2, mitochondrial	Unclear
PARK14	PLA2G6	85 kDa calcium-independent phospholipase A2	Parkinsonism with additional features
PARK15	FBX07	F-box only protein 7	Early-onset parkinsonism
PARK16	Unknown	Unknown	Late-onset parkinsonism
FTDP-17	MAPT	Microtubule-associated protein tau	Dementia, sometimes parkinsonism
SCA2	Ataxin	Ataxin-2	Usually ataxia, sometimes parkinsonism
SCA3	Ataxin	Ataxin-3	Usually ataxia, sometimes parkinsonism
Gaucher's locus	GBA	Glucosylceramidase	Late-onset parkinsonism



**Figura 1.5.** Riepilogo dei geni correlati all'insorgenza di Parkinson familiare. Grazie alla comprensione del fenotipo derivato dalla mutazione di questi geni è possibile comprendere molti aspetti della patogenesi della malattia di Parkinson. Vedere le descrizioni nel testo. (Modificata da Vila et al. 2004 [55])

## Alfa-sinucleina

Alfa-sinucleina è una piccola proteina da 140 kDa ed è presente solo nei vertebrati; invertebrati e organismi monocellulari non presentano omologhi di questa proteina [56]. In seguito all'identificazione della mutazione patogenica 209G>A [57], anche duplicazioni o triplicazioni del gene SNCA sono state osservate come causa di degenerazione cellulare [58]. Questi e altri studi hanno fin dal principio indicato che, anche in pazienti senza mutazioni a livello del gene SNCA, i livelli di

espressione e l'omeostasi di alfa-sinucleina sono importanti nella patogenesi del PD.

L'alfa-sinucleina è espressa ad alti livelli nel cervello, principalmente nelle terminazioni sinaptiche e in associazione alle membrane [59]. Il ruolo fisiologico di questa proteina è poco chiaro anche se recenti studi suggeriscono un ruolo nel rilascio di neurotrasmettitori [60]. In cervelli affetti da PD, l'alfa-sinucleina si trova nei corpi di Lewy di cui il principale componente [61]. L'alfa-sinucleina esibisce infatti un'elevata tendenza all'aggregazione e in certe condizioni polimerizza con la formazione di fibrille citotossiche. Queste caratteristiche sembrano essere quelle che causano la tossicità di questa proteina [62]. La perdita selettiva dei neuroni dopaminergici sembra essere correlata dall'effetto che ha la dopamina (e i suoi prodotti di ossidazione) sulla stabilizzazione delle strutture fibrillari e citotossiche dell'alfa-sinucleina [63]. Tra i fattori che favoriscono la tossicità dell'alfa-sinucleina, l'invecchiamento cerebrale sembra giocare un ruolo importante per gli elevati livelli di stress ossidativo e quindi di modifiche ossidative e nitrative a carico di questa proteina [64]. Anche la perdita dell'efficienza dei meccanismi lisosomiali e autofagici, deputati alla rimozione di proteine danneggiate, sembrano essere correlati al PD in correlazione alla tossicità dell'accumulo alfa-sinucleina. Non ultimo, il gene lisosomiale GBA, che codifica per l'enzima glucosilceramidasi, è fortemente associato al PD e alle patologie che implicano la formazione di corpi di Lewy [65].

### **LRRK2**

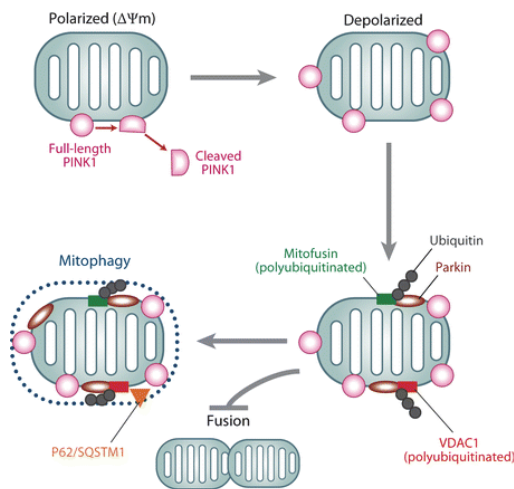
LRRK2 è una proteina multi dominio con attività serin/treonin chinasi dipendente da GTP [66]. Non è molto chiaro il suo ruolo fisiologico ma il suo dominio chinasi è molto simile alle famiglie di kinasi associate a recettore per interleuchina con dominio "death" [67]. Molte mutazioni a carico di LRRK2 portano a PD autosomico dominante [44] e la caratteristica più interessante di questo tipo di PD è che presenta un fenotipo clinico tipico del PD sporadico anche in assenza di corpi di Lewy [68]. Questo dato indica innanzitutto che le inclusioni citoplasmatiche potrebbero essere solo la conseguenza della neurodegenerazione del PD, e non la causa. Ci sono molti aspetti che correlano LRRK2 con il PD (vedi [53]); tra quelli che riguardano di più la patogenesi riportiamo la probabile interazione tra LRRK2 e l'espressione, l'aggregazione e la tossicità dell'alfa-sinucleina [53]. Ad esempio, modelli knock-out per LRRK2 mostrano un ridotto accumulo di alfa-sinucleina mutata e un ritardo delle patologie associate [69].

### **PINK1 e parkina**

Mutazioni che danneggiano la funzione delle proteine PINK1 e parkina sono associate a una larga parte dei casi di PD genetico, caratterizzato da un esordio precoce e spesso in assenza di corpi di Lewy intracellulari [70]. Numerosi studi suggeriscono che PINK e parkina agiscono a livello dei sistemi di controllo di qualità dei mitocondri e che il danneggiamento di questi sistemi è la causa della neurodegenerazione in soggetti con mutazione di questi geni [71]. PINK1 è una protein-chinasi che si trova nei mitocondri e nel citosol [72], parkina è una E3 ubiquitina ligasi che contrassegna le proteine da inviare al proteosoma per essere degradate [73]. La parkina è una proteina che si danneggia e inattiva in condizioni di stress ossidativo, nitrativo e dopaminergico anche durante il PD sporadico [73]. Inoltre, l'accumulo di substrati della parkina (proteine danneggiate) si pensa che contribuisca alla degenerazione dopaminergica a causa del danneggiamento della parkina stessa [74]. Questi dati indicano il ruolo fondamentale che hanno lo stress

ossidativo, nitrativo e dopaminergico, e l'accumulo di proteine danneggiate tra i meccanismi che favoriscono la neurodegenerazione che causa il PD.

La perdita completa di PINK1 o di parkina in *Drosophila melanogaster* porta a due situazioni molto simili che coinvolgono danni al sistema locomotorio, degenerazione muscolare, ridotto tempo di vita, perdita di neuroni dopaminergici e danneggiamento della morfologia mitocondriale [75], [76]. Inoltre, mutanti che mancano della funzione di PINK1 o parkina sono più suscettibili a stress ossidativo dovuto anche alla produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) di origine mitocondriale [77]. Studi successivi hanno confermato che la parkina può essere reclutata in modo selettivo da mitocondri danneggiati e che il reclutamento dipenda da PINK1 presente nei mitocondri stessi (fig. 1.6) [78]. Un meccanismo proposto implica che la proteina PINK1 venga tagliata e inattivata se contenuta in mitocondri polarizzati (funzionali) e che, al contrario, venga lasciata nella forma attiva in mitocondri depolarizzati (danneggiati) [79]. Secondo questo meccanismo, i mitocondri danneggiati e quindi fonte di stress ossidativo, sarebbero riconosciuti dalla proteina parkina, sottoposti a ubiquitinazione e auto fagocitati (mitofagia) per essere degradati e rimossi dal citosol [80]. Questo meccanismo confermerebbe l'importante il ruolo del danno mitocondriale e dello stress ossidativo all'interno dei fattori che provocano il PD (fig.1.6).



**Figura 1.6. Rappresentazione schematica del ruolo delle proteine PINK-1 e Parkin nei meccanismi di controllo qualità del mitocondrio.** Se il mitocondrio è danneggiato presenta bassa polarizzazione e questo porta l'accumulo di PINK-1 nella forma intera; in questa condizione il mitocondrio viene riconosciuto da un gruppo di proteine che inducono la degradazione del mitocondrio danneggiato (mitofagia) (Modificata da Martin et al 2011 [53])

## Dj-1

La mutazione omozigote per il gene Dj-1 porta a PD ad esordio precoce [81]. Dj-1, inizialmente riconosciuto come oncogene, è un fattore neuroprotettivo in condizioni di stress ossidativo. Topi knock-out per Dj-1 mostrano ipersensibilità verso lo stress ossidativo e morte accelerata dei neuroni dopaminergici in seguito a trattamento con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) (una neurotossina che provoca parkinsonismo, vedi sez.1.2.4.2) [82]. In condizioni normali questi topi mostrano livelli elevati di  $H_2O_2$  e disfunzioni nel re-uptake della

dopamina [83]. Questi danneggiamenti indotti in topo da mutazioni a carico di Dj-1 non sono però sufficienti a generare neurodegenerazione [84]; questo suggerisce che la perdita di Dj-1 non è sufficiente per provocare il PD (almeno nel topo) ma che è necessario l'intervento di altri fattori probabilmente di tipo ambientale. Inoltre, in cellule dopaminergiche umane in cultura, la perdita del gene Dj-1 porta a depolarizzazione e frammentazione mitocondriale causata da stress ossidativo [85]; questo implica che anche Dj-1 è importante per l'integrità e la funzione dei mitocondri.

Il meccanismo con il quale Dj-1 protegge i mitocondri e preserva la salute delle cellule sembra essere dovuto alla sua capacità di bloccare molecole di  $H_2O_2$  grazie alla sua attività perossidasi analogo a quella delle perossiredossine [84] (fig. 1.5). In aggiunta, Dj-1 può regolare positivamente la sintesi dell'antiossidante glutatione [86].

Dalle osservazioni sperimentali appena descritte riguardo a PINK1, parkina e Dj-1, appare evidente l'importanza delle disfunzioni mitocondriali e dello stress ossidativo nella patologia che porta a fenotipi parkinsoniani. I danni al mitocondrio sembrano avere un ruolo centrale nello sviluppo di PD sporadico, accentuati da fattori ambientali, in combinazione con variazioni geniche e la vulnerabilità neuronale tipica del normale invecchiamento (fig.1.5).

#### **1.2.4.2 Fattori ambientali**

Tra i molti esempi di fattori ambientali che portano a fenomeni neurodegenerativi del tutto riconducibili al PD e che hanno stimolato l'interesse verso la componente ambientale di questa malattia, il 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), identificato per la sua capacità di provocare parkinsonismo, ha aperto la strada verso la comprensione delle cause e della patogenesi del PD. Il danno più importante viene realizzato dallo ione 1-metil-4-fenilpiridinio ( $MPP^+$ ) (derivato dal MPTP) all'interno del mitocondrio, dove inibisce il complesso I della catena respiratoria, bloccando il trasporto di  $e^-$  dal complesso I all'ubiquinone. La conseguenza è un aumento dello stress ossidativo con produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e una diminuzione della produzione di ATP [87], [88]. La scoperta dell'elevata tossicità mitocondriale del  $MPP^+$  e dello stress ossidativo che ne consegue, hanno permesso di identificare questi due aspetti tra i più importanti nella patogenesi del PD.

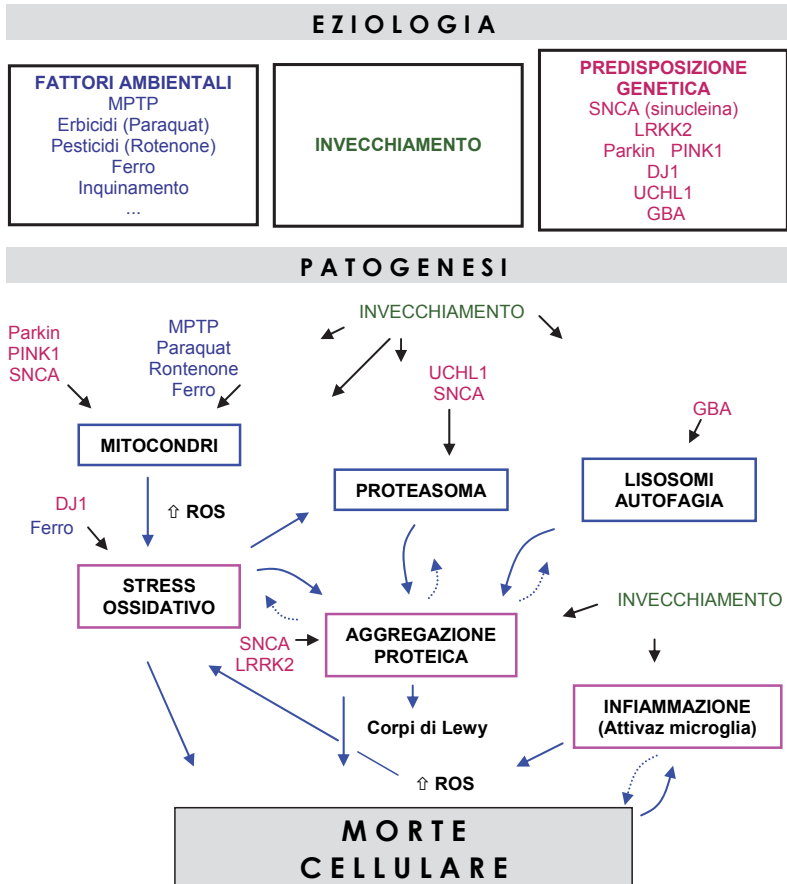
Riguardo ai fattori ambientali, molto interesse è rivolto anche all'esposizione di pesticidi. Il paraquat (un erbicida) e il rotenone (un insetticida) hanno una struttura molto simile allo ione  $MPP^+$  e quindi possono funzionare come neurotossine specifiche. La tossicità del paraquat sembra essere mediata dalla formazione di radicali superossidi, mentre il rotenone agisce, come lo ione  $MPP^+$ , sulla catena respiratoria mitocondriale. Dal momento che queste due sostanze sono facilmente reperibili nell'ambiente, alcuni studi epidemiologici hanno suggerito un'associazione tra l'esposizione a questi pesticidi, soprattutto negli ambienti rurali, e un aumento dell'insorgenza del PD [89–92]. Sempre seguendo la teoria dell'esposizione ambientale, altri studi epidemiologici hanno riscontrato un'associazione tra l'esposizione ambientale a metalli pesanti, quali Fe, Mn, Cu, Zn, Al e Pb, i quali possono accumularsi nel tempo all'interno del cervello e provocare stress ossidativo e l'insorgenza del PD (Lai et al., 2002; Jankovic, 2005). Il fumo delle sigarette e l'assunzione di caffè sembrano invece essere inversamente

correlati all'insorgenza del PD [90], [93]. Anche se i dati epidemiologici non sono sempre concordanti nel trovare l'associazione tra l'esposizione ad un determinato composto e l'insorgenza del PD [90], è chiaro che esistono sostanze che possono modificare la suscettibilità a questa malattia.



### 1.2.5 Ipotesi recenti sulla patogenesi del PD

Abbiamo descritto nelle sezioni precedenti le principali caratteristiche patologiche della malattia osservate nei tessuti post-mortem (sez. 1.2.3) e i principali fattori genetici e ambientali che si ipotizza inducano la neurodegenerazione del PD. Riassumiamo qui quali sono i principali meccanismi cellulari coinvolti nella morte neuronale e quali sono le ipotesi secondo le quali questi meccanismi possono interagire fino a provocare la malattia di Parkinson (riepilogo in fig. 1.7)



**Figura 1.7. Eziologia e patogenesi della malattia di Parkinson.** In questo schema vengono riepilogati tutti i fattori che aumentano il rischio di insorgenza della malattia (fattori ambientali, fattori genetici, invecchiamento) e tutti i meccanismi che contribuiscono alla neurodegenerazione e alla morte cellulare. Vedere descrizione dettagliata nel testo. Le frecce indicano le relazioni tra i diversi fattori coinvolti nella patogenesi. Le frecce blu piene indicano conseguenze dirette dell'aumento del fattore o del meccanismo in oggetto, le frecce blu tratteggiate indicano la possibilità che i due fattori o meccanismi vadano incontro a un meccanismo di stimolo reciproco (circolo vizioso).



### **1.2.5.1 Stress ossidativo**

Lo stress ossidativo è da molto tempo associato con la suscettibilità dei neuroni dopaminergici (fig.1.7). Esempi sono la formazione di stress ossidativo dovuto all'auto-ossidazione della dopamina e ai prodotti che ne derivano. Si conosce la vulnerabilità dei neuroni dopaminergici verso lo stress ossidativo causato dalla dopamina ossidata (6-idrossi dopamina, 6-OHDA) [94]; sappiamo inoltre dell'abbondante formazione di NM nei neuroni della SN, con la funzione di rimuovere i prodotti di ossidazione appena citati [95], [96]. L'identificazione di crescenti livelli di ferro durante il PD e l'alterazione di alcuni pathway correlati al ferro indicano un ruolo dei radicali liberi in questa malattia e in altre malattie neurodegenerative [97]. In aggiunta, sono osservati ridotti livelli di enzimi antiossidanti [98], danni ossidativi alle proteine, ai lipidi e al DNA [99–101]. Molecole ossidanti molto importanti per la patogenesi del PD sembrano essere i ROS come lo ione superossido e il radicale ossidrilico; non essendo molecole prodotte dal metabolismo dopaminergico (che produce piuttosto idrossido di idrogeno) si pensa che non sia sufficiente la presenza di dopamina per spiegare la vulnerabilità di questi neuroni, inoltre alcuni neuroni dopaminergici non muoiono durante il PD [102].

### **1.2.5.2 Difunzione mitocondriale**

La relazione diretta tra il PD la disfunzione mitocondriale deriva da molte osservazioni; la più importante è l'inefficienza del complesso I della catena respiratoria mitocondriale osservata in SN di soggetti con PD [103], inoltre la maggior parte delle alterazioni mitocondriali sembrano essere circoscritte soprattutto nella SN [104]. Le alterazioni mitocondriali osservate in soggetti con PD sporadico sono inoltre correlate ad elevati livelli di stress ossidativo e di ferro, indicando l'importanza del contributo mitocondriale nella formazione di tossicità neuronale nella patogenesi del PD [105–107] (fig.1.7)..

Come già descritto nelle sezioni precedenti (sez. 1.2.4.1), la centralità dei mitocondri all'interno della patogenesi è stata recentemente enfatizzata dalla scoperta che molte mutazioni genetiche che portano a PD familiare e parkinsonismi sono correlate ai mitocondri. Oltre a ciò che è stato descritto in sez 1.2.4.1 è da tenere in considerazione la correlazione che si è osservata recentemente tra alfa-sinucleina e mitocondri. Si è osservato che l'alfa-sinucleina è presente anche nelle membrane mitocondriali [108] e che può indurre la frammentazione di questi inibendone la fusione [109].

### **1.2.5.3 Omeostasi delle proteine: proteasoma, lisosomi e autofagia**

I corpi di Lewy è una delle più importanti manifestazioni patologiche del PD, rappresentano da sempre un marker della malattia ma la loro rilevanza ai fini della comprensione della patogenesi del PD è ancora incerta. I corpi di Lewy osservati in PD sporadico sono molto ricchi di alfa-sinucleina soprattutto e di altre proteine normali o danneggiate [110]. In aggiunta, tra i geni che se mutati portano al PD troviamo la parkina (gene PARK2, vedi sez. 1.2.4.1) e UCHL1 (proteina coinvolta nel processamento di proteine ubiquitinate, se mutata porta a PD genetico tipo PARK5 con corpi di Lewy), entrambe coinvolte nel sistema di degradazione proteasoma-ubiquitina (UPS) [111], [112]. I dati appena descritti hanno suggerito il ruolo rilevante che ha l'omeostasi delle proteine nella patogenesi del PD (fig.1.7).. In cervelli affetti da PD è riportata una riduzione dell'attività proteasomale nella SN che non si osserva in altre aree cerebrali [113], inoltre si evidenzia nel PD e

nell'invecchiamento una differente espressione e organizzazione del proteasoma 26S [114], [115]. Sebbene non si sappia se queste alterazioni siano una causa o una conseguenza della neurodegenerazione che avviene nel PD, sono stati svolti molte indagini con l'utilizzo di inibitori del proteasoma per studiare i loro effetti sulla morte dei neuroni dopaminergici.

Recentemente molta attenzione è stata rivolta al ruolo dell'autofagia nei meccanismi neurodegenerativi che portano al PD (fig.1.7). Nella SN di cervello affetto da PD è riportato un aumento del numero di vacuoli autofagici (autofagosomi) e di corpi di Lewy contenenti proteine associate all'autofagia [116], [117]. Le stesse osservazioni sono state osservate in cellule in cultura esposte a tossine come l'MPP+ e il rotenone, e in modelli transgenici del PD [118], [119]. L'autofagia mediata da chaperonine (CMA) sembra essere coinvolta nel metabolismo dell'alfa-sinucleina e la sua capacità metabolica diminuisce nel PD per la ridotta espressione di LAMP2A (Lysosome-associated membrane glycoprotein 2) e HSC70 (Heat shock cognate 71 kDa protein). Sebbene né il proteasoma né la macroautofagia siano coinvolti nella degradazione dell'alfa-sinucleina wild-type, la macroautofagia è importante per la rimozione di alfa-sinucleina mutata (forma A53T). In aggiunta, in topi trattati con MPTP si evidenzia che l'accumulo di autofagosomi è preceduto da una marcata riduzione del numero di lisosomi nei neuroni dopaminergici a causa di una perdita dell'adeguata permeabilizzazione delle membrane lisosomiali, causata a sua volta dall'aumento di specie ossidanti (ROS) di origine mitocondriale [117]. Infine, uno stimolo dei meccanismi autofagici attraverso l'uso di rapamicina riesce ad attenuare la morte di neuroni dopaminergici indotta da MPTP/MPP+.

Questi aspetti suggeriscono che il sistema lisosomiale/autofagico è una componente importante nella patogenesi del PD ma che il loro ruolo sia chiaramente legato alla salute dei mitocondri e allo stress ossidativo ad essi correlato.

#### **1.2.5.4 Infiammazione e microglia**

Un ultimo fattore importante nella patogenesi del PD è il ruolo della microglia e dell'infiammazione indotta da essa. In studi post-mortem su SN di soggetti PD si osserva microgliosi e alterazioni delle citochine infiammatorie [120]. Sono osservati livelli elevati di tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) che possono indurre ad apoptosi e ad alterazioni del fattore di trascrizione pro-infiammatorio NK- $\kappa$ B. L'espressione di i-NOS (nitric oxide synthase inducibile) è aumentata e questo provoca un aumento della tossicità dovuta alla nitratura delle proteine. Questi fenomeni rendono potenzialmente tossica l'azione delle cellule gliali. Non è ancora chiaro se l'attivazione delle cellule della glia sia una causa primaria della morte dei neuroni o se sia una conseguenza della morte cellulare (fig.1.7)..

### 1.3 Melanine

*Il fatto che il cervello contenga un pigmento melanico che chiamiamo neuromelanina, strutturalmente e chimicamente simile alle melanine<sup>a</sup> contenute nella pelle, nei capelli e in altri tessuti, ha suscitato l'interesse di numerosi scienziati fin dall'inizio del XIX secolo. Sebbene attualmente si conosca molto riguardo alla struttura e al ruolo della melanina periferica,, molte domande rimangono aperte rispetto alla struttura e alla funzione della neuromelanina del cervello. Un primo approccio utilizzato fin dai primi studi sulla neuromelanina è stato il confronto di questi due tipi di melanine. Riportiamo in questo sottocapitolo un riepilogo sulle caratteristiche delle melanine periferiche.*

Il termine melanina origina dalla parola greca *melas*, che significa nero. Con il termine melanina si indicano i pigmenti scuri presenti in numerose specie animali e vegetali, in alcune specie di funghi e in alcuni batteri. In questa introduzione si parlerà soprattutto della melanina umana, presente nei capelli, nella pelle, nell'orecchio interno e nell'occhio (iride, retina e coroide).

#### 1.3.1 Principali studi sulle melanine

I primi studi sulla pigmentazione nell'uomo risalgono a quasi 4 secoli fa; nel 1614 lo scienziato italiano Santorio Santorius attribuiva alla bile la pigmentazione nera della pelle [121]. Nel 1720 l'anatomista francese Alexis Littre, non trovò bile nella pelle ma identificò un "pigmento nero e insolubile" che oggi chiamiamo melanina [122]. Il termine "melanina" venne però usato per la prima volta nel 1901 da Otto v. Furth e Hugo Schneider che descrissero la formazione del pigmento come risultato della reazione tra una ossidasi intracellulare e gruppi aromatici di alcune proteine [123]. Nel 1927 Henry Stanley Raper conferma la presenza dell'aminoacido aromatico tirosina in tutti i tessuti, compresa la pelle [124]; usando estratti di piante e funghi scoprì che le principali melanine derivano da una reazione di ossidazione enzimatica da parte dell'enzima tirosinasi che trasforma l'aminoacido tirosina in dopachinone. Ulteriori studi da melanina nera di seppia permisero l'identificazione di ulteriori precursori delle melanine, derivati dai passaggi successivi all'ossidazione del dopachinone: dopacromo, il 5,6-diidrossiindolo (DHI) e l'acido 5,6-didrossiindolo-2-carbossile (DHICA). Negli anni 60' Giuseppe Prota e Rodolfo Nicolaus caratterizzarono melanine rosse derivate da piume di uccello identificando la 5-S-cisteinildopa (5-S-CD) come precursore tipico e come fonte del colore rossastro di queste melanine [125–130]. Di seguito le melanine vennero classificate in due differenti classi: le melanine nere, derivate dai precursori DHI/DHICA, vennero definite eumelanine (*eu*, in greco "buono", "perfetto"); le melanine con aspetto più rossastro e derivate da 5-S-CD vennero definite feomelanine (*phaeo*, in greco "scuro"). Oggi sappiamo che per la sintesi delle eumelanine sono necessari certamente tre enzimi: la tirosinasi, la dopacromo tautomerasi (TYRP2) e la DHICA ossidasi (TYRP1); per la sintesi delle feomelanine è sufficiente invece l'enzima tirosinasi con il contributo dell'aminoacido cisteina [131] (fig. 1.8). La maggior parte delle melanine presenti nei tessuti pigmentati sono polimeri costituiti da una miscela di eumelanine e feomelanine.

<sup>a</sup> In questa tesi si userà il termine "melanina" con riferimento alle melanine periferiche: presenti nella pelle, negli occhi, nei capelli e comunque al di fuori del sistema nervosa centrale.

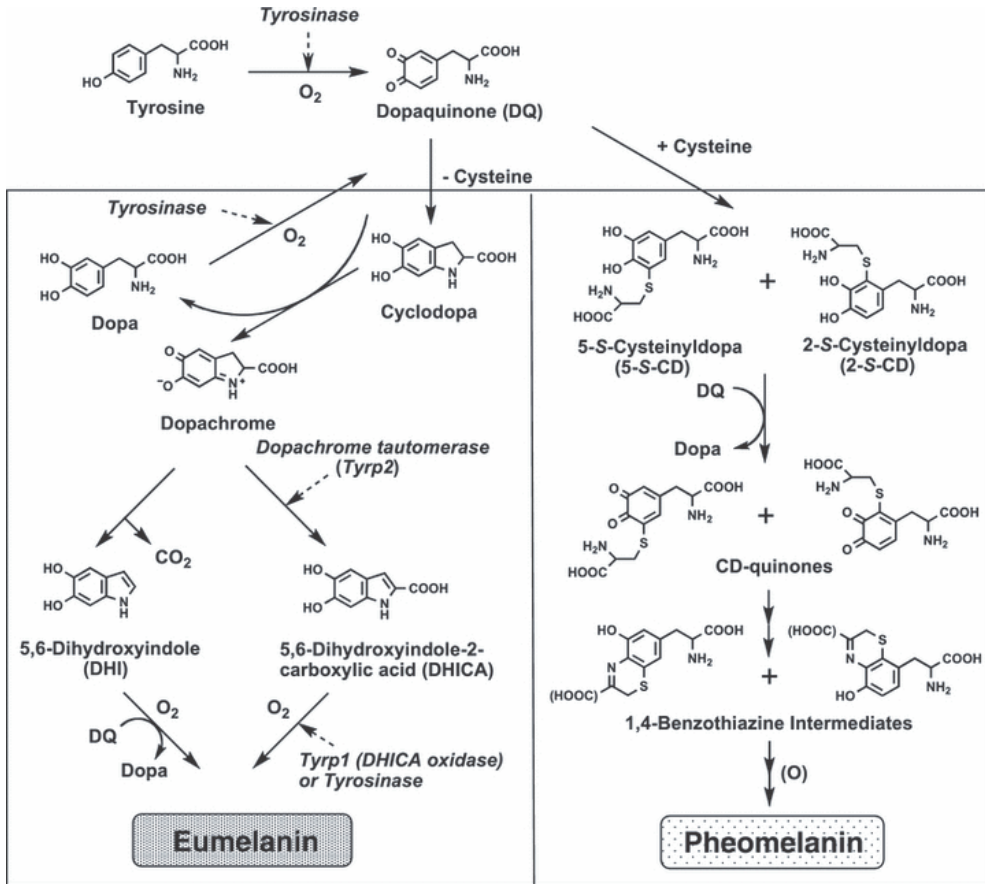


Figura 1.8. Rappresentazione schematica della biosintesi delle eumelanine e feomelanine. (Modificato da Ito e Wakamatsu 2008 [131])

Nel 1952 Luigi Panizzi e Rodolfo Nicolaus identificarono l'acido pirrolo 2-3-5-tricarbossilico (PTCA) come principale prodotto di degradazione delle eumelanine [132], negli anni successivi lo studio dei prodotti di degradazione delle melanine diventerà l'approccio tipico per lo studio delle caratteristiche e della composizione di queste macromolecole complesse. In seguito Ernesto Fattorusso, Luigi Minale e collaboratori identificarono i prodotti di degradazione delle feomelanine, tra i più importanti l'aminoidrossifenil-alanina (4-AHP) [133]. Un importante sviluppo dello studio delle melanine fu apportato da Shosuke Ito con la messa a punto di metodi efficienti per quantificare i prodotti di degradazione di melanine complesse ed eterogenee come quelle di origine umana e animale [134]. In particolare, ottimizzarono la quantificazione di PTCA, acido-2,3-dicarbossilico (PDCA) e 4-AHP; questo metodo, sebbene non riesca ad indagare la connettività tra i diversi monomeri all'interno dell'eteropolimero, è tutt'ora utilizzato per lo studio della composizione di tutte le melanine [134–139].

Altre due tappe fondamentali dello studio delle melanine furono l'identificazione del carattere radicalico delle melanine da parte di Barry Commoner nel 1954 [140] e la

dimostrazione delle proprietà chelanti del polimero di melanina, in particolare del radicale *o*-semichinone, verso i metalli, portata alla luce da Tadeusz Sarna e collaboratori nel 1978 [141].

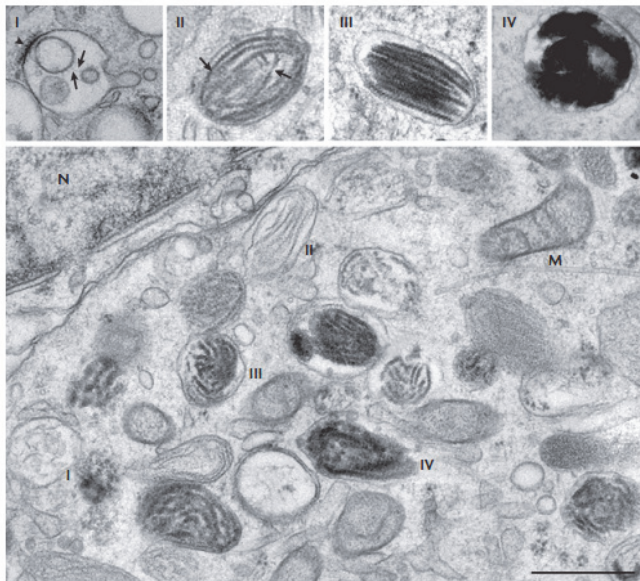
### 1.3.2 Principali funzioni delle melanine

Le caratteristiche chimiche delle melanine rilevarono fin da subito il ruolo protettivo di questi pigmenti per l'organismo, specialmente contro i danni da ossidazione. Le melanine sono infatti importanti nella pelle e nella retina per la loro capacità di assorbire le radiazioni ultraviolette (UV) minimizzando la penetrazione e la tossicità delle radiazioni a livello delle cellule epiteliali sottostanti [142]. Anche il colore dei capelli è derivato dalla melanina e anche in questo caso la funzione del pigmento riguarda sia la protezione dalle radiazioni UV del sole sia la capacità di trattenere il calore dei raggi solari stessi [143].

### 1.3.3 La biogenesi dei melanosomi

*Considerando che uno degli scopi di questo lavoro consiste nella descrizione dell'organello di neuromelanina ( il "melanosoma del cervello") riteniamo importante illustrare come avviene la genesi dei melanosomi e come, nei melanociti, la sintesi di melanina sia finemente regolata.*

I melanosomi sono stati isolati e caratterizzati morfologicamente per la prima volta da Makoto Seij, nel 1961 [144] e negli stessi anni si sono svolti i primi studi sulla loro biogenesi. I melanosomi sono organelli circondati da membrana e con un diametro di circa 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$  all'interno dei quali avviene la sintesi di melanina (Fig.1.9).



**Figura 1.9.** Caratteristiche ultrastrutturali dei melanosomi nelle diverse fasi della loro maturazione. I numeri romani indicano le fasi di maturazione; la barra equivale a 0,5  $\mu\text{m}$ . (Modificato da Raposo e Marks 2007 [145])

A loro volta, i melanosomi sono contenuti nei melanociti (nella pelle e nei capelli) e nelle cellule pigmentate epiteliali (nei tessuti oculari). La sintesi di melanina avviene all'interno dei melanosomi per proteggere il citosol e gli altri organelli dallo stress ossidativo prodotto durante la sintesi del pigmento; inoltre i melanosomi hanno lo scopo di concentrare/accumulare melanina (nelle cellule pigmentate dell'occhio) oppure di permetterne il trasporto dai melanociti ai cheratinociti (nella pelle e nei capelli) [145]. Il melanosoma è considerato un organello lisosoma-simile ("lysosomal-related organelle") [146]. Questi organelli condividono con il lisosoma alcune caratteristiche, tra cui un basso pH e la presenza di proteine e di membrane caratteristiche dei lisosomi.

Numerosi studi svolti soprattutto da Vincent Hearing e Ettore Appella intorno agli anni 90' hanno poi definito 4 fasi distinte attraverso le quali avviene la maturazione del melanosoma (Fig. 1.9) [147]. Le prime due fasi, in assenza di pigmento, sono caratterizzate dal trasporto di proteine importanti per la formazione delle fibrille (fase I) e dal completamento della formazione di fibrille all'interno del lume delle membrane melanosomali (fase II). Una volta che all'interno del melanosoma si visualizza una caratteristica striatura ellissoidale si ritiene conclusa la fase II. Melanosomi in fase III sono caratterizzati dal deposito di melanina (pigmentazione scura) in corrispondenza delle fibrille. Quando la melanina occupa la maggior parte del lume melanosomale, impedendo la visualizzazione della struttura delle fibrille, il melanosoma viene definito in fase IV e a maturazione conclusa. Nell'occhio i melanosomi rimangono nelle cellule pigmentate sia durante che dopo la loro maturazione [148]; per contro, nei melanociti dell'epidermide, i melanosomi in fase VI vengono trasportati attraverso trasporto bi-direzionale, lungo i microtubuli, verso l'esterno della cellula per essere trasferiti nelle cellule specializzate chiamate cheratinociti [149].

### 1.3.4 Proteine del melanosoma

Negli ultimi anni sono state identificate alcune proteine che se mutate portano ad albinismo o problemi alla pigmentazione (verificati nell'uomo o in animali modello), queste proteine sono fondamentali per la sintesi della melanina e sono generalmente definite specifiche del melanosoma. In aggiunta, passi importanti nella comprensione della struttura e la formazione del melanosoma sono stati fatti attraverso la caratterizzazione proteomica di ogni fase della maturazione di questo organello [150], [151].

Tra le proteine più importanti riportiamo:

- PMEL17 (conosciuta anche come gp100): è la componente strutturale della matrice fibrillare sulla quale viene depositata la melanina, che [152];
- tirosinasi: enzima che dà inizio alla sintesi della melanina (fasi III e IV) attraverso l'ossidazione della tirosina a DOPA e l'ossidazione della DOPA a dopachinone (fig1) [153];
- dopachromo tautomerasi (DCT o TYRP2): proteina omologa per >50% alla tirosinasi che catalizza la conversione di dopachromo in DHICA [154];
- DHICA ossidasi o tirosina-related protein-1 (TYRP1 o TRP1 o gp75): è anche essa omologa per >50% alla tirosinasi e svolge un ruolo catalitico nell'ossidazione del DHICA e probabilmente un ruolo regolatorio ancora da chiarire [155];



- MART1 (melanoma antigen recognized by T-cells-1): proteina integrale di membrana, correlata a PMEL17 e importante per la formazione di fibrille, ma della quale non si conosce con chiarezza il ruolo;
- OA1: recettore accoppiato a proteine G con funzioni regolatorie [156];
- OCA2 (conosciuta anche come P o Pink): trasportatore di membrana di anioni e media l'importazione di tirosina nell'organello [157];
- SLC45A2 (conosciuto anche come MATP): proteina di membrana importante per il trasporto di DOPA [158];
- SLC24A5: scambiatore di cationi [159] .

La biogenesi del melanosoma avviene attraverso vie di trasporto di proteine e molecole precursori attraverso meccanismi ben regolati. Questi meccanismi di trasporto sono recentemente oggetto di numerosi studi e sono un'opportunità per comprendere come proteine appena sintetizzate sono indirizzate all'interno della cellula per dare vita a un nuovo organello (riepilogo nella review [145]).

## 1.4 Neuromelanina

### 1.4.1 Brevi cenni storici delle prime caratterizzazioni della neuromelanina

L'osservazione di regioni cerebrali pigmentate fin dal XVIII secolo nei manuali di anatomia. Nel 1786, l'anatomista francese Vicq d'Azyr Félix, riporta e descrive per la prima volta l'area del mesencefalo che oggi chiamiamo substantia nigra (SN) ("j'appellerai cete espace tache noire ou locus niger crurum cerebri") [160]. Durante i primi studi di Scherer nel 1939 su uomo e primati, la melanina contenuta nel cervello viene macroscopicamente localizzata per il colore marrone scuro in preparazione istologiche non colorate o trattate semplicemente con ematossilina/eosina o colorazione di Nissl [161]. Successivamente, importanti indagini furono svolte negli anni '50 da Lillie che chiamò "neuromelanina" (NM) il pigmento presente nella SN, identificandone le caratteristiche tipiche delle melanine [162]. Questi e altri studi rivelarono che la NM è insolubile in solventi organici e che può essere degradata per mezzo di elevato potere ossidante utilizzando idrossido di idrogeno. La marcatura della NM con "silver stain" (argento) e quindi la capacità di ridurre soluzioni ammoniacali all'argento ha dimostrato che la NM contiene gruppi che possono essere reversibilmente ossidati a chinoni. Inoltre è stato dimostrato che la NM può ridurre il ferrocianuro ferrico (reazione di Shmorl) rilevando le sue capacità chelanti che ne permettono il legame con  $Fe^{2+}$ . Infine Lillie osservò che la NM non reagisce con acido periodico secondo la reazione di Schiff, dimostrando l'assenza di elevati livelli di gruppi aldeidici tipici degli zuccheri all'interno del pigmento [162–164].

Le prime indagini svolte attraverso tecniche chimico-analitiche (spettroscopia infrarossa (IR)) furono svolte nel 1966 da Bonner e Duncana con l'utilizzo di NM isolata da SN [165]. Van Woert studiò in seguito la NM da SN con risonanza paramagnetica elettronica (EPR), IR, spettroscopia UV e microscopia a fluorescenza per caratterizzare questo particolare pigmento e per confrontarlo con altre melanine e con le lipofuscine [166]. Le analisi EPR dimostrarono che la NM presenta specie radicaliche analogamente a quanto osservato per le altre melanine. Gli spettri IR mostrarono più similarità tra la NM e melanine sintetiche preparate con catecolamine che con melanine isolate dalla pelle o sintetizzate a partire da DOPA. Questi primi studi, sebbene svolti utilizzando NM isolata con metodi rudimentali, suggerirono le catecolamine cerebrali (dopamina) come probabili precursori di questo pigmento.

Le prime immagini di microscopia elettronica della NM furono svolte nel 1964 da D'agostino e Luse [167]. Venne riportata l'osservazione di tipici granuli di NM (che oggi chiamiamo organelli di NM, vedi 1.3.3) descritti da Duffy e Tennyson come "corpi di forma irregolare, con struttura complessa a lobuli, contenente quantità variabili di materiale denso e strutture simili a vacuoli" [168]; le strutture simili a vacuoli vennero inoltre descritte come probabile componente lipidica suggerendo che la struttura dell'organello si avvicina di più a quella delle lipofuscine piuttosto che a quella dei melanosomi. Durante gli anni che seguirono, con l'importante contributo di Barden, Marsden e Graham, continuò l'interesse per la NM e la maggior parte degli studi venne svolta soprattutto con l'uso di tecniche istologiche [46], [169–171].

Negli anni '80, due studi riportati da Mann e Yates, e da Agid e collaboratori, suggerirono la possibilità che la vulnerabilità dei neuroni della SN durante la malattia di Parkinson fosse dovuta alla NM contenuta al loro interno [172], [173]. In seguito a queste osservazioni, numerosi gruppi di ricerca si concentrarono sullo studio della NM, soprattutto approfondendone la composizione e gli aspetti chimico-strutturali.

#### **1.4.2 Composizione, struttura e caratteristiche della NM**

*Sebbene Zecca e collaboratori abbiano riportato la caratterizzazione di NM isolate da molte regioni del cervello umano [174], per molti anni, ciò che la comunità scientifica conosceva del pigmento di NM era sostanzialmente dovuto agli studi svolti sul pigmento isolato dalla SN. Per semplicità, in questa sezione verranno descritti li aspetti chimici e le proprietà della NM isolata da SN. In una sezione successiva (sez.1.4.4) verrà riportato un breve riepilogo delle NM isolate dalle altre regioni del cervello.*

La NM osservata al microscopio elettronico appare come un materiale molto elettrone-denso collocato all'interno di particolari organelli circondati da membrana e contenenti quelle che oggi conosciamo come componenti lipidiche (corpi lipidici) e componenti proteiche (vedi sez 1.4.3). Negli ultimi vent'anni la maggior parte della ricerca si è concentrata soprattutto sul pigmento di NM isolato da SN con una procedura sviluppata da Zecca e collaboratori nel 1992<sup>a</sup> [175].

##### **1.4.2.1 Caratteristiche melaniche della NM**

Una delle principali evidenze sperimentali che dimostrano che la NM possiede caratteristiche melaniche è il segnale EPR tipico dei radicali liberi stabili [176–179]. Un altro metodo spesso utilizzato per lo studio della NM è l'analisi dei prodotti derivati dalla sua degradazione chimica confrontati con i prodotti derivati da altre melanine o da melanine sintetiche di cui si conoscono i precursori. Diversi risultati riportati da Rosengren e Ito durante gli anni '90 si rilevarono controversi riguardo la presenza di feomelanina e quindi di cisteina-derivati nella NM [180–183]. In seguito, esperimenti di degradazione chimica con permanganato di potassio (KMnO<sub>4</sub>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e con acido iodidrico (HI) svolti da Ito e Wakamatsu confermarono che la NM è costituita sia da eumelanine sia da feomelanine in rapporto 3:1 [184]. L'analisi elementare della NM estratta da SN indica infatti un'elevata quantità di zolfo (2,5 – 2,8 %) in accordo con la presenza di cisteina-derivati [175], [183], [185].

##### **1.4.2.2 Struttura tridimensionale**

Il pigmento di NM osservato da Bush e Zecca con l'utilizzo di microscopia a forza atomica (AFM) e microscopia elettronica a scansione (SEM) ha rivelato una struttura formata da aggregati sferici di circa 30 nm di diametro [186]. Contestualmente a questo esperimento, l'impiego di microscopio ad emissione di fotoelettroni (PEEM) accoppiato a laser ad elettroni liberi (FEL) ha permesso di misurare il potenziale soglia di ossidazione della superficie delle strutture da circa 30 nm che compongono la NM. Confrontando questi segnali con quelli tipici di altre melanine più semplici è stato possibile affermare che la superficie di ogni particella da circa 30 nm è costituita da eumelanina e che la parte interna ("core") è invece costituita da feomelanina.

<sup>a</sup> Il protocollo standard utilizzato per isolare la NM prevede l'omogeneizzazione del tessuto, centrifugazioni con incubazioni in acqua, tampone fosfato, surfattante sodio dodecil solfato (SDS), proteasi k. Successivamente il pigmento viene sottoposto ad estrazioni con metanolo ed esano

Analisi con scattering di raggi-X hanno poi dimostrato che all'interno della struttura della NM sono misurabili segnali corrispondenti a regioni ordinate all'interno di una struttura amorfa [174], [187]. La struttura ordinata potrebbe suggerire che la stratificazione derivi dalla sovrapposizione degli anelli aromatici derivati dal di-idrossiindolo (DHI) e da residui benzotiazinici come avviene per altre melanine. La distanza misurata è però di circa 4.7 Å, maggiore di quella osservata in altre melanine (sintetiche o naturali) per le quali la distanza è compresa nell'intervallo 3.45 – 3.75 Å. La distanza di 4.7 Å osservata per la NM coincide quella tipica dei foglietti-β delle fibrille amiloidi costituite da proteine [188]. Questo dato suggerisce che la struttura ordinata che costituisce il pigmento di NM potrebbe derivare dall'aggregazione (fibrillare) di proteine dalle quali potrebbe originare l'aggregazione della parte melanica che costituisce il pigmento finale [174]. Questo sarebbe anche in accordo con la struttura delle particelle di NM costituite da un core feomelanico (presenza di cisteina) e da una superficie eumelanica. Questo è uno degli aspetti dai quali deriva l'interesse verso la componente proteica della NM (vedi sez 1.4.2.5) indagata a fondo in questo lavoro di tesi.

*Come già accennato, oltre che dalla componente melanica, la NM è costituita da una componente alifatica e da una componente peptidica/proteica. Diverse analisi dimostrano la presenza di queste componenti nonostante la procedura di isolamento utilizzata comunemente comprenda passaggi drastici per la rimozione di molecole aspecifiche attraverso l'uso di proteinasi k ed estrazioni con solventi organici.*

#### **1.4.2.3 Componente alifatica**

Nel 1992, è stata descritta per la prima volta la componente alifatica della NM isolata con l'impiego di spettrometria IR, pirolisi accoppiata a gascromatografia-spettrometria di massa (pirolisi GC/MS) e analisi elementare [175]. Successivamente questi dati sono stati confermati attraverso il confronto tra spettri IR della NM e di melanine modello [185]. Analisi di risonanza magnetica nucleare (<sup>13</sup>C) allo stato solido (<sup>13</sup>C –NMR) [189] e più recenti esperimenti di pirolisi GC/MS [190] hanno confermato che molecole lipidiche sono parte costitutiva del pigmento e che parte di queste sono certamente legate covalentemente al pigmento. Alcune più recenti indagini finalizzate a caratterizzare la componente lipidica sono state svolte attraverso cromatografia liquida-spettrometria di massa (LS/MS) e <sup>1</sup>H-NMR [191–194]. Questi studi, poiché necessitano di una fase liquida, sono stati usati per analizzare la porzione lipidica che viene estratta con solventi organici (metanolo ed esano) durante le ultime fasi dell'isolamento della NM; si parla in questo caso di lipidi “associati” o adsorbiti al pigmento anche se si è dimostrato che l'entità di questi lipidi sia la stessa di quelli legati covalentemente al pigmento. Le prime analisi LC/MS e <sup>1</sup>H-NMR sulla miscela di lipidi estratta da NM rilevarono la presenza predominante di una classe di lipidi con elevato peso molecolare, numero elevato di legami insaturi, bassa quantità di ossigeno e bassa volatilità [192]. Successive caratterizzazioni hanno assegnato a questi segnali le molecole di dolicolo definendola come classe di lipidi più rappresentata nella NM (14% del peso totale del pigmento isolato) insieme a quantità molto inferiori di altre classi di lipidi tra cui fosfolipidi, solfatidi e sfingolipidi [193]. In aggiunta, all'interno della NM sono stati identificati e quantificati gli acidi dolicoici, composti derivati dall'ossidazione dei dolicoli [194].

#### **1.4.2.4 Dolicoli**

I dolicoli sono una particolare classe di isoprenoidi a catena lunga (contenenti tipicamente da 14 a 20 unità isopreniche) che, sottoforma di dolicol-fosfato, sono importanti per la glicosilazione delle proteine [195]. Il ruolo delle molecole di dolicolo libero (forma alcolica) osservata nei nostri campioni non ancora stato chiarito [196]. Ciò che è stato dimostrato è l'effetto delle molecole di dolicolo libero (e del dolicol-fosfato) sulle proprietà fisiche delle membrane biologiche. Queste molecole sono capaci di destabilizzare la struttura delle membrane e di aumentarne la fluidità [197], di mediare la curvatura [198] e di stimolare la fusione di vescicole e di microsomi [199]. Altri studi indicano proprietà antiossidanti dei dolicoli [200] e un incremento (fino a 100 volte) delle quantità di dolicoli nel cervello durante l'invecchiamento [201]; sono infatti stati proposti come marcatori dell'invecchiamento [202]. Purtroppo, nonostante queste osservazioni, pochissimi studi recenti prendono in considerazione i dolicoli all'interno di studi che descrivono la composizione lipidica delle membrane e degli organelli intracellulari. Sappiamo da studi condotti negli anni '80 che i dolicoli sono presenti, oltre che nel reticolo endoplasmatico e nelle vescicole del Golgi, anche in molte altre membrane cellulari ma soprattutto e nei lisosomi, sia a livello della membrana che a livello del lume [195].

#### **1.4.2.5 Componente peptidica**

La presenza di una componente amminoacidica all'interno del pigmento di NM isolato è stata dimostrata con certezza solo nell'ultimo decennio, parallelamente alla caratterizzazione della componente alifatica. Nel 1999 Zecca e collaboratori, osservarono bande tipiche delle proteine negli spettri IR della NM isolata e identificarono aminoacidi nella NM isolata da *substantia nigra* [185]. In seguito gli stessi autori ottimizzarono il metodo di isolamento della NM e ripeterono analisi dettagliate degli aminoacidi e analisi IR al fine di escludere la possibilità che le componenti peptidiche (e alifatiche) provenissero dall'interazione della componente melanica con il tessuto durante la procedura di isolamento [191], [192]. È stato così dimostrato che la NM contiene una componente peptidica pari a circa il 15% del peso totale e che questa non viene rimossa nonostante la procedura di isolamento del pigmento comprenda passaggi in sodio dodecil solfato e proteasi k. E' stato inoltre osservato che sia l'impiego di proteasi k sia l'impiego di altre proteasi differenti non riesce ad eliminare tutta la componente amminoacidica ma solo una parte di essa, circa il 40%. Si ipotizza che la componente peptidica derivi da proteine contenute all'interno della complessa struttura melanica e che queste siano difficilmente raggiungibili dall'enzima. Inoltre sembra probabile che alcune catene polipeptidiche siano legate covalentemente alla melanina, ad esempio attraverso la formazione di legami covalenti tra cisteina e dopamina o derivati [190].

Recentemente è stata svolta un'analisi proteomica di granuli di NM isolati da tessuto congelato dimostrando la presenza di 72 proteine appartenenti alla soprattutto alla classe delle proteine lisosomiali [203] (vedi sez 1.4.3).

#### **1.4.2.6 Interazione della NM con il ferro e altri metalli**

Il Ferro (Fe) oltre ad essere il cofattore di molti enzimi e proteine è coinvolto in processi cellulari tra cui il trasporto, l'accumulo, l'attivazione e la trasformazione dell'ossigeno, il trasporto di elettroni e altre importanti funzioni metaboliche (vedi reviews [7], [204]). Nelle cellule il ferro non si trova in una forma libera ma è

sempre legato e trasportato da specifiche proteine e complessi. Il ferro che non è legato a eme-proteine è per la maggior parte legato alla ferritina. La ferritina è una proteina capace di legare e accumulare il Fe ed è costituita da 24 subunità che formano una struttura capace di accogliere grandi quantità di Fe in una forma solubile, non tossica e bio-disponibile [205]. Le subunità che costituiscono la ferritina sono di due tipi e con differenti funzioni: ferritina H (heavy, catena pesante) e ferritina L (light, catena leggera). La ferritina H possiede un centro che funziona da perossidasi e che catalizza una veloce ossidazione del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . La ferritina L non possiede attività enzimatica ma sembra avere una funzione nel legame e nell'accumulo di atomi di ferro in modo stabile e duraturo. Eteropolimeri di ferritina ricchi di catene H sono associati alla risposta a stress ossidativo o di accumulo, quelli ricchi in catene L sono invece associati all'accumulo di Fe. La ferritina può contenere queste due catene in diverse proporzioni a seconda della funzione che deve svolgere [205]. Nel cervello umano gli oligodendrociti<sup>a</sup> sono le cellule che principalmente contengono ferro (ferritina) in condizioni normali [206]. Per contro, anche i neuroni e la microglia esprimono ferritina indicando la capacità che hanno queste cellule di accumulare Fe; gli astrociti invece sembrano esprimere bassi livelli di ferritina [207]. Gli oligodendrociti esprimono entrambe le catene H e L in simile quantità, le cellule della microglia esprimono soprattutto ferritina L e i neuroni esprimono soprattutto ferritina H, anche se in generale, la quantità di ferritina osservata è molto inferiore a quella degli oligodendrociti [207]. Durante l'invecchiamento la quantità di ferritina tende ad aumentare in alcune aree cerebrali [208], [209]; studi sulla SN dimostrano che sia la ferritina L che la ferritina H crescono in modo lineare con l'aumentare dell'età sebbene la ferritina H sia presente in concentrazioni maggiori rispetto alla ferritina L [210], [211].

Fin dai primi studi di spettroscopia EPR svolti da Zecca e Swartz nel 1993 sulla NM isolata da SN è emersa l'elevata affinità di questo pigmento verso il Fe e altri metalli tra cui zinco (Zn), rame (Cu), manganese (Mn), cromo (Cr), cobalto (Co), mercurio (Hg), piombo (Pb) e cadmio (Cd) [212], [213]. La NM è ritenuta il sito di maggior accumulo di Fe nella SN [214]. Negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi per meglio comprendere l'interazione del Fe con la NM umana e quella sintetica. Sia la NM umana sia quella sintetica (derivata dalla DA) hanno dimostrato di legare il Fe con una cinetica a saturazione e di avere lo stesso numero di siti a bassa e ad alta affinità per questo metallo [215]. Tuttavia la NM umana ha dimostrato un'affinità per il Fe circa 10 volte superiore a quella misurata per la melanina sintetica [216], probabilmente per la maggiore capacità di legare il Fe nei siti ad alta affinità. Fondamentali analisi di Mossbauer, svolte da Gerlach nel 1995, hanno permesso di studiare le differenze strutturali dei complessi del Fe nella NM e in melanine sintetiche dimostrando una più elevata capienza nei siti di legami della NM. Nello stesso studio è stato dimostrato che il Fe legato alla parte polimerica della NM si trova nello stato di ossidazione  $\text{Fe}^{3+}$  e che i siti di legame sono arrangiati in una forma Fe-ossi-idrossido simile a quella osservata all'interno della ferritina [216]. Ulteriori informazioni derivate da spettroscopia EPR dimostrano che il  $\text{Fe}^{3+}$  si lega alla NM in configurazione ottaedrica [176]. Analogamente, anche di studi spettroscopia di assorbimento a raggi X e di

---

<sup>a</sup> *Gli oligodendrociti, insieme ad astrociti, cellule microgliali, ependimociti e altre cellule minori fanno parte delle cellule della glia che costituiscono il tessuto nervoso assieme ai neuroni. Le cellule della glia hanno il ruolo di apportare nutrimento, protezione, sostegno e isolamento ai neuroni.*

spettroscopia IR dimostrano che il  $\text{Fe}^{3+}$  nella NM si lega ai gruppi  $-\text{OH}$  dei derivati fenolici in una configurazione ottaedrica [185], [217]. Studi di spettroscopia EPR condotti sulla NM isolata e sul tessuto intatto hanno dimostrato che la NM in condizioni fisiologiche non è completamente saturata di Fe, che quindi possiede un'ulteriore capacità chelante e che la NM isolata mostra un segnale di Fe più intenso che la NM analizzata nel tessuto [210]. Questa osservazione rende necessario considerare che, data l'alta affinità della NM verso il Fe e data la procedura di isolamento che si svolge solitamente attraverso omogeneizzazione del tessuto (SN) in toto, il Fe misurato nella NM isolata non corrisponde a una misura reale ma ad una sovrastima del valore vero.

Recentemente Bohic e Double hanno svolto uno studio di "intracellular imaging" su SN con l'impiego di microscopia chimica ai Raggi X derivati da luce di sincrotrone [213]. Con questa tecnica hanno potuto misurare in situ la concentrazione di vari metalli, incluso il Fe, in tessuti di diverse età. In questo modo è stato possibile misurare e caratterizzare il Fe direttamente nel tessuto eliminando i problemi legati al Fe che si lega alla NM durante l'isolamento. Da questi studi è stato confermato che il segnale del Fe coincide con la porzione pigmentata del neurone, che il Fe si accumula in modo lineare durante lo sviluppo e l'invecchiamento e che, contrariamente, il segnale del Fe nel tessuto extraneuronale cresce durante lo sviluppo per poi decrescere lentamente durante l'invecchiamento. Inoltre, anche in questo caso, è stato osservato che la quantità di Fe misurata nella NM isolata è superiore a quella misurata nella NM direttamente nel tessuto.

Indagini istologiche svolte da Zecca e collaboratori nel 2004 per descrivere la presenza e distribuzione della ferritina e del ferro in neuroni della SN di soggetti anziani, dimostrano che segnali corrispondenti alla ferritina e a Fe libero e non chelato da proteine (colorazione di Perls) sono elevati in oligodendrociti, deboli in neuroni non contenenti NM e praticamente assenti in neuroni contenenti NM [210]. Da queste osservazioni e dalle informazioni sulla capacità chelante della NM, gli autori hanno suggerito che nei neuroni pigmentati il Fe viene legato e trattenuto dalla NM invece che dalla ferritina come avviene per gli altri neuroni. Contrariamente a questi dati, altri studi svolti nel 2009 da Tribl e collaboratori riportano la presenza di Ferritina L in campioni di organelli di NM isolati da tessuto congelato attraverso studi di analisi di proteomica, western blot e immuno microscopia elettronica [218]. Secondo gli autori ciò dimostrerebbe che nella NM parte del Fe è accumulato come complesso con la Ferritina L, che tipicamente svolge la funzione di accumulo di Fe a lungo termine. Considerando che la presenza di Ferritina L è stata dimostrata in campioni di organelli di NM isolati da tessuto congelato non è facile escludere la possibilità che alcune molecole di ferritina si siano legate alla NM per affinità, come avviene per la NM isolata da tessuto. Questo sarebbe plausibile data l'abbondanza di ferritina L presente nelle cellule della glia. Riepilogando questi ultimi dati, non è ancora chiaro se il Fe presente nella NM sia solamente legato al pigmento stesso o se al suo interno siano presenti molecole di ferritina L.

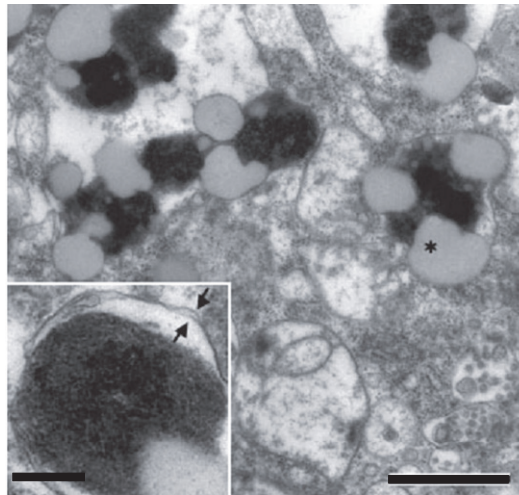
In ogni caso, sembrerebbe che la NM svolga un importante ruolo protettivo nel sequestro di Fe potenzialmente tossico per la cellula ma che allo stesso modo la possibile dispersione o disgregazione di NM possa comportare il rilascio di Fe nella cellula e nel tessuto [96], [219].

### 1.4.2.7 Interazione della NM con i composti organici.

La NM interagisce con un gran numero di composti organici non naturali come i pesticidi e altre molecole tossiche. Uno degli esempi più importanti è l'affinità della NM verso la neurotossina MPP<sup>+</sup> derivato dal metabolismo del MPTP (1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina) [220]. L'MPTP è una molecola diventata molto famosa per la sua neurotossicità particolarmente selettiva per i neuroni dopaminergici della SN e per la conseguente capacità di provocare sindromi simili alla malattia di Parkinson sia nell'uomo che negli animali [221], [222]. L'affinità per la NM verso la tossina MPP<sup>+</sup> e il suo sequestro selettivo all'interno dei neuroni contenenti NM è stata suggerita sia come possibile fattore di tossicità [223], [224] sia come che come fattore di protezione da morte neuronale [96]. Il paraquat, un potente erbicida con struttura molto simile ad un metabolita dell'MPTP, è una sostanza potenzialmente neurotossica e, analogamente al MPP<sup>+</sup>, si accumula nei neuroni contenenti NM e viene immobilizzato dalla NM stessa [225]. Anche l'affinità tra NM e paraquat è stata suggerita come possibile fattore di protezione per i neuroni pigmentati [226]. E' stato inoltre dimostrato che la NM può legare sostanze tossiche quali la clorpromazina, l'aloiperidolo e l'imiparina, modulandone la tossicità [227].

### 1.4.3 L' organello di NM

Per molti anni l'organello di NM è stato studiato a livello morfologico, attraverso l'osservazione in microscopia elettronica. Fin dai primi studi durante gli anni '60 [167], [168], [228] venne osservata una morfologia molto caratteristica e difficilmente riconducibile ad altri organelli conosciuti. Gli organelli di NM hanno dimensioni che vanno da 0.5 a 3.0  $\mu\text{m}$  e appaiono circondati da membrana, in alcuni casi da una doppia membrana tipica degli autofagosomi [174], [229] (fig. 1.10).



**Figura 1.10. Fotografie al microscopio elettronico di organelli di NM da cervello umano.** Gli organelli di NM presentano una componente molto elettronica-densa che rappresenta la NM e alcune gocce lipidiche (asterisco). Barra = 1  $\mu\text{m}$ . Nel riquadro viene riportato un organello di NM che presenta una doppia membrana (freccette) tipica dei vacuoli autofagocitici. Barra = 0,25  $\mu\text{m}$ .



All'interno degli organelli sono presenti 2 componenti distinguibili per la loro densità elettronica. In ogni organello si osserva: 1) il pigmento di NM riconoscibile perché molto elettrondenso (tendente al nero); 2) alcune gocce lipidiche distinguibili per la loro bassa densità elettronica, per la forma spesso sferica o comunque tondeggiante e per la loro affinità per l'osmio (tipica dei lipidi) che le rende di colore grigio opalescente. Si pensa che la presenza di una matrice con densità elettronica intermedia tra queste due componenti, distribuita solitamente in modo irregolare, sia attribuibile all'accumulo di proteine (fig. 1.10).

L'isolamento degli organelli di NM è stato riportato per la prima volta da Tribl e collaboratori nel 2005 [203]. La procedura di isolamento riportata dagli autori ha previsto l'utilizzo di tessuto postmortem congelato e al campione ottenuto dai passaggi di purificazione viene dato il nome di "granuli di NM". Più recentemente Zecca e collaboratori hanno messo a punto un metodo per l'isolamento di organelli di NM da tessuto postmortem non congelato e trattato entro 48h dal prelievo del tessuto autoptico [174]. Nello stesso articolo di Tribl viene riportato il primo profiling proteico della NM con l'identificazione di 72 proteine [203]. Questo primo lavoro di proteomica è stato svolto attraverso separazione monodimensionale delle proteine su gel SDS-PAGE e successiva separazione in nano-cromatografia liquida (nano-LC) accoppiata a spettrometro di massa (ESI-MS/MS). Da questi esperimenti sono state identificate molte proteine lisosomiali, proteine del traffico vescicolare e altre proteine coinvolte nel folding proteico. Non si sono osservate però proteine di sintesi della melanina tipicamente presenti nel melanosoma.

#### **1.4.4 Accumulo di NM nelle diverse aree del cervello e durante l'invecchiamento**

Per molti anni si è tradizionalmente parlato di NM facendo riferimento al pigmento presente nel mesencefalo, in particolare a livello dei neuroni della SN e del locus ceruleus (LC) [171], [176], [230]. Solo pochi studi hanno riportato neuroni contenenti pigmento nell'ipotalamo e nella parte inferiore del mesencefalo chiamata medulla oblongata [180], [231], nel cervelletto [232] e nei gangli spinali [233]. Solo nel 2008, Zecca e collaboratori riportano l'isolamento, la quantificazione e la caratterizzazione di NM isolata da putamen, corteccia premotoria e cervelletto di cervello umano [174]. Contestualmente riportano l'isolamento e la quantificazione di NM da nucleo caudato, globo pallido, corteccia occipitale, parietale e temporale. Considerando queste aree rappresentative della maggior parte del cervello si può dire che la NM è un pigmento ubiquitario del cervello umano. Con l'impiego di metodi spettrofotometrici per misurare la concentrazione assoluta di NM nel tessuto cerebrale, è stata misurata la concentrazione e l'accumulo di NM in SN [234], LC [235], putamen, corteccia premotoria e cervelletto [174] da soggetti di età differente (Fig. 1.11). I risultati di questi studi hanno dimostrato che la concentrazione di NM (rispetto alle proteine totali) cresce linearmente fin dai primi anni dello sviluppo e durante l'invecchiamento in tutte le regioni considerate. La concentrazione più alta di NM si osserva nella SN, di seguito le più alte concentrazioni sono rilevate in LC, corteccia premotoria, putamen, cervelletto. Riguardo alla prima comparsa di NM durante lo sviluppo, Foley e Baxter, nel 1958, studiarono 100 campioni di tessuto cerebrale prelevato da soggetti durante le prime fasi dello sviluppo e osservarono la presenza di NM in

SN in soggetti al diciottesimo mese di vita e la presenza di pigmento nel LC di feti al quinto mese di gestazione [230].

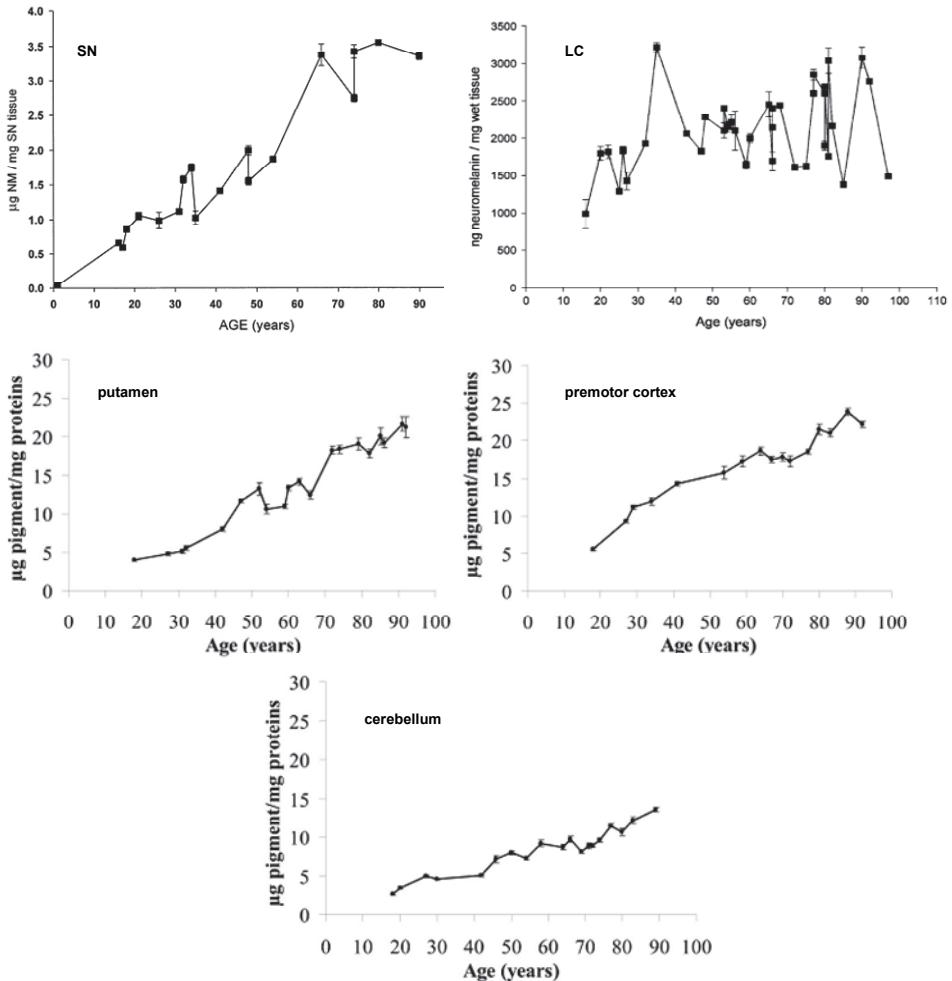


Figura 1.11. Rappresentazione dell'incremento delle concentrazioni di NM nelle diverse aree cerebrali del cervello umano durante l'invecchiamento. (modificato da Zecca et al 2004, 2008 [210], [174])

## 1.4.5 Ipotesi sulla biosintesi della NM e dell'organello di NM

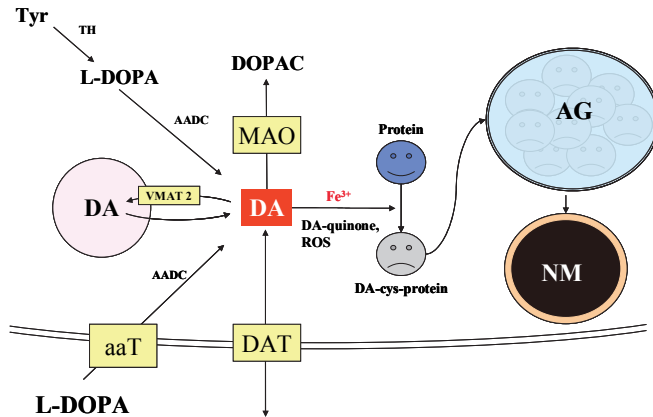
### 1.4.5.1 Formazione del pigmento di NM

La biosintesi della NM non è ancora chiarita del tutto ma le ipotesi più accreditate escludono che essa derivi dai pathway enzimatici tipici della sintesi delle melanine periferiche che prevedono come passaggio fondamentale l'ossidazione dell'aminoacido tirosina in dopachinone da parte dell'enzima tirosinasi. Sebbene due studi riportino la trascrizione del gene per la tirosinasi in SN umana [236], [237] ad oggi non è mai stata confermata la presenza dell'enzima tirosinasi all'interno dei neuroni pigmentati della SN umana [238]. Inoltre in individui albinici, che non

esprimono l'enzima tirosinasi e che quindi non possono sintetizzare melanina, è stata riportata la presenza di NM in SN a livelli paragonabili a soggetti non albini [230]. Negli anni passati molti enzimi sono stati suggeriti per avere un possibile ruolo nella sintesi della NM (perossidasi, prostaglandina H sintasi, fattore di inibizione della migrazione macrofagica) ma né la loro colocalizzazione con le aree cerebrali contenenti NM né la conferma del loro coinvolgimento in modelli cellulari hanno mai dato spazio a ipotesi chiare riguardo a una via enzimatica (riepilogo in [239]). La spiegazione più probabile e meglio verificata della formazione della NM all'interno dei neuroni è l'auto-ossidazione di catecolamine (dopamina nella SN) senza mediazione di specifici enzimi. Innanzitutto, è stata osservata nel cervello l'auto-ossidazione di dopamina a chinoni e la conseguente formazione di cisteina-derivati [240] e che melanine simili alla NM possono essere sintetizzate in vitro mediante l'auto-ossidazione della DA [176], [191], [192].

In seguito, uno studio fondamentale di Sulzer e collaboratori ha chiarito alcuni aspetti riguardo alla formazione di NM nei neuroni [95]. Negli esperimenti riportati, la sintesi di NM viene indotta in colture cellulari mesencefaliche di topo in seguito all'aumento di dopamina citosolica in seguito al trattamento con L-DOPA (precursore della dopamina). Analisi EPR hanno dimostrato che il pigmento prodotto in questo modello si è rivelato strutturalmente molto simile a quello presente nei neuroni della SN umana; inoltre indagini microscopiche hanno localizzato questo pigmento in organelli delimitati da una doppia membrana, proprio come osservato nel tessuto cerebrale. Questi organelli si formano quindi in risposta allo stress cellulare dovuto alla formazione di NM nel citosol e sembrano avere origine autofagica. In questo modello, la sintesi di NM è stata inibita dal desferal (desferrioxamina, 10  $\mu$ M), un potente chelante del Fe, indicando il coinvolgimento di questo metallo nell'ossidazione dei precursori citosolici durante la sintesi della NM. Inoltre la sintesi è stata inibita dall'over-espressione del trasportatore VMAT2 (vesicular monoamine transporter-2) che ha il compito di accumulare monoamine come la dopamina all'interno delle vescicole sinaptiche sequestrandole dal citosol [241]. Questo modello (figura 1.12) ha permesso di ipotizzare che la sintesi della NM può essere indotta da un eccesso di catecolamine citosoliche che non vengono accumulate nelle vescicole sinaptiche. Questo rafforza il ruolo citoprotettivo della NM in quanto la sua biosintesi impedisce l'accumulo citosolico di catecolamine, chinoni e addotti catecolici notoriamente citotossici [242].

Studi immunostochimici quantitativi effettuati su tessuti umani hanno misurato il contenuto di VMAT2 e dell'enzima tirosina idrossilasi (TH) in neuroni contenenti diverse quantità di NM [243]. E' stato osservato che esiste una relazione inversa tra i livelli di VMAT2 e la quantità di NM all'interno dei neuroni e una relazione diretta tra il contenuto di VMAT2 e quello di TH. Questi dati indicano che neuroni mesencefalici che sintetizzano elevate quantità di DA hanno anche la capacità di immagazzinarla nelle vescicole, mentre laddove la concentrazione di NM è più alta è perché i livelli di VMAT2 sono molto bassi. Queste osservazioni sono in linea con ciò che era stato ipotizzato nel modello di Sulzer secondo il quale la sintesi di NM è indotta da un eccesso di catecolamine citosoliche non accumulate nelle vescicole sinaptiche.



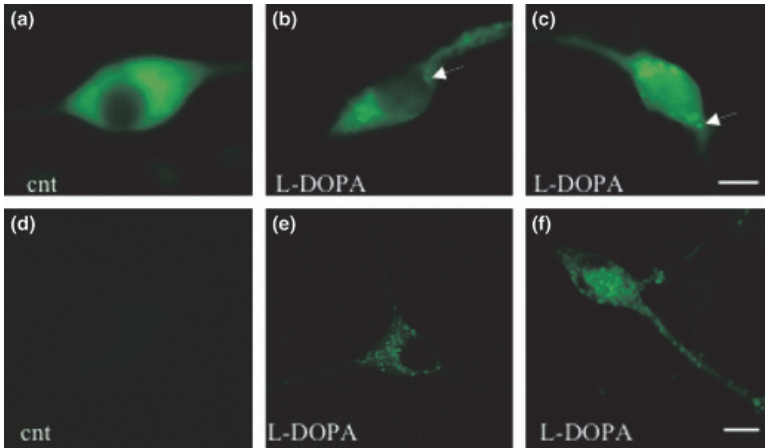
**Figura 1.12. Modello di biosintesi della NM nei neuroni dopaminergici della SN.** In condizioni normali l'enzima tirosina idrossilasi produce, a partire dall'aminoacido tirosina, la L-DOPA, la quale viene rapidamente convertita dall'enzima aminoacido aromatico decarbossilasi (AADC in figura) in dopamina (DA). Nel modello sperimentale di Sulzer et al [95], la L-DOPA, fornita in eccesso, viene trasportata nel neurone attraverso il trasportatore aminoacidico (aaT in figura). Una volta all'interno viene convertita anch'essa in DA tramite l'AADC. Ulteriore DA può essere accumulata mediante il trasportatore della DA (DAT). Infine può essere metabolizzata all'interno dei mitocondri dall'enzima monoamino ossidasi (MAO in figura) nell'acido 3–4–diidrossifenilacetico (DOPAC in figura) nel modello murino o in acido omovanillico (non riportato) nell'uomo. Se questi meccanismi non riescono a mantenere bassi i livelli di DA nel citosol, l'eccesso di DA può ossidarsi a chinoni e semichinoni con l'aiuto del Fe. Queste specie reattive possono reagire con i residui di Cys delle proteine formando degli addotti (DA–Cys–proteina) che sono indirizzati alla via degradativa venendo fagocitati dai vacuoli autofagici (AG in figura). Col passare del tempo questi accumuli non degradabili portano alla formazione di NM (modificato da Zucca et al. [239]).

#### 1.4.5.2 Formazione dell'organello di NM

Riguardo all'origine dell'organello di NM le ipotesi più recenti nascono contestualmente agli studi svolti da Sulzer e collaboratori sulla formazione della NM nel neurone e suggeriscono l'origine autofagica dell'organello [95]. Come già accennato, in cellule modello con elevata concentrazione di dopamina citosolica si è osservata la formazione di organelli contenenti NM e in alcuni casi è stata osservata la presenza di una doppia membrana tipica degli autofagosomi. Più recentemente, esperimenti preliminari hanno dimostrato che livelli elevati di L-DOPA in neuroni di substantia nigra in cultura portano all'aumento di marker tipici dei vacuoli autofagici (o autofagosomi)<sup>a</sup> [229]. In queste condizioni è stata osservata attraverso microscopia a fluorescenza la ridistribuzione della proteina LC-3 che dal citosol viene reclutata nella formazione delle membrane che circondando larghe porzioni di citosol e che danno forma a vacuoli autofagici (fig.1.13). Inoltre, nelle stesse condizioni, è stata osservato l'aumento del segnale

<sup>a</sup> per vacuolo autofagico si intende in modo generico un vacuolo derivato da fenomeni autofagici senza che sia specificata la sua fase di maturazione. Un vacuolo autofagico che non si è ancora fuso a lisosoma o endosoma si chiama autofagosoma; un autofagosoma che si è fuso con un lisosoma si chiama autofagolisosoma o auto lisosoma; un autofagosoma che si è fuso con un endosoma si chiama amfiosoma (riepilogo in [244])

della molecola monodansilcadaverina, marker lisosomatropico utilizzato per identificare la formazione di nuovi vacuoli autofagici [245]. Per un riepilogo sui meccanismi autofagici e la loro correlazione con la neurodegenerazione si rimanda al capitolo 1.1.



**Figura 1.13. Induzione della formazione di vacuoli autofagici (AV) con L-DOPA.** (a-c): culture neuronali (mesencefalo ventrale) derivate da topi transgenici per green fluorescent protein-LC3 (GFP-LC3). Nelle cellule controllo (a) il segnale GFP-LC3 è diffuso nel citosol, in cellule trattate per 48h con L-DOPA (b-c) si osserva il segnale concentrato nei vacuoli autofagici trattate con L-DOPA. (d-f): culture neuronali (mesencefalo ventrale) derivate da topi wild-type trattate con sola monodansilcadaverina (d) o anche con L-DOPA per 24h (e) o sette giorni (f). Modificato da Sulzer et al. [229].

## 1.4.6 Ruolo della NM: Neurodegenerazione, tossicità, protezione,

### 1.4.6.1 Correlazione tra pigmentazione e vulnerabilità neuronale

È nota fin dal 1895 la correlazione tra substantia nigra e la malattia di Parkinson [246]. La malattia di Parkinson e altre malattie extrapiramidali riportate come "Parkinsonismi" sono caratterizzate da disfunzioni motorie causate principalmente dalla morte dei neuroni dopaminergici della substantia nigra [43], [51]. Sebbene altre regioni del cervello siano colpite dalla malattia di Parkinson, la perdita dei neuroni della substantia nigra rimane ancora oggi uno delle più importanti caratteristiche istopatologiche di questa malattia. In aggiunta, il fatto che la presenza di NM sia la caratteristica più evidente dei neuroni della substantia nigra ha da sempre suggerito un possibile ruolo della NM nei meccanismi neurodegenerativi. Alcuni studi importanti svolti negli anni '80 hanno supportato tale ipotesi. Mann e Yates, confrontando il contenuto di NM in neuroni di soggetti sani e parkinsoniani osservarono che i neuroni che sopravvivono durante la malattia di Parkinson contengono circa il 15% di NM in meno rispetto ai neuroni di soggetti controllo; suggerirono quindi che i neuroni con un più elevato contenuto in NM muoiano più facilmente degli altri [172]. Agid e collaboratori osservarono che la percentuale di neuroni pigmentati presenti in diverse aree dopaminergiche del mesencefalo è correlata alla vulnerabilità neuronale di quelle stesse aree durante la malattia di Parkinson [173]. Analogamente osservarono che anche il contenuto di NM nei neuroni pigmentati è correlato alla loro vulnerabilità durante la malattia di

Parkinson [247]. Altri studi su scimmie trattate con MPTP (vedi sez.1.2.4.2) riportano una maggiore suscettibilità dei neuroni contenenti NM rispetto a neuroni non pigmentati [224].

Attraverso queste osservazioni è possibile affermare che la NM è un fattore implicato nella vulnerabilità dei neuroni della substantia nigra ma certamente non l'unico: infatti, soggetti in un range di età tipico per l'insorgenza del Parkinson presentano un numero elevato di neuroni contenenti un'elevata quantità di NM senza essere affetti da questa malattia per tutto il corso della vita. La malattia di Parkinson deriva infatti da un complesso insieme di cause che in modo articolato contribuiscono principalmente alla morte di alcuni neuroni pigmentati della substantia nigra [248] (vedi sez. 1.2.5). Ciò che possiamo descrivere della NM, sono le caratteristiche e le proprietà che sono state descritte come fonte di protezione o tossicità all'interno dei neuroni sottoposti a meccanismi neurodegenerativi.

#### **1.4.6.2 Possibile ruolo protettivo della NM**

Secondo il modello attualmente proposto, la sintesi di NM e la formazione dell'organello che la contiene avverrebbero in seguito all'auto-ossidazione di catecolamine (dopamina) a chinoni (dopamina-chinone) e al successivo sequestro dei tali composti all'interno di vescicole autofagiche [95]. Si ritiene che la formazione di NM sia perciò un fattore di protezione cellulare perché riduce i livelli di chinoni reattivi che, formandosi in condizioni fisiologiche nei neuroni catecolaminergici, potrebbero, se liberi nel citosol, generare tossicità all'interno della cellula [242]. In secondo luogo, la formazione di NM coinvolge specie potenzialmente tossiche come, per esempio il  $Fe^{3+}$  e addotti cysteina-dopamina; il loro sequestro all'interno della struttura della NM e all'interno dell'organello di NM sono un altro un fattore protettivo per il neurone [248]. È anche dimostrato in vitro che la NM umana, per la sua capacità di immobilizzare elevate quantità di Fe, anche in una forma poco reattiva, riesce a ridurre l'effetto di reazioni di Fenton (mediate dal Fe) che portano all'ossidazione della dopamina e dell'acido ascorbico. Inoltre la NM può legare e bloccare il radicale idrossile generato in presenza di Fe e idrossido di idrogeno attraverso reazione di Fenton [249]. Infine, la NM potrebbe svolgere un ulteriore ruolo protettivo per l'abilità di legare e immobilizzare grandi quantità di metalli potenzialmente tossici come Zn, Cu, Mn, Cr, Co, Hg, Pb, Cd, e neurotossine ambientali, in particolare il MPP+ e l'erbicida paraquat (vedi sez. 1.2.4.2) [96], [174].

#### **1.4.6.3 Possibile tossicità della NM**

Una delle ipotesi più recenti riguardo al possibile ruolo della NM riguarda il suo possibile coinvolgimento nei fenomeni infiammatori legati alla neurodegenerazione. I fenomeni infiammatori sono ad oggi ritenuti di fondamentale importanza all'interno dei processi neurodegenerativi e nella malattia di Parkinson [250], [251]. Tra le molecole infiammatorie capaci di provocare neurodegenerazione troviamo specie come il superossido, l'ossido nitrico (NO), chemochine e citochine prodotte dalla microglia (riepilogo in [252]). Consideriamo inoltre che due caratteristiche neuropatologiche della malattia di Parkinson sono la microgliosi e la presenza di NM extraneuronale a seguito della morte dei neuroni della SN [253]. Studi recenti hanno valorizzato l'ipotesi che parte della tossicità della NM sia dovuta alla sua capacità di indurre infiammazione nel sistema nervoso centrale. Studi in vitro su culture microgliali dimostrano che NM isolata da cervello umano attiva chemiotassi

tra le cellule e il rilascio di tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuchina-6 (IL-6) e NO [254]. Successivamente, studi in vivo hanno dimostrato che l'iniezione di NM umana in SN di ratti provoca reazione infiammatoria con attivazione microgliale e morte significativa di neuroni dopaminergici [255]. È stato osservato che cellule della microglia in cultura sono capaci di fagocitare e degradare la NM e sono stimulate a produrre perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), NO e fattori pro-infiammatori [256]. Alla luce di questi risultati la NM potrebbe contribuire all'instaurazione dei processi di infiammazione cronica nel PD [219]. Si pensa infatti che l'attivazione microgliale e l'induzione di fattori pro-infiammatori causati da rilascio di NM da parte dei neuroni che muoiono durante le prime fasi della malattia di Parkinson, possa danneggiare gli altri neuroni, i quali degenereranno rilasciando a loro volta altra NM, portando così ad un circolo vizioso di infiammazione e neurodegenerazione [219].

Altri aspetti che riguardano la tossicità della NM derivano da recenti studi *in vitro* che dimostrano che la NM inibisce l'attività del proteasoma 26S, suggerendo un possibile ruolo nell'alterazione del sistema ubiquitina-proteasoma riscontrato nei neuroni durante il PD [257]. Infine, in modo analogo a quanto detto riguardo al ruolo della NM in relazione con i fenomeni infiammatori, la morte neuronale e il rilascio di NM nello spazio extracellulare potrebbe fare in modo che le specie tossiche sequestrate dalla NM (Fe, altri metalli, neurotossine ambientali etc..) diventino in questo caso fonte di tossicità perché libere di agire contro altre cellule del sistema nervoso [96].



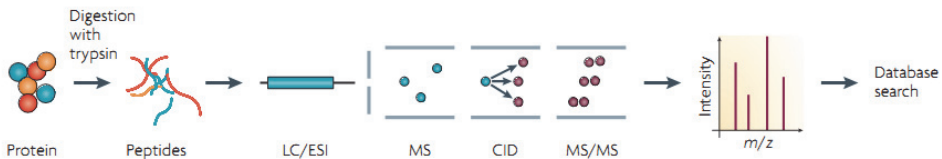


## 1.5 Tecnologie per l'analisi proteomica attraverso spettrometria di massa

Per lo svolgimento di questo lavoro di tesi abbiamo utilizzato la tecnologia proteomica MudPIT (multi-dimensional protein identification technology), recentemente sviluppata per l'analisi high-throughput (ad alte prestazioni) delle proteine in campioni biologici complessi. Riportiamo qui un breve riassunto delle caratteristiche e delle applicazioni delle tecnologie proteomiche più utilizzate concentrandoci soprattutto sul metodo MudPIT.

La genomica permette di ottenere il sequenziamento di tutti i geni contenuti in un organismo. La capacità di sequenziare l'intero genoma di un organismo è stata una dei più importanti traguardi del secolo scorso, soprattutto con l'ottenimento del sequenziamento dell'intero genoma umano [258]. La trascrittomica permette invece di conoscere e misurare i geni che vengono espressi in un organismo o in una cellula in un preciso momento attraverso lo studio del RNA messaggero [259]. In molti casi però, sono le proteine che agiscono a livello cellulare come enzimi, componenti strutturali, molecole segnale e altro ancora. La proteomica è la scienza che studia tutte le proteine di una certa entità biologica (organismo, cellula, compartimento cellulare), la loro quantificazione, localizzazione ed eventuali modificazioni [260].

La spettrometria di massa (MS) è tutt'oggi il metodo più completo e versatile per l'identificazione di proteine su larga scala [261]. I metodi maggiormente utilizzati per l'analisi proteomica attraverso MS prevedono la separazione delle proteine o dei peptidi contenuti nel campione, la loro ionizzazione, l'analisi allo spettrometro di massa e l'elaborazione dei dati (un esempio è riportato in figura 1.14).



**Figura 1.14. Rappresentazione schematica di un approccio di proteomica attraverso MS.**

In questo esempio campione viene digerito con tripsina, di seguito la miscela di peptidi viene separata attraverso cromatografia liquida (LC) e i peptidi vengono ionizzati attraverso sorgente di ionizzazione a elettrospray (ESI). Di seguito, il rapporto massa su carica ( $m/z$ ) viene misurato in un primo analizzatore (MS). Attraverso la collisione indotta dei peptidi (CID) avviene la frammentazione degli stessi e la misurazione del rapporto  $m/z$  dei frammenti che ne derivano (MS/MS). L'insieme dei dati  $m/z$  viene elaborata per ottenere la sequenza amminoacidica dei peptidi analizzata e per identificare le proteine contenute nel campione (modificata da Gstaiger et al 2009 [262]).

I due metodi che parallelamente sono tutt'oggi utilizzati maggiormente per l'analisi proteomica si distinguono fondamentalmente per i metodi di separazione prima dell'analisi MS. I due metodi sono definiti "gel based" e "gel free", a seconda che, rispettivamente, prevedano o meno l'uso di gel elettroforesi (vedi sez. successiva 1.5.1). Entrambi i metodi sono spesso utilizzati con strategia "bottom-up": tutte le proteine contenute nel campione ("gel-free") o un numero ristretto di proteine separate per gel elettroforesi ("gel-based") vengono digerite con enzimi proteolitici

e i peptidi che si ottengono vengono successivamente separati, ionizzati e analizzati attraverso MS per identificarne la sequenza.

### **1.5.1 Metodi di separazione**

L'efficienza dell'analisi proteomica è strettamente legata ai metodi di separazione necessari per semplificare la complessità della miscela. Il metodo di elettroforesi bidimensionale in gel di poliacrilammide (2D PAGE) è il metodo "gel based" storicamente più utilizzato [263]. Le proteine (o piccoli gruppi di proteine) vengono separate per elettroforesi, vengono poi prelevate le bande corrispondenti a ogni proteina/e e sottoposte a digestione enzimatica. Di seguito la miscela di peptidi viene analizzata attraverso MS, solitamente attraverso ionizzazione di tipo MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) e spettrometri basati su tecnologia TOF (time of flight) [264]. Riguardo a questo metodo rimandiamo alla lettura di alcune review [265], [266] per dedicarci in particolare ai metodi "gel free" come quello utilizzato in questo lavoro di tesi.

#### **1.5.1.1 Separazione in HPLC**

Ciò che caratterizza i metodi "gel free" è invece la separazione delle proteine attraverso in fase liquida attraverso HPLC (high-pressure liquid chromatography) che sostituisce la 2D PAGE. Se i metodi "gel based" prevedono che l'analisi delle proteine avvenga in un momento diverso dalla loro separazione ("off-line"), ciò che caratterizza i metodi di separazione "gel free" è invece l'accoppiamento diretto ("on-line") tra la separazione dei peptidi in HPLC e lo spettrometro di massa, solitamente mediata da una sorgente ESI (electrospray ionization) che prevede la ionizzazione dei peptidi da una soluzione liquida (vedi sez. 1.5.3) [261].

La separazione in HPLC può essere svolta in diversi modi ma i più tipici sono quelli che usano colonne in fase inversa (RP) e a scambio ionico (SCX). Nelle colonne RP il campione passa attraverso resine dove i peptidi vengono separati a seconda della loro idrofobicità [267]. Queste colonne permettono elevata risoluzione, efficienza e riproducibilità, inoltre, hanno il vantaggio di utilizzare come fase mobile solventi compatibili con la ionizzazione ESI. Nelle colonne SCX i peptidi vengono invece separati per il loro punto isoelettrico a seconda della concentrazione salina della fase mobile utilizzata.

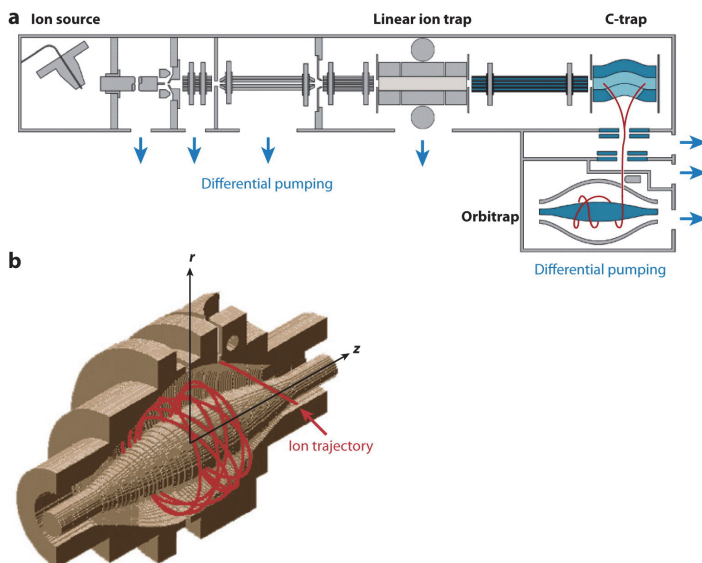
#### **1.5.1.2 Separazione multidimensionale**

Recentemente, i metodi di separazione più avanzati sono quelli con approcci multidimensionali [268]. L'analisi proteomica di tessuti, cellule e organelli dove le proteine vengono digerite contemporaneamente genera un numero enorme di peptidi con caratteristiche simili e una complessità elevata del campione da analizzare. L'approccio multidimensionale utilizza più metodi di separazione HPLC in contemporanea per aumentare la risoluzione di miscele così complesse. Ad esempio il metodo MudPIT (utilizzato per questo lavoro di tesi) utilizza l'accoppiamento di una colonna SCX e di una colonna RP [269]. La miscela complessa delle proteine digerite enzimaticamente viene iniettata in una colonna SCX e separata in diverse frazioni attraverso concentrazioni saline crescenti. Ogni frazione così separata viene poi iniettata in una colonna RP per subire un'ulteriore separazione ed essere di seguito iniettata direttamente nello spettrometro di massa dove i peptidi vengono ionizzati attraverso ionizzatore ESI (vedi sez. 1.5.3).

### 1.5.2 Analisi della massa

L'analizzatore della massa è parte integrante dello spettrometro di massa in quanto permette di separare gli ioni in base al loro rapporto tra massa e carica ( $m/z$ ). Alcuni analizzatori separano gli ioni per la loro frequenza di risonanza (trappole ioniche (IT), Orbitrap), altri per la stabilità del rapporto  $m/z$  (quadrupoli (Q)), altri per il loro tempo di volo dopo essere stati accelerati da un campo elettrico (time of flight (TOF) [270], [271]). Gli spettrometri di massa più avanzati sono ibridi perché costruiti accoppiando diversi analizzatori di massa contemporaneamente.

La tecnologia MudPIT utilizza uno spettrometro di massa ibrido LTQ-Orbitrap che associa una trappola a quadrupolo lineare (LTQ) a una trappola orbitale (Orbitrap) [272] (fig.1.15). Un quadrupolo è composto da quattro barre alle quali viene applicato un campo elettrico che costringe gli ioni a percorrere una traiettoria oscillante diversa a seconda del rapporto  $m/z$  degli ioni. Regolando il campo elettrico è possibile separare e selezionare gli ioni con uno specifico rapporto  $m/z$ . La trappola ionica Orbitrap trattiene gli ioni all'interno di un campo elettromagnetico statico dove questi ruotano intorno a un elettrodo centrale oscillante; gli ioni vengono poi liberati selettivamente al variare dell'intensità del campo elettrico in base al loro rapporto  $m/z$  (fig. 1.15). Lo strumento ibrido LTQ-Orbitrap permette di associare la velocità e la sensibilità del LTQ con l'elevata risoluzione e accuratezza dell'Orbitrap. Inoltre i due analizzatori lavorano in parallelo: l'Orbitrap può acquisire il segnale massa/carica dell'intero peptide ("full-scan MS"), mentre l'analizzatore LTQ provvede contemporaneamente alle reazioni di frammentazioni attraverso collisione indotta del peptide (CID) per identificarne la sequenza aminoacidica ("MS/MS o MS<sup>n</sup> scans").



**Figura 1.15. Schema dello spettrofotometro LT-Orbitrap sviuppato da Thermo Scientific.** (a) Diagramma riassuntivo delle componenti del pettrofoometro; (b) sezione dell'analizzatore orbitrap (modificato da [261]).

### **1.5.3 Ionizzazione**

Affinché i peptidi vengano analizzati all'interno dello spettrometro di massa è necessario che vengano ionizzati in una fase gassosa. I peptidi sono specie polari, non volatili e termicamente instabili, richiedono quindi particolari tecniche di ionizzazione, le più utilizzate sono la MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) e la ESI (electrospray ionization) [261].

#### **1.5.3.1 MALDI**

Questo metodo di ionizzazione prevede che il campione venga assorbito su di una matrice che solitamente possiede un carattere acido [273]. Successivamente, una sorgente laser che colpisce la matrice provoca il desorbimento (evaporazione) del campione sottoforma di ioni carichi positivamente in una fase gassosa. Nella maggior parte dei casi questa tecnica di ionizzazione è accoppiata a un analizzatore tipo TOF.

#### **1.5.3.2 ESI**

Diversamente dal metodo MALDI, la sorgente di ionizzazione ESI produce ioni da una soluzione liquida. La ionizzazione è dovuta ad un elevato voltaggio (2-6 kV) applicato tra un ugello dal quale fuoriescono i peptidi derivati dalla piattaforma di separazione (HPLC) e l'apertura che permette l'accesso all'interno dello spettrofotometro. In questa fase si forma uno spray elettricamente carico (cono di Taylor) e la formazione e la desolvatazione di piccole gocce di solvente contenenti ioni carichi. La formazione di questo fenomeno è dovuta al riscaldamento del capillare che emette la miscela di peptidi e, in certi casi, da un flusso di gas laminare verso il foro di ingresso dello spettrofotometro. Un importante sviluppo delle tecnologie ESI deriva dall'introduzione delle tecniche di micro-ESI e nano-ESI [274], [275] che, accoppiate con metodi di separazione in colonne nano-RP, portano a flussi spray ridotti a nanolitri al minuto con l'ottenimento di una più elevata sensibilità.

## 2 SCOPO

Lo scopo di questa tesi è la caratterizzazione proteomica dell'organello di neuromelanina (NM) della substantia nigra umana con l'obiettivo di comprenderne l'origine, la composizione e il ruolo all'interno del neurone.

Sebbene si sia compreso molto della struttura e del ruolo della neuromelanina all'interno del neurone, non sono stati ancora chiariti i meccanismi di formazione, di accumulo e di eventuale degradazione di questo pigmento e dell'organello che lo contiene. In aggiunta, è ancora da chiarire la forte relazione tra la neuromelanina e le importanti porzioni lipidiche caratteristiche degli organelli che la contengono.

L'ottenimento di maggiori informazioni riguardo alle proteine e agli enzimi che costituiscono questo organello sono un punto di partenza per comprendere i meccanismi di formazione della NM e per capire il modo con cui il neurone reagisce alla formazione di questo particolare pigmento. Inoltre, essendo ben nota la correlazione tra l'accumulo di materiale intracellulare, l'invecchiamento e le malattie neurodegenerative, è nostro interesse capire quali caratteristiche rendano l'organello di NM in grado di proteggere o danneggiare in neuroni, considerando soprattutto che la NM si forma principalmente nella substantia nigra, l'area maggiormente colpita dalla malattia di Parkinson.

Abbiamo scelto di caratterizzare l'organello analizzando tre campioni ottenuti con metodi diversi. Sono stati analizzati il pigmento di NM isolato direttamente da tessuto omogeneizzato, l'organello di NM integro e l'organello di NM trattato con shock termico per la rimozione delle membrane. È stata scelta una strategia di analisi su più fronti al fine di identificare un maggior numero di proteine, per distinguere la loro localizzazione nell'organello e per diminuire il rischio di falsi positivi.

Uno dei punti critici di questo tipo di studio è l'ottenimento dei campioni da tessuti cerebrali umani *post-mortem*. Questa condizione implica innanzitutto la scarsità delle quantità di campione da analizzare e la difficoltà nell'ottenere organelli di NM integri in conseguenza alla normale degradazione del tessuto *post-mortem*.

Per l'analisi dei campioni è stata quindi scelta la tecnologia proteomica MudPIT che permette un'elevata sensibilità che consente di identificare un numero elevato di proteine anche se in bassa concentrazione.



## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 *Prelievo e dissezione dei tessuti cerebrali umani*

I tessuti cerebrali sono stati prelevati durante le autopsie di soggetti deceduti con età differenti, non affetti da patologie di tipo psichiatrico o neurodegenerativo. La causa è ascrivibile a patologie cardiovascolari, respiratorie o traumatiche non coinvolgenti l'encefalo. Le autopsie sono state effettuate entro le 48 ore dal decesso e il prelievo dei tessuti cerebrali per il presente studio è stato eseguito in conformità con le norme vigenti in materia di Medicina Legale, presso l'Istituto di medicina legale di Milano (Università degli Studi di Milano) e con l'autorizzazione del comitato etico del CNR (istituto di tecnologie biomediche).

I soggetti utilizzati per il presente studio non presentavano alcuna alterazione macroscopica a livello cerebrale. Tuttavia è stata eseguita un'indagine istologica per escludere la presenza di corpi di Lewy o altri marcatori di patologie neurodegenerative. Le aree cerebrali (substantia nigra) sono state dissezionate e trattate diversamente a seconda del loro utilizzo: per l'isolamento della neuromelanina (NM) i campioni di tessuto vengono conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento del loro utilizzo; per l'isolamento degli organelli di NM e per gli studi morfologici al microscopio elettronico i tessuti vengono trattati immediatamente come descritto nei paragrafi successivi.

### 3.2 *Preparazione dei campioni analizzati*

#### 3.2.1 **Isolamento della NM da substantia nigra umana**

Per l'isolamento della NM è stato usato un metodo adattato a quello riportato da Zecca et al. 2008 [174]. Per estrarre quantità di NM sufficienti per le analisi sono stati usati campioni di tessuto (substantia nigra) prelevati da più soggetti. La resa della procedura di isolamento del pigmento di NM è in media di 1mg/g di tessuto. Il pool di tessuti è stato omogenato con pestello di teflon aggiungendo  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura (30 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ /g di tessuto) e con l'ausilio di ultrasuoni e agitazione tramite agitatore vortex. Il campione è stato centrifugato a 13500 g per 10 min. a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Per eliminare le componenti idrosolubili del tessuto, il pellet ottenuto è stato lavato per due volte con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (50 mM, pH 7.4; 30 ml/g tessuto) e dopo ogni lavaggio è stato centrifugato a 13500 g per 10 min. a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Per rimuovere le componenti proteiche del tessuto, è stato effettuato un ciclo di tre incubazioni con SDS-Tris (SDS 0.5 %, Tris 50 mM, pH 7.4; 20 ml /g tessuto) a  $+37^{\circ}\text{C}$ , per 2 h ciascuna e in agitazione continua. Ad intervalli regolari i campioni sono stati agitati per favorire la disgregazione del tessuto. Per ottenere i campioni di NM isolata con proteinasi (campioni NM-1 e NM-2), nella terza incubazione è stata aggiunta proteinasi K (0.2 mg/ml). Alla fine di ogni incubazione i campioni sono stati centrifugati a 13500 g per 20 min. a  $+20^{\circ}\text{C}$ . Di seguito, il pigmento è stato lavato per due volte con NaCl 0.9 % (5 ml/g tessuto) per eliminare il surfattante SDS e quindi centrifugato a 13500 g per 30 min. a  $+20^{\circ}\text{C}$ . È stato poi lavato per due volte con 5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura e poi centrifugato a 13500 g per 30 min. a  $+20^{\circ}\text{C}$ . Infine per rimuovere la componente lipidica adsorbita alla NM, il pellet è stato risospeso tramite agitazione e ultrasuoni in 2 ml di metanolo e poi centrifugato a 13500 g per 30 min. a  $+20^{\circ}\text{C}$ . Questa operazione è stata ripetuta utilizzando 1 ml di esano. Il pellet così ottenuto è stato essiccato sotto flusso d'azoto.

### 3.2.2 Esperimento per la verifica delle possibili proteine aspecifiche legate alla NM

È stato preparato un campione di NM isolato da tessuto con proteinasi (NM-3) con il metodo descritto in 3.2.1. NM-3 è stato poi analizzato attraverso due analisi MudPIT in replicato secondo il metodo descritto (vedi 3.3).

La NM deproteinizzata ottenuta come residuo dell'analisi proteomica di NM-3 è stata lavata per 2 volte con NaCl 0.9% e per due volte con acqua ultrapura attraverso centrifugazioni a 17500 g per 15 min a 20 °C, al fine di rimuovere il surfattante Rapigest utilizzato per la digestione triptica. La NM deproteinizzata viene poi risospesa in 50 µl di acqua e conservata a -20 °C. Di seguito, la NM deproteinizzata è stata sottoposta agli stessi passaggi e centrifugazioni che vengono usati nella procedura di isolamento della NM, utilizzando però, al posto delle normali soluzioni descritte in 3.2.1., i surnatanti delle centrifugazioni derivate dalla procedura di isolamento di un'altra NM da tessuto, svolta parallelamente, partendo dallo stesso tipo di tessuto e nelle stesse condizioni sperimentali usate per ottenere NM-3 (fig.3.1). Si è ottenuto così il campione NM-3-TIS. Questo è stato sottoposto a sua volta a idratazione, digestione triptica e analisi proteomica MudPIT in duplicato per il confronto con le proteine identificate da NM-3 (fig. 3.1).

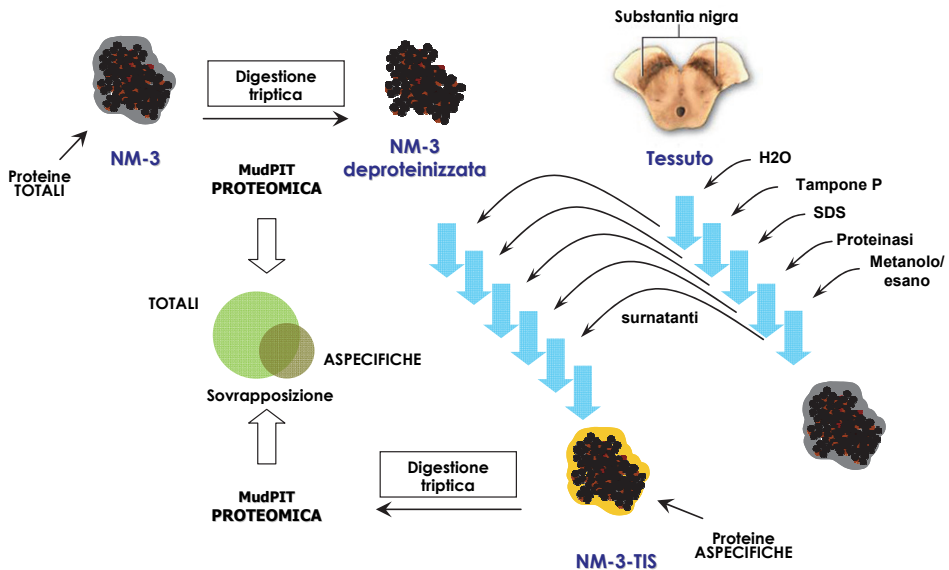


Fig.3.1. Schema dell'esperimento per l'analisi delle proteine aspecifiche che si legano alla NM durante il suo isolamento da tessuto. La frecce azzurre rappresentano i passaggi di centrifugazione.

### 3.2.3 Isolamento degli organelli di NM da substantia nigra umana

Per l'isolamento degli organelli di NM è stato usato un metodo adattato a quello riportato da Zecca et al. 2008 [174]. Il tessuto umano (substantia nigra) appena dissezionato è stato disgregato su un filtro di nylon utilizzando un buffer di separazione (HEPES 10 mM, glucosio 10 %; pH 6.0). La sospensione cellulare è



stata depositata su un gradiente discontinuo di saccarosio (1.0 M, 1.2 M, 1.4 M, 1.6 M) e centrifugata a 4000 g per 1 h a +4 °C. Al termine della centrifugazione il pellet era costituito principalmente dai neuroni pigmentati, mentre la sospensione di cellule non penetrate nel gradiente è stata ricentrifugata su un nuovo gradiente di saccarosio per recuperare il maggior numero di neuroni pigmentati. I pellet scuri contenenti i neuroni pigmentati sono stati recuperati e lavati per due volte con un buffer di isolamento (HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM, saccarosio 10 %, inibitore delle proteasi 1 %; pH 7.5) e centrifugati a 8600 g per 30 min. a +4 °C. La sospensione contenente i neuroni è stata quindi fatta passare 10 volte attraverso un ago da insulina (27G) per rompere le membrane cellulari e ottenere una sospensione di organelli subcellulari. La sospensione ottenuta è stata depositata su un gradiente di Percoll 60 % (in saccarosio 0.25 M) e centrifugata a 18500 g per 1 h a +4 °C. Il pellet è stato lavato per due volte con il buffer di isolamento e centrifugato a 18500 g per 1 h a +4 °C. Successivamente il pellet è stato centrifugato a 17500 g (1 h, +4 °C) nel buffer di isolamento per separare gli organelli dai residui di Percoll e a 19000 g per 1h a +4 °C per compattare il campione in un volume finale di circa 100 µl di buffer di isolamento.

### **3.2.4 Rimozione delle membrane lipidiche dal campione di organelli di NM**

Una sospensione di organelli di NM isoalti da substantia nigra come descritto in 3.2.3 è stato sottoposto a 3 cicli termici (-78 °C (ghiaccio secco/acetone)/ 37°C, 5/5 min.) È stato poi centrifugato a 17500 g per 15 minuti a 4 °C. Sono stati ripetuti due lavaggi con 150 µl di buffer di isolamento (vedi 3.2.3) per eliminare le membrane e gli eritrociti lisati contenuti nel surnatante. Il pellet contenente gli organelli è stato trattato per l'analisi proteomica.

## **3.3 Analisi delle proteine con tecnologia MudPIT**

### **3.3.1 Solubilizzazione e digestione triptica**

Prima del trattamento per l'analisi proteomica, la NM isolata da SN è stata idratata in acqua ultrapura (1 mg/ml) per circa 6 giorni con l'impiego di ultrasuoni (max 5 min/giorno) e in continua agitazione. La sospensione di NM è stato poi concentrata fino a circa 100 µl con concentratore (vacumat, eppendorf) a 60°C. La NM isolata da SN senza proteinasi è difficilmente idratabile e questo passaggio è stato omesso. L'organello di NM isolato da tessuto non necessita di idratazione.

Ad ogni campione è stato aggiunto il surfattante acido- labile Rapigest SF (Waters, MA, USA) in carbonato di ammonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 50mM, pH 7,9 fino a un volume massimo di 180 µl e una concentrazione finale pari al 0,25% v/v per NM isolata con proteinasi K e organelli, e 0,5% v/v per NM isolata senza proteinasi. Il campione è stato portato a 100 °C per 5 min per accelerare l'azione del surfattante. È stato poi trattato con 1 µg di Tripsina dimetilata (Sigma) e incubato a 37°C in agitazione per 16 h. È stata di nuovo aggiunta tripsina (1 µg) e la soluzione è stata incubata a 37°C, in agitazione per 6 h. Per inattivare il surfattante Rapigest SF e bloccare l'azione della tripsina, la miscela peptidica è stata acidificata con acido trifluoroacetico fino a pH 2 e portata a 37 °C per 45 minuti. Dopo centrifugazione a 10000 x g si ottiene la precipitazione della NM e del surfattante; si recupera il surnatante con le proteine digerite. Il digerito triptico è stato trattato con colonna

PepClean C-18 Spin Columns (Pierce) per rimuovere i sali e contaminanti non peptidici. I peptidi vengono poi risospesi in 20  $\mu$ l di acqua e acido formico 0,1%.

### 3.3.2 Analisi proteomica MudPIT

Il digerito triptico è stato analizzato attraverso spettrometria di massa accoppiata a micro-cromatografia liquida bidimensionale (2D-LC-MS/MS) conosciuta anche come Multi-dimensional protein identification technology (MudPIT) [276], [277] usando il sistema ProteomeX-2 (Thermo Fisher, San Josè, CA, USA). La soluzione contenenti i peptidi è stata poi caricata su colonna capillare a scambio cationico (SCX) (Biobasic-SCX, 0.32 mm (diametro interno) x 100 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA) e poi eluita con differenti concentrazioni (steps) di ammonio cloruro (5,10,5,20,30,40,80,120,400,600,700 mM). L'eluizione derivata da ogni step è stata direttamente caricata su colonna a fase inversa (RP) C-18 (Biobasic-18, 0.180 mm (diametro interno) x 100 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA) e separata con gradiente di acetonitrile (eluente A: acqua con acido formico 0.1%; eluente B: acetonitrile con acido formico 0.1%) secondo lo schema seguente: eluente B 5% per 3 min., B 5-40% in 50 min., B 40-80% in 10 min, B 80-95% un 5 min, B 95% per 10 min., B 95-5% in 4 min., B 5% per 15 min. Il flusso è stato stabilizzato a 1  $\mu$ l/min.

I peptidi eluiti dalla colonna C-18 sono stati analizzati direttamente con trappola ionica LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, San Josè, CA, USA). Gli spettri vengono acquisiti nella modalità adatta agli ioni positivi attraverso scansione del peptide intero (full scan) ad alta risoluzione ( $R=60000$ ) nel range 400-2000 m/z, seguita da quattro scansioni MS/MS dei quattro ioni più intensi, con un minuto di esclusione dinamica. Le scansioni dello spettrometro di massa e la gestione dei gradienti HPLC sono state controllate dal sistema Xcalibur data System (Thermo Scientific). Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato ad eccezione dei campioni ORG-B1 e ORB-2 analizzati in singolo.

### 3.3.3 Identificazione delle proteine

Con l'uso della piattaforma Bioworks 3.3.1 basata sul motore di ricerca SEQUEST (Università di Washington, in licenza a Thermo Finnigan), gli spettri ottenuti sperimentalmente sono stati correlati alle sequenze peptidiche contenute nei database di riferimento; in particolare, è stato usato il database non ridondante delle sequenze proteiche di Homo sapiens aggiornato al gennaio 2010 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Nonostante i campioni analizzati siano stati digeriti con tripsina, la ricerca delle sequenze di interesse è stata eseguita non specificando l'enzima di taglio; in questo modo sono state identificate anche sequenze peptidiche derivanti da tagli aspecifici. Inoltre, per gli ioni precursori e derivati da frammentazione è stata impostata una tolleranza di 1 e 2 unità di massa atomica (amu).

La confidenza di identificazione delle proteine è stata assicurata applicando i seguenti filtri (o valori soglia): Xcorr vs carica >1.5, 2.0 e 2.5 per peptidi a singola, doppia e tripla carica rispettivamente; consensus score<sup>a</sup> >10 e peptide probability < 0.001. La percentuale di falsi positivi, calcolata elaborando gli spettri con il

<sup>a</sup> Il valore di "consensus score" viene calcolato dal software Bioworks in base al numero di peptidi diversi ("distinct peptides") osservati per ogni proteina. Il valore numerico corrisponde all'incirca al numero di "distinct peptides" moltiplicato per un fattore 10.

Reverse Database (database delle proteine con sequenza invertita) delle sequenze di Homo sapiens, è inferiore al 5%. Ad eccezione dei campioni ORG-B1 e ORB-2, tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato. Per la selezione delle proteine definite "rappresentative" è stato usato uno score (consensus score) >10.99 e numero di peptidi appartenenti alla proteina (spectral count)  $\geq 2$ . Per ogni campione analizzato in triplicato sono state considerate tutte le proteine osservate almeno in una delle tre analisi. Per ogni proteina identificata in più di un'analisi è stato calcolata la media dei numeri di peptidi (spectral count) e la media dello score (consensus score). Ogni proteina è associata a un GI number (GenInfo Identifier) associato al database ottenuto da NCBI. Le liste delle proteine ottenute sono state mappate anche contro il database annotato UniProtKB di Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) aggiornato al mese di Gennaio 2010 per ottenere informazioni biologiche e la localizzazione cellulare. Alcune proteine identificate non sono annotate nel database UniProtKB e viene riportato solo il GI number. La localizzazione cellulare di ogni proteina è stata assegnata manualmente basandosi sulle informazioni di Uniprot e di Gene Ontology (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) e scegliendo la localizzazione più comune per quella proteina. Quando possibile, il nome di ogni proteina e del gene corrispondente sono quelli riportati nel database UniProtKB come "Recommended name", se la proteina non è presente in UniProtKB sono state usate le informazioni depositate nel database di NCBI.

### **3.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) del tessuto cerebrale umano**

Sezioni molto piccole di tessuto cerebrale umano (~1 mm) sono state fissate per 2 h (o per più h a seconda della dimensione) in una miscela di paraformaldeide 4 % e glutaraldeide 2 % (in tampone cacodilato 0.12 M, pH 7.4). Dopo diversi lavaggi in tampone cacodilato, è stata eseguita post-fissazione in OsO<sub>4</sub> 2 % (in tampone cacodilato 0.12 M, pH 7.4) per 1 h. Successivamente le sezioni sono state lavate più volte in tampone cacodilato, disidratate in scala crescente di alcoli, trattate per 15 min. in ossido di propilene e incubate per 12 ore in una miscela (1:1) di ossido di propilene ed Epon (resina epossidica). Quindi sono state incluse in Epon, e dopo polimerizzazione a +60 °C per 24 h, sono state tagliate in microsezioni dello spessore di 80 nm. Queste sezioni sono state depositate su griglie di nickel da 300 mesh e colorate per 5 min. con acetato di uranile saturo in acqua e successivamente con citrato di piombo (3 mM) per 5 min. Dopo diversi lavaggi in acqua le sezioni sono state fotografate con un microscopio elettronico a trasmissione TEM LEO912.

Per gli organelli è stato eseguito lo stesso protocollo, saltando però la fissazione e passando direttamente alla post-fissazione in OsO<sub>4</sub> 2 % (in tampone cacodilato 0.12 M, pH 7.4) per 30–45 min. Infine gli organelli non sono stati infiltrati in ossido di propilene perché presenti in quantità sempre molto ridotta e non trasferibili in provette di vetro resistenti all'ossido di propilene. L'infiltrazione è stata quindi fatta con miscele crescenti di alcoli ed Epon.

Tutti i passaggi appena descritti, tranne la dissezione del tessuto e la prima fissazione, sono stati svolti presso Alembic (presso Fondazione San Raffaele del Monte Tabor, Milano)



## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### Piano sperimentale

Sono riassunti qui i principali esperimenti svolti e schematizzati in figura 4.1.  
La tabella 4.1 elenca i campioni analizzati.

- Analisi proteomica della Neuromelanina (NM) isolata senza proteinasi. È stato analizzato un campione di NM isolata da tessuto cerebrale umano congelato. Il campione è stato isolato senza l'uso di proteinasi (campione NM-0, sez. 4.1.1).
- Analisi proteomica della NM isolata con proteinasi. È stato analizzato un campione di NM isolata da tessuto cerebrale umano congelato, ottenuto in questo caso con l'uso di proteinasi k durante le fasi di isolamento (NM-1). È stata osservata la diminuzione di proteine aspecifiche osservate in NM-0. Questa preparazione è stata definita più adeguata rispetto a quella usata per ottenere NM-0 ed è quindi stata utilizzata per ottenere un secondo campione come replicato biologico (NM-2) (sez.4.1.2).
- Validazione delle possibili aspecificità. È stato svolto un esperimento di validazione per identificare le proteine aspecifiche che si possono legare alla neuromelanina durante le fasi del suo isolamento dal tessuto congelato. Un campione di neuromelanina (NM-3) isolata con proteinasi k è stata digerita con tripsina per l'analisi delle proteine, come svolto per NM-1 e NM-2. Di seguito, la stessa NM deproteinizzata è stata incubata nei surnatanti delle centrifugazioni utilizzate per isolare un altro campione di neuromelanina al fine di riprodurre la sospensione proteica nella quale la NM si trova durante il suo normale isolamento (NM-3-TIS) (sez. 4.1.2.5).

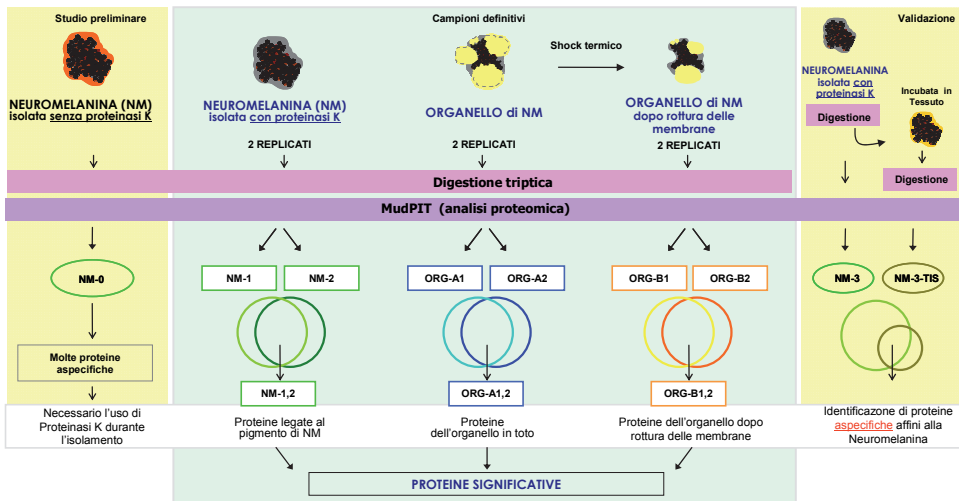


Figura 4.1. Piano sperimentale

- Analisi proteomica dell'organello di NM. Sono stati preparati e analizzati due campioni in replicato di organelli di NM ottenuti da tessuto umano cerebrale fresco, ottenuti attraverso centrifugazioni frazionate (ORG-A1 e ORG-A2) (sez.4.2.1).
- Analisi proteomica dell'organello di NM dopo shock termico per la rottura delle membrane. Un campione di organelli è stato sottoposto a shock termico (ORG-B1) al fine di eliminare le membrane dell'organello e analizzarne solo il contenuto. Inoltre questo trattamento è stato utile per lisare gli eritrociti presenti nel campione di organelli e per eliminare gran parte della contaminazione osservata in ORG-A1 e ORG-A2. Una volta verificata la bontà delle analisi abbiamo analizzato un campione in replicato (ORG-B2) (sez. 4.2.2).
- Riepilogo delle proteine significative (sez. 4.3)
- Caratterizzazione morfologica dell'organello di NM (sez. 4.4). Infine è stata svolta un'analisi morfologica dell'organello di NM per poterne descriverne l'organizzazione, anche in relazione al tipo di proteine osservate.

**Tab. 4.1: Campioni analizzati. Vengono riepilogate le caratteristiche del campione, i dati riguardanti i soggetti da cui sono stati prelevati i tessuti autoptici e il numero di iniezioni per l'analisi proteomica MudPIT**

Campione	Descrizione	Peso del pigmento	Soggetti (numero / sesso / età)	Numero di analisi MudPIT
NM-0	Neuromelanina isolata da tessuto (esperimento preliminare)	1.3 mg	9 / F-M / 66-94	3
NM-1	Neuromelanina isolata da tessuto con l'uso i proteinasi (primo replicato)	0.68 mg	5 / F-M / 72-86	3
NM-2	Neuromelanina isolata da tessuto con l'uso i proteinasi (secondo replicato)	0.43 mg	12 / F-M / 70-92	3
ORG-A1	Organelli di NM isolati in toto (primo replicato)	n.d. <sup>a</sup>	1 / F / 86	3
ORG-A2	Organelli di NM isolati in toto (secondo replicato)	n.d. <sup>a</sup>	1 / M / 69	3
ORG-B1	Organelli di NM trattati con shock termico per la rimozione delle membrane (primo replicato)	n.d. <sup>a</sup>	1 / M / 82	1
ORG-B2	Organelli di NM trattati con shock termico per la rimozione delle membrane (secondo replicato)	n.d. <sup>a</sup>	2 / M-F / 60-69	1
NM-3	Neuromelanina isolata da tessuto con l'uso di proteinasi (utilizzata per l'identificazione di proteine aspecifiche)	1.2 mg	4 / F-M / 62-86	2
NM-3-TIS	NM-3 deproteinizzata e re-isolata in surnatanti di altra procedura di isolamento (utilizzata per l'identificazione di proteine aspecifiche)	< 1.2 mg	4 / F-M / 62-86	2

<sup>a</sup> I campioni di organelli sono delle sospensioni e il peso degli organelli non viene definito.

## 4.1 Proteine legate al pigmento di neuromelanina

### 4.1.1 Studio preliminare: proteomica della neuromelanina isolata da tessuto (NM-0)

Per lo studio delle proteine legate alla NM si è svolta l'analisi proteomica del pigmento di NM isolato da campioni congelati di substantia nigra (SN) derivati da un pool di soggetti sani (tabella 4.1). Il metodo usato per preparare questo campione di NM è analogo a quello usato tipicamente (omogeneizzazione, centrifugazioni differenziali con lavaggi in tampone fosfato, lavaggi in SDS (sodio dodecil solfato), proteasi k in SDS, NaCl, ed estrazioni con metanolo ed esano) [174], fatta eccezione per il passaggio con proteinasi K in SDS. Il trattamento con proteinasi k, previsto per rimuovere componenti tissutali residue, è stato escluso al fine di evitare la rimozione della componente proteica della NM destinata all'analisi proteomica. Sono state condotte 3 analisi MudPIT in replicato, identificando in totale 392 proteine delle quali 82 definite come rappresentative del campione (con un numero di peptidi maggiore o uguale a due e uno score  $\geq 10.99$  almeno in uno dei tre replicati)<sup>a</sup> (tabella 4.2, elenco completo delle proteine in Appendice, tabella B).

Tabella 4.2. Campione NM-0

Proteine totali	392
Proteine rappresentative	(21%) 82

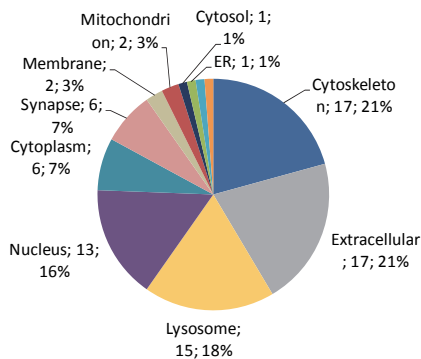


Fig. 4.2 Campione NM-0. Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative.

<sup>a</sup> In questo capitolo il termine "rappresentative" indica le proteine filtrate con i criteri qui descritti: con un numero di peptidi maggiore o uguale a due e uno score  $\geq 10.99$  almeno in uno dei tre replicati. Il numero di peptidi (chiamato anche "spectral count") indica il numero di peptidi totali osservati per una proteina identificata. Lo score (chiamato anche "consensus score") è un valore calcolato sulla base del numero di peptidi diversi ("distinct peptides") osservati per una stessa proteina. Questo valore deriva dal numero di distinct peptides moltiplicato per un fattore 10 e per altri parametri che dipendono dalla confidenza con la quale viene identificato il peptide.

Tra le 82 proteine rappresentative (Fig. 4.2) si osservano proteine del citoscheletro (17), della matrice extracellulare (17), del lisosoma (15) e del nucleo (15). La presenza di proteine lisosomiali è compatibile con il tipo di organello in cui risiede la NM all'interno dei neuroni; invece, le proteine della matrice extracellulare, del nucleo e del citoscheletro sono proteine aspecifiche che derivano dalla loro abbondanza nel tessuto e dalla loro probabile affinità con il pigmento di NM (come confermato dagli esperimenti successivi; sez. 4.1.2).



## 4.1.2 Proteomica della neuromelanina isolata da tessuto con proteinasi (NM-1 e NM- 2)

### 4.1.2.1 Campione NM-1

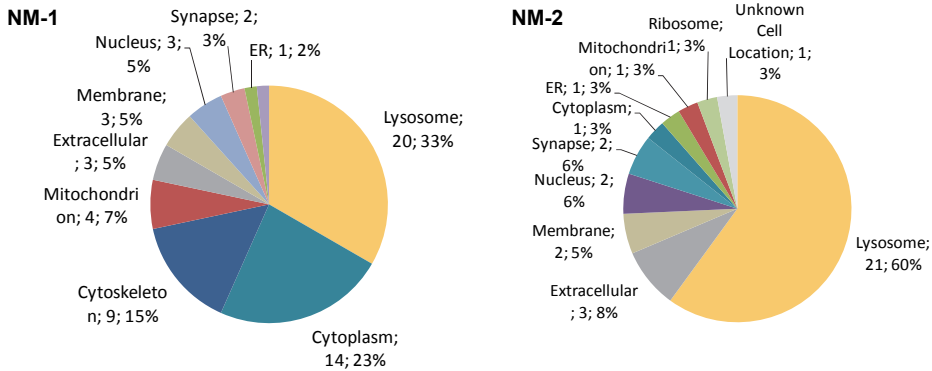
Considerati i risultati descritti in 4.2.1 si è proceduto con l'analisi di un campione di NM (NM-1) preparato questa volta con il metodo di isolamento tradizionale che prevede incubazioni con proteinasi k. Dall'analisi proteomica MudPIT in triplicato sono state ottenute 312 proteine delle quali 60 definite rappresentative (tabella 4.3, elenco completo delle proteine in Appendice, tabella A). Tra queste, la classe delle proteine lisosomiali è quella più rappresentata (20) (Fig. 4.3), osserviamo inoltre un numero maggiore di proteine lisosomiali rispetto a quelle identificate nella NM isolata senza proteinasi (NM-0). Per contro, in questo campione, le proteine della matrice extracellulare, del citoscheletro e del nucleo, osservate in numero elevato in NM-0, sono meno rappresentate, soprattutto quelle del nucleo e della matrice extracellulare (da un totale di 30 in NM-0 a un totale di 6 nel campione NM-1). Questo tipo di preparazione è stata quindi ritenuta la più adatta per l'identificazione delle proteine legate o "incastrate" nella struttura polimerica e complessa del pigmento di NM (proteine specifiche). Evidentemente le proteine interne alla struttura della NM, e quelle legate covalentemente ad essa, non vengono degradate completamente durante le incubazioni con proteinasi k. Da'altra parte, il trattamento con proteinasi k è utile per rimuovere la maggior parte delle proteine aspecifiche che vengono adsorbite esternamente alla NM durante i passaggi di isolamento.

### 4.1.2.2 Campione NM-2

È stato preparato e analizzato un secondo campione di NM (NM-2) come replicato biologico di NM-1. Dall'analisi MudPIT in triplicato di NM-2 sono state ottenute 144 proteine delle quali 35 definite rappresentative secondo i criteri precedentemente descritti (tabella 4.3, elenco completo delle proteine in Appendice, tabella A). Anche in questo campione (fig. 4.3) abbiamo osservato una prevalenza di proteine lisosomiali (21). Nonostante una netta diminuzione delle proteine totali identificate (a causa della minor quantità di campione utilizzato (vedi tab. 4.1)) il numero di proteine lisosomiali è invariato rispetto a NM-1. Inoltre, il numero di peptidi e i valori di score sono mediamente paragonabili e in alcuni casi più elevati rispetto a NM-1. Infine, in NM-2 osserviamo la diminuzione delle proteine citoscheletriche e citoplasmatiche abbondanti nel tessuto, alcune delle quali probabilmente copurificate come proteine aspecifiche. Questo indica che in NM-2 osserviamo un numero inferiore di proteine ma con una specificità più elevata.

Tabella 4.3. Riepilogo dell'analisi proteomica di NM-1 e NM2

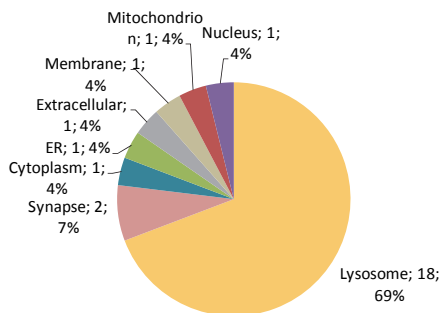
Campione	Proteine Totali	Proteine rappresentative numero peptidi ≥ 2; score ≥ 10.99
NM-1	312	(19%) 60
NM-2	144	(24%) 35
COMUNI	47	(55%) 26



**Fig. 4.3.** Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative identificate in NM-1 (sinistra) e NM-2 (destra).

#### 4.1.2.3 Proteine comuni ai due campioni (NM-1,2)

Confrontando le analisi di NM-1 e NM-2 si osservano 47 proteine comuni delle quali 26 sono definite rappresentative in entrambi i campioni (tabella 4.4, fig. 4.4). La distribuzione delle localizzazioni cellulari delle proteine rappresentative evidenzia quelle lisosomiali come la classe più rappresentata tra le proteine appartenenti alla NM (18, 68%). Oltre a queste si osservano ad esempio la ferritin L (trasporto e omeostasi del ferro), la phospholipase D3 (lipasi con attività e funzioni poco chiare), l'apolipoprotein D (trasporto lipidi), la ATP synthase lipid-binding protein (mitochondrial subunit c) (una proteina mitocondriale lipofilica tipica di malattie lisosomiali d'accumulo), la myelin basic protein, la cytsatin-B (inibitore delle catepsine lisosomiali) e le proteine cerebellin 1 e 2 con localizzazione sinaptica.



**Fig. 4.4.** Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative condivise dai campioni NM-1 e NM-2 (n. =26).

Tabella 4.4. Proteine rappresentative comuni ai campioni NM-1 e NM-2

GI number	Uniprot entry	Nome	Gene	Localizzaz. Cellulare	NM-1		NM-2	
					Media Score	Media Peptidi	Media Score	Media Peptidi
20149498	P02792	Ferritin light chain *	FTL	Cytoplasm	30.23	10	30.22	11
1575347	Q8IV08	Phospholipase D3	PLD3	ER	36.97	18	66.96	30
4502163	P05090	Apolipoprotein D	APOD	Extracellular	26.85	8	16.83	4
8247915	Q13510	Acid ceramidase	ASAH1	Lysosome	15.15	2	15.18	3
825628	P15848	Arylsulfatase B	ARSB	Lysosome	43.52	9	33.49	6
4503139	P07858	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	170.32	163	166.27	119
4503143	P07339	Cathepsin D	CTSD	Lysosome	26.87	5	40.21	12
4503155	P07711	Cathepsin L1	CTSL1	Lysosome	20.23	6	16.83	7
22538442	Q9UBR2	Cathepsin Z	CTSZ	Lysosome	30.22	18	33.54	19
1905907	O00115	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNASE2	Lysosome	15.18	2	16.84	4
4503987	Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	Lysosome	202.93	118	141.61	118
4557659	P22304	Iduronate 2-sulfatase	IDS	Lysosome	36.90	6	46.92	10
126590	P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA	Lysosome	26.85	5	29.55	4
24475586	Q9UM22	Mammalian endymin-related protein 1	EPDR1	Lysosome	153.60	221	169.59	184
4503899	P34059	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	GALNS	Lysosome	23.51	4	13.49	3
4506919	P51688	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	SGSH	Lysosome	33.54	8	23.50	3
4506031	P50897	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	Lysosome	46.91	27	60.22	28
11386147	P07602	Proactivator polypeptide [Cleaved into: Saposin-A ,B,C,D]	PSAP	Lysosome	16.82	7	26.81	15
27734917	Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2	Lysosome	30.20	7	23.50	6
6808138	Q9HAT2	Sialate O-acetyltransferase	SIAE	Lysosome	216.94	226	298.94	285
2408232	O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	Lysosome	109.61	39	186.97	75
68509930	P02686	Myelin basic protein *	MBP	Membrane	210.92	102	106.23	77
4502301	P48201	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial subunit c	ATP5G3	Mitochondrion	13.52	2	26.88	5
4503117	P04080	Cystatin-B	CSTB	Nucleus, Cytoplasm	13.53	3	20.20	6
4757922	P23435	Cerebellin-1 *	CBLN1	Synapse	66.90	28	46.91	41
32698861	Q8IUK8	Cerebellin-2	CBLN2	Synapse	16.88	3	13.54	5

(\*) : Proteine potenzialmente aspecifiche (vedi sez.4.1.2.5)

#### 4.1.2.4 Altre proteine di interesse osservate nel pigmento di neuromelanina isolato da tessuto (NM-1 e NM-2)

Riteniamo che alcune proteine siano importanti sebbene non siano state identificate come rappresentative o tra le proteine comuni tra i due campioni.

Per NM-1 e NM-2 riportiamo in tabella 4.5 la proteina lisosomiale epididymal secretory protein E1 o Niemann-Pick disease type C2 protein (NPC2), la proteina melanosomiale Transmembrane glycoprotein NMB (GPNMB), l'ubiquitina, e la proteina Heat shock protein HSP90 importanti per l'omeostasi e la degradazione delle proteine.

Tabella 4.5 Altre proteine di interesse osservate in NM-1 e NM-2

GI Accession	Uniprot AC	Nome Proteina	Gene	Localizzaz. Cellulare	NM-1		NM-2	
					NM-1	Media Peptidi	NM-2	Media Peptidi
5453678	P61916	Epididymal secretory protein E1 (Niemann-Pick disease type C2 protein)	NPC2	Lysosome	10.20	6	10.12	1
4505405	Q14956	Transmembrane glycoprotein NMB	GPNMB	Melanosome	10.14	2	10.13	1
4507761	P62988	Ubiquitin	RPS27A	Cytosol	10.19	2	10.15	1
20149594	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Cytoplasm	18.26	1		

#### 4.1.2.5 Verifica delle possibili proteine aspecifiche legate al pigmento di neuromelanina isolato da tessuto (NM-3, NM3-TIS)

L'identificazione di diverse proteine con particolare affinità per i lipidi e per i metalli nei campioni di NM suggerisce la possibilità che alcune proteine potrebbero legarsi in modo aspecifico alla NM durante il suo isolamento da tessuto. È stato messo a punto un metodo per distinguere le proteine specifiche da quelle potenzialmente aspecifiche.

Un campione di NM isolata da tessuto con proteinasi k (NM-3) è stato sottoposto a digestione triptica per analisi MudPIT in duplicato. La NM deproteinizzata è stata poi sottoposta a una procedura identica a quella di isolamento, sostituendo alle soluzioni di lavaggio tutti i surnatanti derivati dai passaggi di centrifugazione di un'altra procedura di isolamento svolta in parallelo ottenendo così il campione NM-3-TIS. Dall'analisi proteomica in duplicato di entrambi i campioni (NM-3 e NM-3-TIS) sono state identificate rispettivamente 39 e 37 proteine identificate con più di due peptidi (Tabella 4.6, elenco completo in Appendice, tabella B). Tra queste, 5 sono sovrarappresentate in NM-3-TIS (ferritin L, tubulin alpha 1C, myelin basic protein, mitochondrial fission protein (FIS1), cerebellin-1). Queste sono proteine che sono state individuate nel pigmento di NM isolato normalmente ma che vengono identificate maggiormente esponendo il pigmento deproteinizzato alle proteine del tessuto. Secondo la nostra ipotesi queste proteine vengono quindi indicativamente definite come aspecifiche. Potrebbero legarsi al pigmento di NM per una particolare affinità oppure potrebbero venire identificate perché molto abbondanti nel tessuto (tubulina, myelin basic protein). Sono state osservate inoltre delle proteine osservate solo in NM-3-TIS e non in NM-3 che si possono comunque

definire affini per il pigmento di NM, ad esempio le proteine TPPP e ubiquitina, l'enzima lisosomiale dexyiribonuclease-2-alfa, la myelin P2 protein, actin e microtubule-associated proteine tau.

Tabella 4.6. Riepilogo delle proteine identificate in NM-3 e NM-3-TIS

Campione	Proteine Totali	Proteine con numero peptidi $\geq 2$	Proteine numero peptidi $\geq 2$ presenti solo nel campione specificato	Proteine numero peptidi $\geq 2$ sovrarappresentate rispetto all'altro campione
NM-3	94	(41%) 39	22	12
NM-3-TIS	75	(49%) 37	20	5
COMUNI	46	(37%) 17	-	-

## 4.2 Proteine dell'organello di neuromelanina isolato da substantia nigra umana

### 4.2.1 Proteomica dell'organello di neuromelanina isolato in toto (ORG-A1 e ORG-A2).

#### 4.2.1.1 Campione ORG-A1

E' stata analizzata una prima preparazione di organelli isolati da tessuto fresco (substantia nigra) prelevato da un solo soggetto attraverso centrifugazione su gradiente di percoll (ORG-A-1). In fig. 4.5 si osservano due immagini di microscopia elettronica che confermano la purezza del campione e la buona integrità degli organelli isolati.

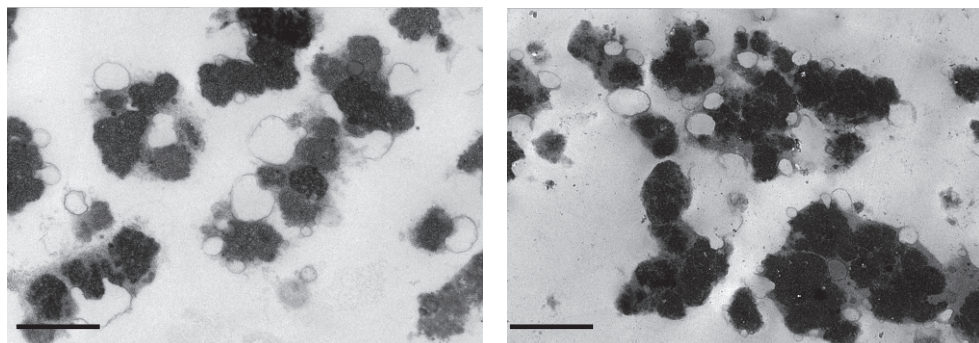


Fig. 4.5. Immagini al microscopio elettronico a trasmissione degli organelli di NM isolati per centrifugazione su gradiente di Percoll. Barra= 1  $\mu$ m.

Dall'analisi MudPIT in triplicato sono state identificate 463 proteine delle quali 79 identificate come rappresentative (con un numero di peptidi maggiore o uguale a due e uno score  $\geq 10.99$  almeno in una delle tre iniezioni) (tabella 4.7 elenco completo in Appendice, tabella A.

Tabella 4.7. Riepilogo dell'analisi proteomica di ORG-A1 e ORG-A2

Campione	Proteine Totali	Proteine rappresentative numero peptidi $\geq 2$ ; score $\geq 10.99$	Proteine presenti anche in eritrociti tra le rappresentative	Proteine rappresentative sottratte delle proteine eritrocitarie
ORG-A1	463	(17%) 79	(63%) 52	27
ORG-A2	396	(27%) 106	(41%) 43	62
COMUNI	115	(41%) 47	(55%) 27	20

Osservando la distribuzione cellulare delle 79 proteine rappresentative (fig 4.6) si nota un numero elevato di proteine citoplasmatiche e citoscheletriche (50% in tutto), in numero maggiore rispetto alle proteine lisosomiali (18%). L'identità delle proteine citoplasmatiche e citoscheletriche rivela un elevato numero (>15) di proteine tipiche degli eritrociti (es: emoglobina, spectrin, carbonato deidratase, band 3 protein). Questi dati indicano la presenza di contaminazione da eritrociti nel campione di organelli isolati da tessuto fresco. Purtroppo, nonostante gli eritrociti

possiedano dimensioni maggiori rispetto a quelle dell'organello di NM (6,0- 8,0  $\mu\text{m}$  e 0,7 -1,5  $\mu\text{m}$  rispettivamente) la loro densità è simile (1.09–1.10  $\text{g}/\text{cm}^3$ , e 1.11 e 1.13  $\text{g}/\text{cm}^3$  rispettivamente). Sebbene l'entità della contaminazione sia minima, le grandi dimensioni dell'eritrocita, fanno in modo che una piccola percentuale di contaminazione eritrocitaria può causare l'identificazione di un numero relativamente elevato di proteine contaminanti.

Come primo approccio per valutare il livello di contaminazione e verificare quali proteine appartengano veramente all'organello di NM, le proteine identificate in ORG-1 sono state confrontate con le proteine appartenenti all'eritrocita riportate in due recenti lavori di proteomica [278], [279]. Le proteine comuni tra l'organello di NM e gli eritrociti sono state sottratte dalla lista delle 79 proteine rappresentative ottenendo 27 proteine certamente non derivate dagli eritrociti. Queste mostrano infatti una distribuzione cellulare (fig. 4.6) molto simile a quella osservata in NM-1 e NM-2, dove la classe delle proteine lisosomiali predomina sulle altre. La sottrazione delle proteine appartenenti all'eritrocita adottata per l'analisi di questi dati è utile per poter considerare le proteine "certamente" appartenenti all'organello di NM. Non è comunque escluso che alcune delle proteine dell'eritrocita siano presenti anche negli organelli di NM. Il problema viene infatti in parte risolto eliminando la contaminazione di eritrociti (sez. 4.2.2).

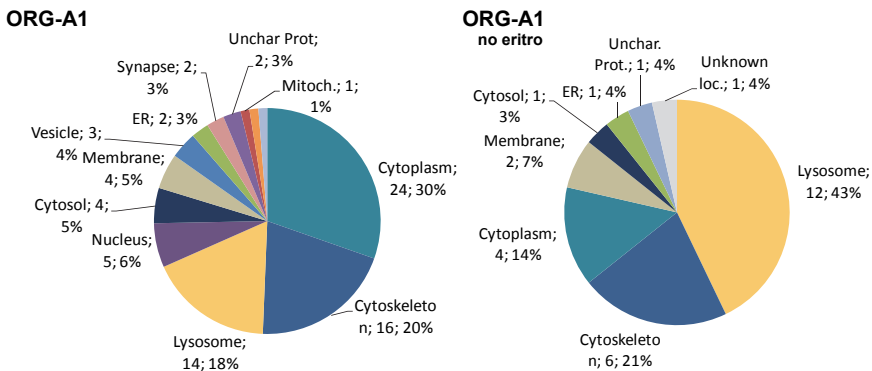
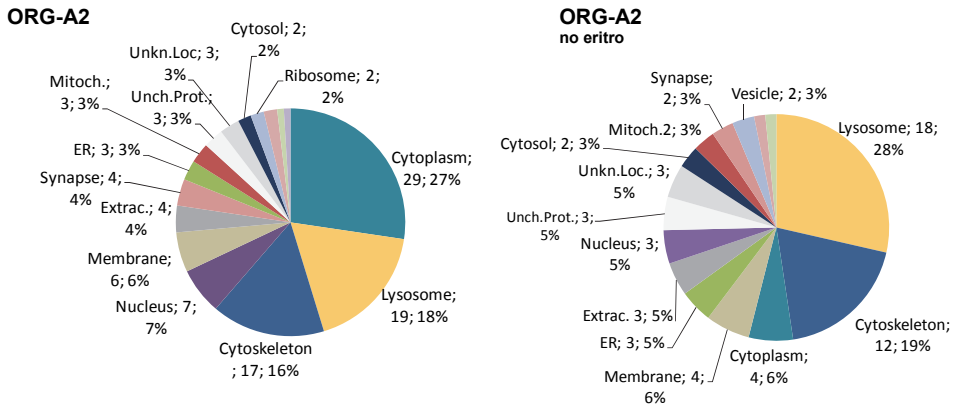


Fig. 4.6. Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative identificate in ORG-A1 prima (sinistra) e dopo (destra) la sottrazione delle proteine eritrocitarie.

#### 4.2.1.2 Campione ORG-A2

È stato preparato e analizzato un secondo campione di organelli di NM isolati da substantia nigra (tessuto fresco) prelevata da un solo soggetto (ORG-A2). Dall'analisi MudPIT in triplicato si sono identificate 396 proteine totali delle quali 106 identificate come rappresentative (tabella 4.7, elenco completo in Appendice, tabella A). Si osserva che le proteine rappresentative coprono una percentuale maggiore delle proteine totali rispetto a ciò che si osserva in ORG-A1. Questa differenza suggerisce un numero maggiore di proteine specifiche del campione e quindi una minore percentuale di contaminazione da proteine aspecifiche. Questo è confermato dalla presenza di una percentuale inferiore di proteine citoplasmatiche e citoscheletriche (42% in tutto) e una minore percentuale di proteine osservate nell'eritrocita tra le rappresentative (sono il 41% rispetto al 63%

presente in ORG-A1) (Fig. 4.7, Tabella 4.7). La distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative sottratte delle proteine osservate in eritrociti rivela anche in questo caso una prevalenza di proteine lisosomiali (18)..

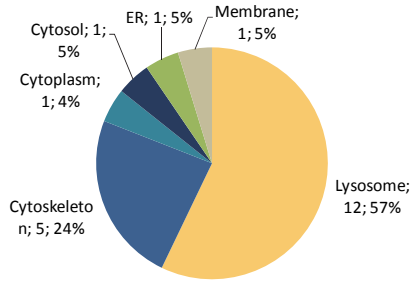


**Fig. 4.7.** Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative identificate in ORG-A2 prima (sinistra) e dopo (destra) la sottrazione delle proteine eritrocitarie.

#### 4.2.1.3 Proteine comuni ai due campioni di organelli isolati in toto (ORG-A1,2)

Dal confronto delle proteine rappresentative di ORG-A1 e ORG-A2 si ottiene una lista di 20 proteine condivise che certamente non derivano dalla contaminazione da eritrociti e che rappresentano le proteine più abbondanti nell'organello di NM (Fig. 4.8, Tabella 4.8). Di questa lista, 12 sono proteine lisosomiali e 9 di queste sono le stesse osservate tra le proteine comuni ai due replicati di neuromelanina isolata da tessuto con proteinasi (NM-1,2). La lysosome membrane protein 2 (LIMP2) è una delle proteine lisosomiali osservate solo in ORG-A1 e ORG-A2 ed è tipica della membrana lisosomiale. Inoltre, tra le proteine presenti solo in questi campioni riportiamo alcune proteine citoscheletriche (microtubule-associated protein 6 (MAP6), microtubule-associated protein tau (TAU), tubulin polymerization-promoting protein (TPPP)), la proteina alpha-crystallin importante per il folding e l'omeostasi delle proteine, e la myelin basic protein, probabilmente presente perché una delle proteine più abbondanti nel tessuto cerebrale (si rimanda alla sez. 4.5.1 per il confronto tra le proteine osservate nei diversi campioni).





**Fig. 4.8.** Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative e condivise dai campioni ORG-A1 e ORG-A2 dopo la sottrazione delle proteine eritrocitarie.

**Tabella 4.8.** Proteine rappresentative e comuni ai campioni ORG-A1 e ORG-A2 dopo la sottrazione delle proteine eritrocitarie.

GI number	Uniprot entry	Nome	Gene	Localizzaz. Cellulare	ORG-A1		ORG A2	
					Media Score	Media Peptidi	Media Score	Media Peptidi
4503057	P02511	Alpha-crystallin B chain	CRYAB	Cytoplasm	30.19	4	30.17	5
1147813	P15924	Desmoplakin	DSP	Cytoskeleton	14.22	2	17.20	2
14017973	Q96JE9	Microtubule-associated protein 6	MAP6	Cytoskeleton	13.52	2	33.56	7
8400711	P10636	Microtubule-associated protein tau	MAPT;TAU	Cytoskeleton	16.90	5	34.18	3
21361322	P04350	Tubulin beta-4 chain	TUBB4	Cytoskeleton	30.21	5	30.24	5
5902018	O94811	Tubulin polymerization-promoting protein	TPPP	Cytoskeleton	53.64	25	20.21	5
1575347	Q8IV08	Phospholipase D3	PLD3	ER	45.28	9	33.55	13
8247915	Q13510	Acid ceramidase	ASAH1	Lysosome	43.63	16	60.20	32
4503139	P07858	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	54.93	24	52.26	21
4503143	P07339	Cathepsin D	CTSD	Lysosome	50.27	37	46.92	32
15080291	Q9UHL4	Dipeptidyl-peptidase 2	DPP7	Lysosome	40.20	7	73.59	23
4503987	Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	Lysosome	58.26	22	72.87	39
4826940	P42785	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	Lysosome	26.95	9	30.19	13
5031631	Q14108	Lysosome membrane protein 2	SCARB2;LIMPII	Lysosome	15.15	2	23.51	7
24475586	Q9UM22	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1;MERP1	Lysosome	30.20	16	63.57	41
4506031	P50897	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	Lysosome	23.59	8	26.90	18
27734917	Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2 (p76)	PLBD2	Lysosome	13.58	5	20.21	3
6808138	Q9HAT2	Sialate O-acetyltransferase	SIAE	Lysosome	65.60	61	50.25	46
2408232	O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	Lysosome	22.85	4	32.87	8
68509930	P02686	Myelin basic protein	MBP	Membrane	162.90	94	213.57	222

#### 4.2.1.4 Altre proteine di interesse osservate nei campioni di organelli isolatimin toto (ORGA-1 e ORGA-2)

Per ORGA-1 e ORGA-2 riportiamo in tabella 4.9 alcune proteine d'interesse non incluse tra le rappresentative dei campioni. Vengono osservate tre proteine della membrana lisosomiale: la LAMP-3 e due subunità della pompa protonica lisosomiale utile per garantire l'acidità del lisosoma (V-type proton ATPase subunit B e D); la proteina per il trasporto di lipidi apolipoprotein D, la proteina melanosomiale GPNMB, le proteine ferritin L e H che legano il ferro e la proteina heat shock HSP90. Inoltre consideriamo anche la proteina alpha-synuclein, l'ubiquitina e la proteina Rab-1B che, sebbene descritte tra le proteine dell'eritrocita, riteniamo siano importanti per il ruolo che rivestono nei meccanismi di invecchiamento e neurodegenerazione (le prime due) e nel traffico cellulare (la Rab-1B).

Questi dati mostrano il carattere lisosomiale dell'organello di NM dovuto alla presenza di proteine della matrice e della membrana lisosomiale. Inoltre, si evidenziano alcune proteine come l'alpha-crystallin, l'ubiquitina e le proteine citoscheletriche che non sono presenti nel pigmento di NM. Queste dovrebbero essere localizzate all'interno dell'organello di neuromelanina senza che siano legate al pigmento; oppure, nel caso delle proteine citoscheletriche, potrebbero essere legate alla membrana esterna.

Tabella 4.9. Altre proteine di interesse osservate in ORGA-1 e ORGA-2

GI number	Uniprot entry	Nome Proteina	Gene	Localizzaz. Cellulare	ORGA-1		ORGA-2	
					Media Score	Media Peptidi	Media Score	Media Peptidi
4502163	P05090	Apolipoprotein D	APOD	Extracellular	10.15	1	18.84	19
4505405	Q14956	Transmembrane glycoprotein NMB	GPNMB	Melanosome	10.30	13	10.12	5
13569962	Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	Vesicle	20.21	3	10.14	1
20149498	P02792	Ferritin light chain	FTL	Cytoplasm			33.56	38
56682959	P02794	Ferritin heavy chain	FTH1	Cytoplasm			19.14	4
20149594	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Cytoplasm			18.22	1
4502679	P08962	CD63 antigen (LAMP-3)	CD63	Lysosome			10.15	3
19913428	P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	ATP6V1B2	Lysosome			10.19	2
7706757	Q9Y5K8	V-type proton ATPase subunit D	ATP6V1D	Lysosome			10.17	1
4507109	P37840	Alpha-synuclein	SNCA	Synapse	33.58	15	16.87	3
4507761	P62988	Ubiquitin	RPS27A	Cytosol	31.56	10	43.54	11

## 4.2.2 Proteomica dell'organello di neuromelanina dopo trattamento con shock termico per la rottura delle membrane (ORG-B1 e ORG-B2)

### 4.2.2.1 Campione ORG-B1

Partendo dall'interesse nel determinare le proteine appartenenti all'organello una volta liberato dalle membrane che lo circondano e in seguito all'identificazione una certa contaminazione da eritrociti nei campioni di organelli di NM isolati in toto (ORG-A1 e ORG-A2), è stato messo a punto un metodo per rompere le membrane lipidiche presenti nel campione attraverso shock termico. Un campione di organelli di NM isolati da substantia nigra umana è stato sottoposto a tre cicli di congelamento/ scongelamento ( $-79^{\circ}\text{C} / 37^{\circ}\text{C}$ ) e successive centrifugazioni in modo da rompere le membrane dell'organello e le cellule eritrocitarie. In questo caso l'analisi proteomica MudPIT è stata condotta in singolo a causa della riduzione del campione in seguito al trattamento termico e alle successive centrifugazioni. Dai dati dell'analisi (ORG-B1) si sono osservate 182 proteine totali delle quali 56 identificate come rappresentative (con un numero di peptidi maggiore o uguale a due e uno score  $\geq 10.99$  almeno in una delle tre iniezioni) (tabella 4.10, fig. 4.9, elenco completo in Appendice, tabella A).

Tabella 4.10. Riepilogo dell'analisi proteomica di ORG-B1 e ORG-B2

Campione	Proteine Totali	Proteine rappresentative (numero peptidi $\geq 2$ ; score $\geq 10.99$ )	Proteine presenti anche in eritrociti tra le rappresentative	Proteine utilizzate per la sovrapposizione (numero peptidi $\geq 2$ ; score $\geq 10.99$ )
ORG-B1	182	(31%) 56	(32%) 18	(52%)* 95
ORG-B2	81	(25%) 20	(25%) 5	(56%)* 45
COMUNI	40	(43%) 17	(24%) 5	32

\* Percentuale sulle proteine totali

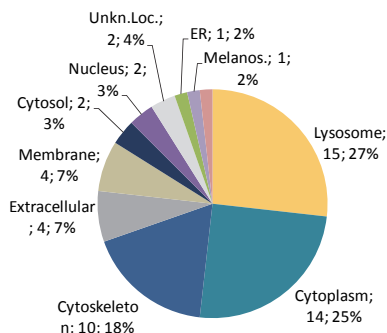


Figura 4.9. Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative identificate in ORG-B1 .

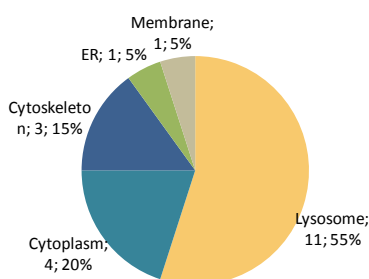
Tra le 56 proteine rappresentative sono presenti 15 proteine lisosomiali (27%) (fig. 4.9), compresa la LIMP2 che è una tipica proteina della membrana lisosomiale

osservata in abbondanza anche nei campioni di organelli isolati in toto (ORG-A1 e ORG-A2). Tra le altre proteine sono state identificate anche quelle citoscheletriche (tubulin alpha, tubulin beta), la apolipoprotein D (deputata al trasporto lipidico), la proteina phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4) importante per la risposta allo stress ossidativo, la ferritin L e la ferritin H coinvolte nell'omeostasi del ferro. Inoltre, tra le proteine rappresentative, sono presenti proteine citoplasmatiche e citoscheletriche identificate solo in ORG-A1 e ORG-A2 come la alpha-crystallin, l'ubiquitina e la proteina TPPP coinvolte nel folding proteico e nella formazione di aggregosomi.

Da questa analisi si osserva che tra le proteine rappresentative quelle osservate anche negli eritrociti sono 18 (32%) contro le 52 (63%) osservate nell'organello non trattato con shock termico (org-A1,2). In questo caso le proteine osservate anche negli eritrociti non vengono sottratte.

#### 4.2.2.2 Campione ORG-B2

Dall'analisi di una seconda preparazione di organelli trattati con shock termico si osservano soltanto 81 proteine delle quali 20 sono definite rappresentative (fig. 4.10, tabella 4.9, elenco completo in Appendice, tabella A). Molte proteine sono state identificate con parametri quantitativi più bassi rispetto alle stesse proteine osservate nel primo replicati (ORG-B1). Il minor numero di proteine e gli scores più bassi sono dovuti ad una minore resa di purificazione di questo campione dovuta probabilmente alla scarsa conservazione del tessuto<sup>a</sup>. In ogni caso, i risultati di questa analisi mostrano un'elevata percentuale di proteine lisosomiali (55%) e la presenza di LIMP2 che conferma la conservazione di parte delle membrane. Tra le 20 proteine rappresentative 5 sono di origine eritrocitaria, nello specifico: 4 catene dell'emoglobina e la tubulina.

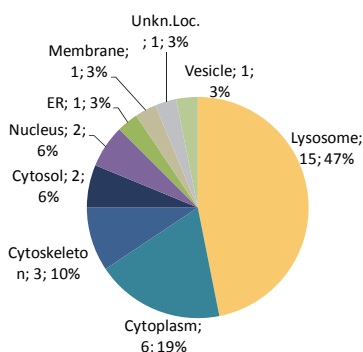


**Figura 4.10.** Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine rappresentative identificate in ORG-B2.

<sup>a</sup> Durante la scrittura di questa tesi è in corso la ripetizione dell'esperimento ORG-B2 con l'utilizzo di maggiori quantità di campione di partenza in modo da ottenere un adeguato replicato di ORG-B1.

#### 4.2.2.3 Proteine comuni ai due campioni di dell'organello di neuromelanina dopo trattamento con shock termico (ORG-B1,2)

A causa della scarsa disponibilità di campione analizzato, i due campioni sono stati confrontati selezionando le proteine rappresentative con parametri quantitativi meno stringenti di quelli usati per gli altri campioni: abbiamo considerato rappresentative le proteine osservate con un numero di peptidi  $\geq 2$  ma con score superiori a 10.00 (rispetto al limite di 10.99 usato per gli altri confronti). Da questa sovrapposizione risultano 32 proteine condivise delle quali 15 sono lisosomiali (48%) (tab. 4.11, fig. 4.11), compresa la proteina LIMP2 della membrana lisosomiale. Tra le proteine comuni osserviamo poi la alpha-crystallin, la ferritin L, la TPPP, la tubulin alpha, la phospholipase D3 e la Ras-related protein Ral-A (RALA) importante per il traffico cellulare. Dall'analisi di questo campione si osservano 5 proteine tipicamente eritrocitarie come residuo della contaminazione.



**Figura 4.11.** Distribuzione della localizzazione cellulare delle proteine osservate con un numero di peptidi  $\geq 2$  e condivise da ORG-B1 e ORG-B2 .

Confrontando il numero di peptidi e gli scores di questi campioni con quelli dell'organello isolato in toto (ORG-A1 e ORG-A2) si può notare che, soprattutto in ORG-B1, molte proteine sono associate a valori quantitativi più elevati, tra queste soprattutto quelle lisosomiali. Questo indica che il trattamento termico, portando all'eliminazione di gran parte della contaminazione da eritrociti, permette l'identificazione di un numero maggiore di peptidi specifici dell'organello. I dati dimostrano inoltre che la proteomica dell'organello di neuromelanina isolato in toto non è molto differente da quella dell'organello trattato con shock termico. Il trattamento termico e le successive centrifugazioni non sono quindi sufficienti per rompere e separare completamente le membrane dell'organello di NM. Solitamente, lo stesso trattamento di shock termico usato qui, in organelli simili come melanosomi [151] e lisosomi [280], provoca la perdita completa delle membrane. È probabile che nel caso dell'organello di NM, avvenga la formazione di interazioni stabili (covalenti o di adsorbimento) tra la membrana e il contenuto dell'organello (NM, porzione lipidica e matrice proteica). Ciò potrebbe avvenire considerando che il periodo di turn-over dell'organello di NM, essendo un organello di accumulo in cellule neuronali che non si rigenerano, è certamente più lungo del normale periodo di turn-over di altri organelli come i melanosomi. Inoltre, la NM

contenuta nell'organello è nota per possedere un potere ossidante e un elevato contenuto di ferro. Questa condizione e i lunghi tempi di vita dell'organello potrebbero contribuire ad aumentare la reattività delle proteine e dei lipidi in esso contenuti e favorire la formazione di legami covalenti tra le molecole contenute nell'organello e la membrana dell'organello stesso.

**Tabella 4.11. Proteine rappresentative (osservate con un numero di peptidi  $\geq 2$ ) e comuni ai campioni ORG-B1 e ORG-B2**

GI number	Uniprot entry	Nome	Gene	Localizzaz. Cellulare	ORG-B1		ORG-B2	
					Score Medio	Media peptidi	Score Medio	Media peptidi
4503057	P02511	Alpha-crystallin B chain	CRYAB	Cytoplasm	100.32	68	10.14	2
20149498	P02792	Ferritin light chain	FTL	Cytoplasm	40.23	17	10.15	2
4504345	P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	Cytoplasm	20.25	28	20.26	30
4504351	P02042	Hemoglobin subunit delta	HBD	Cytoplasm	30.24	20	58.25	19
4504349	D9YZU5	Hemoglobin, beta	HBB	Cytoplasm	54.27	77	18.24	4
29446	n.d.	unnamed protein product [Hemoglobin subunit beta]		Cytoplasm	18.16	21	10.18	3
2119276	Q6LC01	MRNA encoding beta-tubulin.	TUBB	Cytoskeleton	90.41	33	20.23	6
14389309	Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Cytoskeleton	54.27	24	20.16	3
5902018	O94811	Tubulin polymerization-promoting protein	TPPP	Cytoskeleton	70.27	33	20.22	8
4503475	Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	Cytosol	10.23	2	10.13	3
109132400	Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	FHL1	Cytosol	20.19	7	10.17	3
1575347	Q8IV08	Phospholipase D3	PLD3	ER	48.31	25	40.29	30
8247915	Q13510	Acid ceramidase	ASAH1	Lysosome	60.31	59	20.16	9
825628	P15848	Arylsulfatase B	ARSB	Lysosome	10.16	2	10.12	2
4503139	P07858	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	78.30	48	40.24	21
3929733	Q6LAF9	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	18.30	9	10.24	11
4503143	P07339	Cathepsin D	CTSD	Lysosome	80.27	63	10.23	13
22538442	Q9UBR2	Cathepsin Z	CTSZ	Lysosome	20.17	5	10.18	4
15080291	Q9UHL4	Dipeptidyl-peptidase 2	DPP7	Lysosome	20.17	2	10.17	2
4503987	Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	Lysosome	100.25	51	70.23	44
4557659	P22304	Iduronate 2-sulfatase	IDS	Lysosome	20.19	2	40.22	11
4826940	P42785	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	Lysosome	30.22	14	40.16	8
5031631	Q14108	Lysosome membrane protein 2 (LIMP2)	SCARB2; LIMP2	Lysosome	30.32	3	10.15	2
24475586	Q9UM22	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1	Lysosome	68.24	60	50.21	24

4506031	P50897	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	Lysosome	90.31	36	30.16	10
6808138	Q9HAT2	Sialate O-acetyltransferase	SIAE	Lysosome	120.34	95	100.28	61
2408232	O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	Lysosome	60.27	29	40.22	8
68509930	P02686	Myelin basic protein	MBP	Membrane	210.28	171	140.24	120
4826734	P35637	RNA-binding protein FUS	FUS	Nucleus	10.39	2	10.20	2
4506901	P84103	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3	Nucleus	20.17	3	10.14	6
60729665	NoSP	beta3-glycosyltransferase-like protein		Unknown Cell Location	10.13	2	10.13	2
33946329	P11233	Ras-related protein Ral-A	RALA	Vesicle	10.17	2	10.21	2

#### 4.2.2.4 Altre proteine di interesse osservate in ORG-B1 e ORG-B2

Anche per i campioni ORG-B1 e ORG-B2, riteniamo che alcune proteine siano importanti per la nostra discussione sebbene non siano state identificate in entrambi i replicati o come rappresentative in entrambi i replicati.

Di queste proteine (tabella 4.12), oltre alla ferritin H (importante per l'omeostasi del ferro) e l'ubiquitin, quelle elencate di seguito vengono identificate solamente in ORG-B1 e non nel suo replicato ORG-B2 a causa della scarsa quantità di quest'ultimo. Si osservano la apolipoprotein D (trasporto dei lipidi e risposta a stress ossidativo) e la proactivator polypeptide (saposin)(PSAP) (degradazione dei lipidi di membrana), peraltro già identificate come rappresentative in NM-1 e NM-2. Altre proteine sono: la putative phospholipase B-like 2 (PLBD2), la proteina melanosomiale GPMNB, la proteina phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4) (importante nella protezione dei lipidi da stress ossidativo) e, infine, tre proteine tipiche della membrana del lisosoma: lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1), CD63 antigen (LAMP-3) e la proteina vacuolar ATPase assembly integral membrane protein (VMA21) coinvolta nell'assemblaggio della pompa protonica del lisosoma. Le proteine appartenenti alla membrana lisosomiale appena elencate, sebbene osservate attraverso pochi peptidi, confermano la conservazione di parte delle membrane lisosomiali come già accennato precedentemente.

Tabella 4.12. Altre proteine di interesse osservate in ORG-B1 e ORG-B2

GI number	Uniprot entry	Nome Proteina	Gene	Localizzaz. Cellulare	ORG-B1		ORG-B2	
					Peptidi	Score	Peptidi	Score
56682959	P02794	Ferritin heavy chain	FTH1	Cytoplasm	5	20.21	1	10.10
4502163	P05090	Apolipoprotein D	APOD	Extracellular	20	20.19		
27734917	Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2	Lysosome	2	10.23		
63025214	Q3ZAQ7	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21	VMA21	Lysosome	1	10.13		
112380628	P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1)	LAMP1	Lysosome	1	10.21		

#### 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4502679	P08962	CD63 antigen (LAMP-3)	CD63	Lysosome	2	10.14		
11386147	P07602	Proactivator polypeptide [Cleaved into: Saposin-A,B,C,D]	PSAP	Lysosome	4	20.14		
4505405	Q14956	Transmembrane glycoprotein NMB	GNMB	Melanosome	28	20.31		
825667	P36969	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	Cytoplasm	3	20.21		
4507761	P62988	Ubiquitin	RPS27A	Cytosol	78	38.23	1	10.11



### 4.3 Riepilogo delle proteine significative

Dall'analisi dei tre diversi campioni: NM isolata da tessuto con proteinasi (NM-1,2), organello di NM isolato in toto (ORG-A1,2) e organello di NM trattato per la rottura delle membrane (ORG-B1,2) abbiamo ottenuto una lista di 48 proteine rappresentative (tab. 4.13). Riportiamo inoltre 13 proteine che abbiamo definito d'interesse anche se non rappresentative (tab. 4.14).

Tabella 4.13. Lista delle 48 proteine rappresentative identificate nei tre tipi di campioni.

GI number	Uniprot entry	Nome Proteina	Gene	Localizzaz. Cellulare	Campioni in cui è stata osservata la proteina (in corsivo minuscolo se osservata ma non tra le rappresentative)			Eritrociti <sup>a</sup>
4503057	P02511	Alpha-crystallin B chain	CRYAB	Cytoplasm	ORG-A1+2	ORG-B1+2		
20149498	P02792	Ferritin light chain	FTL	Cytoplasm	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2	NM-1+2	x
4504345	P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	Cytoplasm		ORG-B1+2	<i>nm-1+2</i>	x
4504351	P02042	Hemoglobin subunit delta	HBD	Cytoplasm		ORG-B1+2	<i>nm-1+2</i>	x
4504349	D9YZU5	Hemoglobin, beta	HBB	Cytoplasm		ORG-B1+2		x
29446	NO SP	unnamed protein product		Cytoplasm		ORG-B1+2		x
1147813	P15924	Desmoplakin	DSP	Cytoskeleton	ORG-A1+2		<i>nm-1+2</i>	
14017973	Q96JE9	Microtubule-associated protein 6	MAP6	Cytoskeleton	ORG-A1+2	<i>org-b1+2</i>		
8400711	P10636	Microtubule-associated protein tau	MAPT	Cytoskeleton	ORG-A1+2	<i>org-b1+2</i>		
2119276	Q6LC01	MRNA encoding beta-tubulin.	TUBB	Cytoskeleton		ORG-B1+2	<i>nm-1+2</i>	
14389309	Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Cytoskeleton		ORG-B1+2	<i>nm-1+2</i>	x
21361322	P04350	Tubulin beta-4 chain	TUBB4	Cytoskeleton	ORG-A1+2	<i>org-b1+2</i>	<i>nm-1+2</i>	
5902018	O94811	Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP)	TPPP	Cytoskeleton	ORG-A1+2	ORG-B1+2		
4503475	Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	Cytosol		ORG-B1+2		x
109132400	Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	FHL1	Cytosol	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2		
1575347	Q8IV08	Phospholipase D3	PLD3	ER	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
4502163	P05090	Apolipoprotein D	APOD	Extracellular	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	NM-1+2	
8247915	Q13510	Acid ceramidase	ASAH1	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
825628	P15848	Arylsulfatase B	ARSB	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2	NM-1+2	
4503139	P07858	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
3929733	Q6LAF9	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2	<i>nm-1+2</i>	
4503143	P07339	Cathepsin D	CTSD	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
4503155	P07711	Cathepsin L1	CTSL1	Lysosome			NM-1+2	
22538442	Q9UBR2	Cathepsin Z	CTSZ	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2	NM-1+2	

1905907	O00115	Deoxyribonuclease2-alpha	DNASE 2	Lysosome	<i>org-a1+2</i>		NM-1+2	
15080291	Q9UHL4	Dipeptidyl-peptidase 2	DPP7	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2		
4503987	Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
4557659	P22304	Iduronate 2-sulfatase	IDS	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2	NM-1+2	
126590	P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	NM-1+2	
4826940	P42785	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
5031631	Q14108	Lysosome membrane protein 2 (LIMP2)	SCARB 2 LIMP2	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2		
24475586	Q9UM22	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
4503899	P34059	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	GALNS	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	NM-1+2	
4506919	P51688	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	SGSH	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	NM-1+2	
4506031	P50897	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
11386147	P07602	Proactivator polypeptide [Cleaved into: Saposin-A,B,C,D]	PSAP	Lysosome		<i>org-b1+2</i>	NM-1+2	
27734917	Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2	Lysosome	ORG-A1+2	<i>org-b1+2</i>	NM-1+2	
6808138	Q9HAT2	Sialate O-acetyltransferase	SIAE	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
2408232	O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	Lysosome	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
68509930	P02686	Myelin basic protein	MBP	Membrane	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2	
4502301	P48201	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial subunit c	ATP5G 3	Mitochondrion			NM-1+2	
4503117	P04080	Cystatin-B	CSTB	Nucleus	<i>org-a1+2</i>		NM-1+2	x
4826734	P35637	RNA-binding protein FUS	FUS	Nucleus	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2		
4506901	P84103	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3	Nucleus	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2		
4757922	P23435	Cerebellin-1	CBLN1	Synapse	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	NM-1+2	
32698861	Q8IUK8	Cerebellin-2	CBLN2	Synapse			NM-1+2	
60729665	NoSP	beta3-glycosyltransferase-like protein - human		Unknown Cell Location	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2	<i>nm-1+2</i>	
33946329	P11233	Ras-related protein Ral-A	RALA	Vesicle	<i>org-a1+2</i>	ORG-B1+2		x

(\*) : Proteine specifiche definite grazie a esperimento di validazione (sez.4.1.2.5)

<sup>a</sup> La colonna "eritrociti" indica se la proteina è presente anche tra le proteine dell'eritrocita [278], [279].

Tabella 4.14. Riepilogo delle proteine di interesse anche se non osservate tra le rappresentative in nessuno dei tre campioni.

GI number	Uniprot entry	Nome Proteina	Gene	Localizza. Cellulare	ORG-A1+2	ORG-B1+2	NM-1+2
56682959	P02794	Ferritin heavy chain	FTH1	Cytoplasm	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	<i>nm-1+2</i>
20149594	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Cytoplasm	<i>org-a1+2</i>		<i>nm-1+2</i>
825667	P36969	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	Cytoplasm		<i>org-b1+2</i>	
5453678	P61916	Epididymal secretory protein E1 (Niemann-Pick disease type C2)	NPC2	Lysosome			<i>nm-1+2</i>
112380628	P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1)	LAMP1	Lysosome		<i>org-b1+2</i>	
4502679	P08962	CD63 antigen (LAMP-3)	CD63	Lysosome	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	
19913428	P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	ATP6V1B2	Lysosome	<i>org-a1+2</i>		
7706757	Q9Y5K8	V-type proton ATPase subunit D	ATP6V1D	Lysosome	<i>org-a1+2</i>		
63025214	Q3ZAQ7	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21	VMA21	Lysosome		<i>org-b1+2</i>	
4505405	Q14956	Transmembrane glycoprotein NMB	GNMB	Melanosome	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	<i>nm-1+2</i>
13569962	Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	Vesicle	<i>org-a1+2</i>		
4507761	P62988	Ubiquitin	UBC	Cytosol	<i>org-a1+2</i>	<i>org-b1+2</i>	<i>nm-1+2</i>
4507109	P37840	Alpha-synuclein	SNCA	Synapse	<i>org-a1+2</i>		

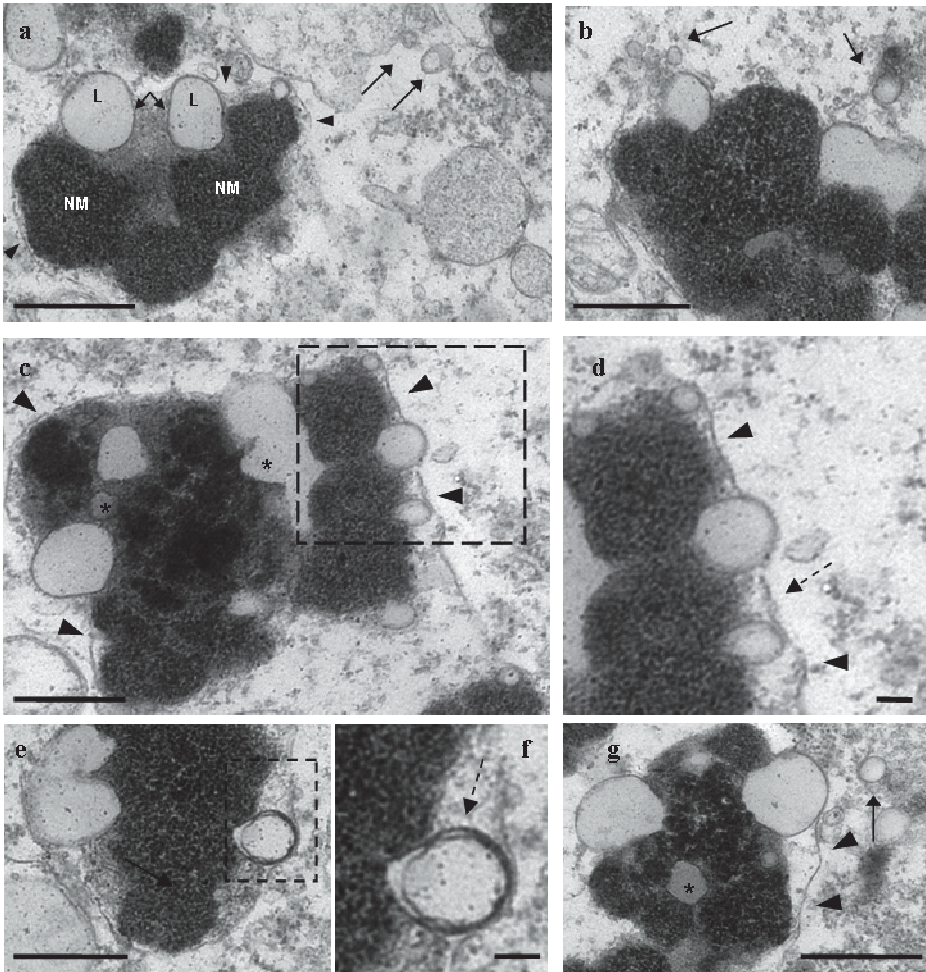
## 4.4 *Analisi ultrastrutturali dell'organello di NM*

### 4.4.1 *Morfologia dell'organello di NM*

*È stato svolto lo studio della morfologia dell'organello di NM per meglio comprendere la sua struttura, anche alla luce dei risultati di proteomica ottenuti.*

In figura 4.12 sono riportate recenti immagini di microscopia elettronica di SN in un soggetto di 63 anni. Gli organelli di NM presentano dimensioni che vanno da 0.5 a 3.0  $\mu\text{m}$  con un valore medio che si aggira intorno a 1.0  $\mu\text{m}$ . In alcuni organelli di NM si osserva una membrana esterna ben distinguibile (fig. 4.12 a,c,d,g). Osservando la maggior parte degli organelli si possono identificare due componenti principali distinguibili per la diversa densità elettronica (fig. 4.12 a). Il pigmento di NM è la componente più elettrone-densa e comunemente è la principale componente degli organelli di NM (in media più del 50% della superficie osservata). La NM ha un'apparenza granulare e si presenta con differenti densità anche all'interno dello stesso organello. Si osservano poi i corpi lipidici (o gocce lipidiche) riconoscibili per la forma tipicamente tondeggiante, generalmente poco elettrone-densi e con variabile osmiofilicità. Sono una componente caratteristica di tutti gli organelli e occupano mediamente il 30-40% dell'organello, spesso sono circondati da una membrana facilmente distinguibile da quella che circonda l'organello in toto (fig. 4.12 a,d). Si osservano anche componenti lipidiche con una struttura irregolare e più elettrone-densa soprattutto al centro dell'organello (fig. 4.12 c,e,g). Inoltre è spesso presente una componente con una densità elettronica intermedia tra quelle delle NM e quella dei corpi lipidici che viene attribuita a una componente di origine proteica addensata, analoga a quella presente nei lisosomi. Questa occupa circa il 10-20% dell'organello e spesso è localizzata tra il pigmento e la membrana dell'organello (fig. 4.12 a), oppure all'interno della granulosità del pigmento di NM.

Questi aspetti tipici della maggior parte degli organelli sono riconosciuti fin dai primi studi morfologici condotti a partire dagli anni '60 [167], [168], [228]. In queste immagini e in altre pubblicate recentemente [229] è possibile una doppia membrana che circonda porzioni dell'organello oppure i corpi lipidici (fig. 4.12 d, f); la doppia membrana è riconducibile a quella che caratterizza gli autofagosomi e questo dato è in accordo con l'origine autofagica degli organelli di NM. Un altro aspetto singolare che non è stato riportato in altri studi morfologici è rappresentato da alcune vescicole (o piccoli corpi lipidici) presenti in prossimità degli organelli di NM con un aspetto molto simile a quello dei corpi lipidici osservabili al suo interno, (fig. 4.12 a, b, g). Il loro aspetto, molto simile a quello dei corpi lipidici interni all'organello, suggerisce che potrebbero essere vescicole di trasporto presenti nel citosol e destinate alla fusione con l'organello di NM stesso. Per un limite strumentale e dovuto alla conservazione del tessuto, non è possibile osservare se ci sono microtubuli attraverso i quali le vescicole potrebbero essere trasportate secondo i meccanismi di traffico cellulare.

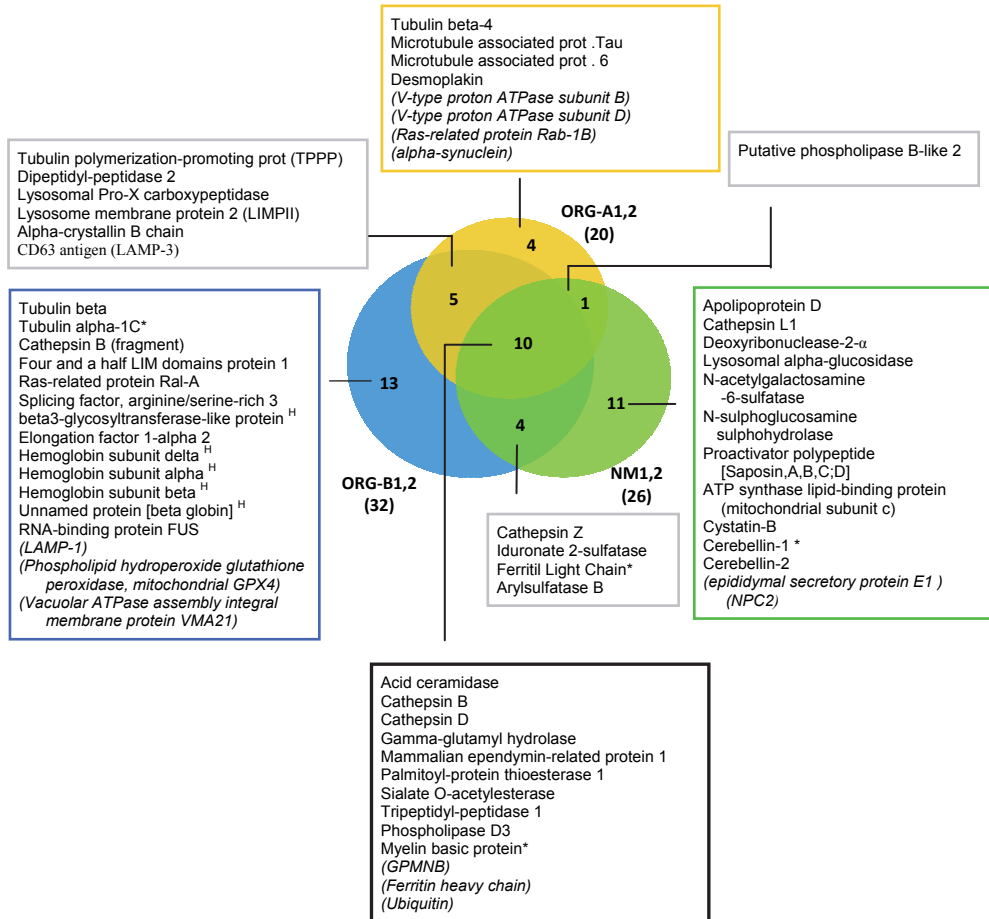


**Figura 4.12: Morfologia degli organelli di NM osservati in tessuto umano attraverso microscopio elettronico.** Nei pannelli vengono rappresentati diversi organelli di NM con alcune caratteristiche comuni indicate in [a]: corpi lipidici (L), neuromelanina (NM), membrana (punta di freccia). In alcuni pannelli [f,d] si osserva una doppia membrana tipica degli autofagosomi (freccia tratteggiata). In altri [a,b,g] si possono notare alcune vescicole o piccoli corpi lipidici intorno agli organelli (freccia), è possibile che questi siano destinati alla fusione con l'organello. Si osservano inoltre corpi lipidici tondeggianti, uniformi e spesso circondati da membrana (doppia freccia in [a]) nella porzione più esterna dell'organello [a,c,d] e corpi lipidici più irregolari e più scuri all'interno di questi (asterisco) [c,g]. Le barre in [a,b,c,e,g] sono da 0,5  $\mu\text{m}$ ; le barre in [d, f] sono da 0,1  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 Discussione dei dati ottenuti e implicazioni biologiche

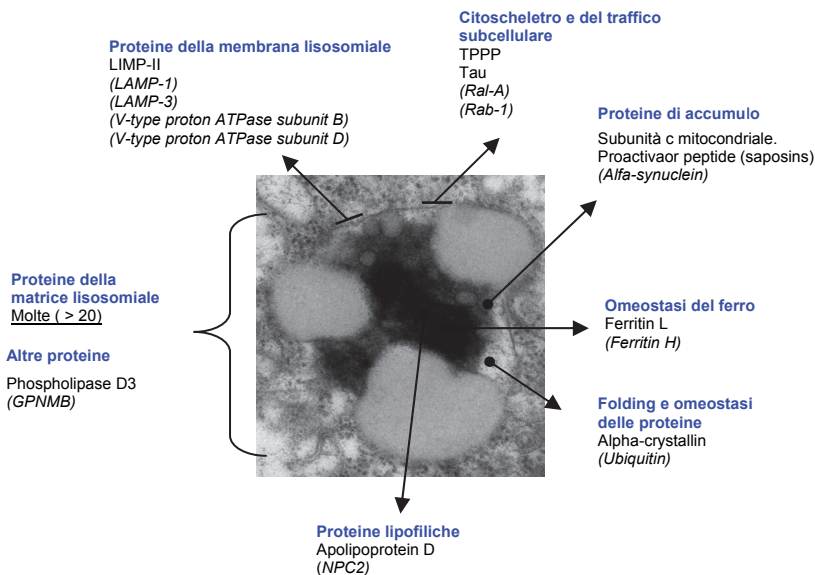
### 4.5.1 Confronto tra i campioni analizzati

In questo studio sono state identificate in tutto 1142 proteine nei tre diversi campioni. Tra queste, 48 proteine sono state selezionate con elevata confidenza e definite rappresentative dei i campioni. In figura 4.13 vengono rappresentate in un diagramma di Venn le 48 proteine rappresentative a seconda del campione i cui sono state osservate.



**Figura 4.13: Diagramma di Venn delle proteine significative identificate nei diversi campioni.** Viene riportata la sovrapposizione tra le proteine comuni a ognuno dei tre tipi di campioni: NM isolata da tessuto con proteinasi (NM-1,2), organello di NM isolato in toto (ORG-A1,2) e organello di NM trattato per la rottura delle membrane (ORG-B1,2). Per ogni campione viene indicato tra parentesi il numero di proteine rappresentative totali. Le proteine *in corsivo* tra parentesi sono le proteine definite di interesse ma non osservate come rappresentative nei campioni; queste non sono incluse tra i valori del diagramma di Venn. Con il simbolo (<sup>H</sup>) vengono segnalate le proteine tipicamente eritrocitarie rimaste come residuo di contaminazione. Con l'asterisco (\*) vengono segnalate le proteine particolarmente affini alla NM e potenzialmente aspecifiche come emerso dall'esperimento di validazione riportato alla sez. 4.1.2.5.

Dalla sovrapposizione dei campioni si possono notare alcuni gruppi di proteine peculiari per un tipo di campione. In figura 4.14 rappresentiamo alcune proteine significative a seconda della loro probabile localizzazione all'interno dell'organello, in base alle indicazioni derivate da questo studio.



**Figura 4.14:** Rappresentazione della presunta localizzazione di alcune proteine identificate all'interno dell'organello di NM osservato attraverso microscopia elettronica. Le proteine *in corsivo* tra parentesi sono le proteine definite di interesse ma non osservate come rappresentative nei campioni. In blu le proteine.

I dati evidenziano che non ci sono differenze evidenti tra l'analisi degli organelli di NM isolati in toto (ORG-A1,2) e gli organelli di NM sottoposti a shock termico (ORG-B1,2). Ad esempio, in ORG-B1,2, oltre alla riduzione della contaminazione da eritrociti e l'identificazione di alcune proteine esclusive per questo campione come la GPX4, non è stata osservata la perdita di tutte le proteine della membrana lisosomiale come ci si sarebbe aspettato. Sono state identificate proteine tipiche della membrana lisosomiale come la LIMP-II e LAMP-3 (in entrambi i campioni) e le proteine LAMP-1 (solo in ORG-B1,2), e Subunità B e D della pompa protonica ATPasi (solo in ORG-A1,2). È presumibile che l'organello di NM sia caratterizzato da forti interazioni tra alcune porzioni della membrana lipidica e il contenuto proteico, melanico e lipidico dell'organello stesso. Emerge quindi che lo shock termico non sia sufficiente a rimuovere tutte le membrane dell'organello e che ciò sia possibile solo in seguito al drastico trattamento utilizzato per isolare la NM come pigmento. Altre proteine identificate solo nei campioni derivate dagli organelli sono le proteine del citoscheletro (tubuline), proteine citoplasmatiche importanti per il folding proteico (alfa-crystallin), proteine tipiche per la formazione di aggregati cellulari (TPPP e alpha-synuclein), importanti per il traffico vescicolare Ral-A e Rab-1b e coinvolte della risposta a stress ossidativo dei lipidi (GPX4). Queste proteine, non essendo presenti nei campioni di NM è indice del fatto che non fanno parte del "core" di proteine che costituiscono il pigmento; sono proteine che

dovrebbero trovarsi legate alla membrana (quelle citoscheletriche) oppure tra la membrana dell'organello e il pigmento di NM (alpha-crystallin, GPX4) (fig. 4.14)

Le proteine osservate come rappresentative solamente in NM-1,2 sono 11 (più una di interesse (NPC2)). Tra queste, troviamo proteine legate ai lipidi come il proactivator polipeptide (saposin) che agisce come co-attivatore nella degradazione di sfingolipidi e che si accumula facilmente in malattie lisosomiali; la proteina NPC2, importante per il trasporto e la degradazione di lipidi come il colesterolo. Inoltre identifichiamo solo nel campione di NM la ATP synthase lipid-binding protein (mitochondrial subunit c) (proteina lipofilica e di accumulo) e della apolipoprotein D deputata al trasporto dei lipidi e alla risposta a stress ossidativo a carico dei lipidi.

Delle 11 proteine osservate come rappresentative solo in NM-1,2, la catepsina L1, la mitochondrial subunit c e la cerebellina 2 non sono state osservate negli altri campioni nemmeno con scores inferiori a 10.99 (tabella 4.12). In teoria queste proteine dovrebbero essere identificabili anche in ORG-A1,2 e ORG-B1,2 dato che la NM, nel tessuto, è originalmente contenuta nell'organello. Se la cerebellin 2 è stata definita come aspecifica (vedi sez. 4.1.2.5) e questo spiega la sua presenza esclusiva in questo campione, è difficile capire perché la catepsin L1 e la mitochondrial subunit c vengono osservate esclusivamente in questo tipo di campione. E' possibile che queste proteine siano arricchite in modo particolare nelle porzioni interne del pigmento e che nei campioni di organelli isolati (ORG-A1,2 e ORG-B1,2) non siano abbastanza concentrate da poter essere identificate. La mitochondrial subunit c, insieme al proactivator polipeptide (saposin), è una proteina che si accumula all'interno di lisosomi danneggiati ed è un biomarcatore tipico di malattie lisosomiali come le lipofuscinosi ceroidi neuronali; date queste caratteristiche, che possono suggerire la bassa capacità degradativa dell'organello di NM, siamo interessati a validare attraverso immuno microscopia elettronica la presenza di questa proteina.

In definitiva è stato identificato un numero relativamente elevato di proteine nei campioni di NM isolata da tessuto nonostante i drastici trattamenti a cui è sottoposto durante le procedure di isolamento (soluzioni saline, SDS, proteinasi, estrazioni in solvente organico). Questo significa che il pigmento di NM ha la proprietà di legare e trattenere un numero elevato di proteine, probabilmente sottoforma di aggregati difficili da disgregare, se non attraverso lunghe procedure di digestione triptica in presenza di surfattanti come quelle utilizzate prima dell'analisi proteomica.

Tra le proteine rappresentative in comune ai campioni NM-1,2 e ORG-B1,2 è di notevole importanza la presenza di ferritina L importante per l'accumulo di Fe nel cervello. Data l'importanza di questa proteina e la possibilità che si leghi alla NM per affinità con il ferro presente al suo interno (vedi 4.1.2.5), sarà oggetto di prossimi studi l'ulteriore validazione di questa proteina.

Le proteine condivise dai tre diversi campioni (10) sono tutte proteine lisosomiali tranne la myelin basic protein e la phospholipase D3. Le proteine lisosomiali sono infatti le proteine più rappresentate in tutti i campioni, soprattutto nei campioni di NM isolata dal tessuto (NM-1,2) che ne presentano 18 in comune solo tra le rappresentative (rispetto a 12 e 15 in ORG-A1,2 e ORG-B1,2 rispettivamente).



Come discusso nelle sezioni successive, l'organello di NM ha chiaramente un'origine lisosomiale. Oltre a queste proteine, sono state identificate in tutti i campioni la ferritin H, la proteina melanosomiale GPNMB e l'ubiquitina, sebbene con parametri non sufficientemente elevati per poterle definire rappresentative dei campioni.

### 4.5.2 Caratteristiche lisosomiali dell'organello di NM

Già nel 1970, Barden verificò con tecniche istochimiche la colocalizzazione di idrolasi lisosomiali e neuromelanina in neuroni di *Macaca mulatta* [281]; più recentemente, l'analisi proteomica di "granuli" di NM isolati da tessuto congelato ha dimostrato la presenza di proteine lisosomiali [203]. Nei campioni analizzati in questo lavoro, le proteine lisosomiali sono la classe di proteine più rappresentata. In tabella 4.15 vengono elencate le proteine lisosomiali osservate nel nostro campione e attualmente riconosciute come appartenenti al lisosoma [282], [283]. Nella tabella 4.15 sono inoltre riportati i valori di score delle proteine che con certezza appartengono alla matrice di lisosomi da cervello umano [284]. Nei tre tipi di campione studiati troviamo 35 proteine lisosomiali (28 della matrice, 7 transmembrana) delle quali 21 (20 della matrice, 1 transmembrana) osservate come rappresentative. Sebbene nel database Uniprot (manually reviewed) siano depositate 210 proteine umane con localizzazione lisosomiale, attualmente sono considerate come tipiche del lisosoma umano circa 60 proteine della matrice (52 nei lisosomi da cervello [284]) e più di 45 proteine transmembrana [283].

#### 4.5.2.1 Proteine della membrana lisosomiale

Identifichiamo un numero basso di proteine transmembrana ed esclusivamente nei campioni derivati dall'organello di NM. Sebbene LIMP-II, LAMP-1 e LAMP-2 siano le proteine più abbondanti nella membrana lisosomiale, è stata osservata principalmente LIMP-II con scores discretamente elevati e LAMP-1 in basse quantità. LIMP-II è coinvolta nell'internalizzazione (indipendente dal recettore per il mannosio-6-fosfato) dell'enzima beta-glucocerebrosidasi [285]. Nel nostro campione non osserviamo però la presenza di questo enzima. La LIMP-II fa anche parte, insieme alle proteine omologhe LIMP-II e LAMP3, della famiglia di proteine coinvolte nell'interazione e internalizzazione di colesteril-esteri, estradiolo, fosfolipidi ossidati e altri lipidi attraverso trasportatori del colesterolo LDL e HDL [286]. È stato inoltre dimostrato che LIMP-II lega e internalizza HDL in membrane di endosomi [287], [288] e che la sua over-espressione porta alla formazione di endosomi/lisosomi ingrossati e all'accumulo di colesterolo.

Considerando i tipici corpi lipidici (chiamati anche gocce lipidiche) che occupano buona parte dell'organello di NM e considerando che queste sono dovute all'accumulo di lipidi si può pensare che LIMP-II possa contribuire al trasporto e all'accumulo di lipidi non degradabili e/o fosfolipidi perossidati e potenzialmente tossici in quanto fonti di stress ossidativo. Infine, LIMP-II è una delle poche proteine di membrana osservate anche in corpi di inclusione o "lipofuscin-like bodies" (eterogenei e indegradabili) osservati come materiale di accumulo lisosomiale/autofagico anche in tessuti non soggetti all'invecchiamento come la placenta [289].

Tra le altre proteine di membrana si notano soprattutto alcune subunità della pompa protonica lisosomiale (V-type proton ATPase subunit D e B). Purtroppo, a causa della perdita di parte delle membrane dell'organello in seguito alla degradazione del tessuto post-mortem, non si identificano queste proteine in quantità sufficienti da confermare loro presenza. Tale verifica sarà oggetto di successivi studi di immuno-microscopia elettronica. La validazione delle pompe protoniche confermerebbe che l'organello di NM è un compartimento attivo.

**Tabella 4.15. Proteine lisosomiali osservate nel nostro campione e attualmente riconosciute come appartenenti al lisosoma. Adattata da Lübke et al., Schröder et al., Sleat et al [282–284]**

Proteina	Gene	ORG-A2				Abbondanza (log (e)) delle proteine della matrice identificate in lisosomi da cervello umano*	Localizzazione	Classificazione	Funzione	Malattie associate
		ORG-A2	ORG-B1	NM-1	Score medio NM-2 nei campioni					
Lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP1)	LAMP1	(x)	(x)		10.21	Membrana	Glicoproteina strutturale di membrana	Biogenesi del lisosoma, autofagia, stabilizzazione della membrana		
CD63 (LAMP-3)	CD63	(x)	(x)		10.15	Membrana	Glicoproteina strutturale di membrana	Traffico endosomiale , melanogenesi		
LIMP2	SCARB2	X	X		19.79	Membrana	Glicoproteina strutturale e di trasporto di membrana (?)	Internazionalizzazione della Beta-glucocerebrosidasi, trasporto di lipidi	Sindrome da mioclonia d'azione - insufficienza renale	
Nicastrin	NCSTN	(x)			10.15	Membrana	Enzima	Proteolisi intramembrana, parte del complesso gamma-secreatasi	Alzheimer	
Transmembrane protein 55B	TMEM55B	(x)			10.22	Membrana	Enzima	Iidrolisi di Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate		
V-type proton ATPase (H+ pump)	several subunits	(x)			10.17	Membrana	Trasporto	Pompa protonica, acidificazione del lisosoma	Acidosi tubulare renale, osteoporosi	
Niemann–Pick C1 protein	NPC1	(x)			10.14	Membrana	Trasporto	Traffico del colesterolo	Niemann–Pick disease type C1	
Ganglioside GM2 activator	GM2A	(x)	(x)		10.21	- 16 Matrice	Attivatore di enzimi (co-proteina)	Legato e contribuisce all' idrolisi del ganglioside GM2	GM2-gangliosidosi; AB variant (Tay–Sachs disease; AB variant)	
Proactivator polypeptide [Cleared into: Saposin-A, B, C, D]	PSAP	X	(x)		21.26	- 307 Matrice	Attivatore di enzimi (co-proteina)	Legato e contribuisce all' idrolisi degli sfingolipidi	Malattie di Krabbe e Gaucher	
Acid ceramidase	ASAH1	X	X		35.77	- 303 Matrice	Ceramidasi	Iidrolisi della ceramide in sfingosina e acidi grassi	Malattia di Faber	
Alpha-galactosidase A	GLA	(x)	(x)		12.85	-129 Matrice	Glicosidasi	Iidrolisi dei residui α-D-galattosio, degradazione dei glicosfingolipidi	Malattia di Fabry	
Alpha-glucosidase	GAA	(x)	(x)		18.96	- 281 Matrice	Glicosidasi	Degradazione del glicogeno	Malattia di Pompe	
Beta-hexosaminidase beta chain	HEXB	(x)			15.16	- 240 Matrice	Glicosidasi	Degradazione del ganglioside GM2	Malattia di sandhoff	
Lysosomal alpha-mannosidase	MAN2B1	(x)	(x)		20.16	- 205 Matrice	Glicosidasi	Rimozione di residui di α-mannosio da proteine in fase di degradazione	Monnosidiosi	
Sialate O-acetyltransferase	SIAE	X	X		142.06	- 258 Matrice	Iidrolasi	Rimozione del gruppo O-acetil estere dall'acido statico	Malattia autoimmune tipo 6 (AIS6)	
Phospholipase B-like 1 protein	PLBD2	X	(x)		19.54	- 175 Matrice	Iidrolasi	Iipotetica phospholipase (funzione poco chiara)		

#### 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	X	X	X	46.35	- 302	Matrice	Idrolasi	Rimozione di acidi grassi (legati tramite legame tio-estere) a proteine e peptidi	Ceroidolipofuscinosi neuronale (CLN1)
Deoxyribonuclease II	DNASE2	(X)	X	X	13.09	- 57	Matrice	Nucleasi	Idrolisi di DNA	
Ribonuclease T2	RNASET2	(X)	X	(X)	15.16	- 112	Matrice	Nucleasi	Idrolisi di RNA	
Cathepsin B	CTSB	X	X	X	93.72	- 18	Matrice	Peptidasi	Proteolysis	
Cathepsin D	CTSD	X	X	X	42.46	- 296	Matrice	Peptidasi	Degradazione delle proteine	Ceroidolipofuscinosi neuronale (CLN10)
Cathepsin L	CTSL1	X	X	X	18.53	- 82	Matrice	Peptidasi	Degradazione delle proteine	
Cathepsin Z	CTSZ	(X)	X	X	21.86	- 120	Matrice	Peptidasi	Degradazione delle proteine	
Dipeptidyl peptidase 2	DPP7	X	X	X	36.03	- 245	Matrice	Peptidasi	Degradazione di oligopeptidi	
Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	X	X	X	141.61	- 127	Matrice	Peptidasi	Degradazione di pteroli glutammati (acido folico)	
Pro-Xaa carboxypeptidase	PRCP	X	X	(X)	27.53	- 160	Matrice	Peptidasi	Rimozione di aminoacidi C-ter da peptide come angiotensinina II, III e des-Arg-bradykinin	
Tripeptidyl-peptidase I	TPPI	X	X	X	75.46	- 239	Matrice	Peptidasi	Rimozione di tripeptidi N-ter da polipeptidi	Ceroidolipofuscinosi neuronale (CLN2)
Lysosomal acid phosphatase	ACP2	(X)	(X)	(X)	10.14		Matrice	Fosfatasi	Rimuove gruppi fosfato	
Arylsulfatase B	ARSB	(X)	X	X	21.49	- 116	Matrice	Solfatasi	Rimozione del gruppo solfato nella degradazione di glicosaminoglicani (condroitin-S dermatan-S)	Mucopolisaccaridosi type VI (Maroteaux-Lamy syndrome)
Iduronate 2-sulfatase	IDS	X	X	X	46.92	- 227	Matrice	Solfatasi	Rimozione del gruppo solfato nella degradazione di glicosaminoglicani (eparan-S dermatan-S)	Mucopolisaccaridosi type II (Hunter syndrome)
N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	GALNS	(X)	(X)	X	15.56	- 126	Matrice	Solfatasi	Rimozione del gruppo solfato nella degradazione di glicosaminoglicani (condroitin-S cheratan-S)	Mucopolisaccaridosi type IVA (Morquio syndrome A)
N-sulphoglucosamine sulphohydrolase/heparan N-sulfatase	SGSH	(X)	(X)	X	23.10	- 99	Matrice	Solfatasi	Rimozione del gruppo solfato nella degradazione di glicosaminoglicani (eparan-S)	Mucopolisaccaridosi type IIIA (Sanfilippo syndrome A)
NPC2 protein	NPC2	(X)	(X)	(X)	10.16	- 96	Matrice	Trasporto	Trasporto per l'omeostasi (degradazione) del colesterolo	Niemann-Pick disease type C2
CREG1, cellular repressor of E1A-stimulated gene 1	CREG1	(X)	(X)	(X)	17.71	- 65	Matrice	Sconosciuta	Sconosciuta	
Mammalian ependymin related protein 1	EPDR1	X	X	X	89.23	- 147	Matrice	Sconosciuta	Sconosciuta	

X: presente nei campioni come rappresentativa (osservata in entrambi i replicati, con >2 peptidi e score >10.99) ;

(X): presente nei campioni come non rappresentativa.

<sup>a</sup> La grandezza in valore assoluto dello score rappresenta l'abbondanza della proteina [290].

Infatti, le idrolasi lisosomiali contenute nell'organello necessitano di un ambiente a pH acido (circa pH 4.5 – 5.5) per svolgere un'attività enzimatica adeguata [291]. Se fosse confermata la bassa quantità di pompe protoniche significherebbe che gli organelli di NM sarebbero caratterizzati da bassi livelli di catabolismo e da una certa staticità; questo fatto sarebbe in linea con l'accumulo e/o il basso turn-over di questi organelli nei neuroni durante l'invecchiamento e con la loro morfologia molto eterogenea, tipica di lisosomi tardivi e di organelli di accumulo presenti in malattie lisosomiali (lipofuscinosi etc.)

Se da una parte, le proteine LAMP-1 e LAMP3 sono presenti solo in tracce, la proteina di membrana LAMP-2, responsabile della degradazione selettiva di proteine citosoliche attraverso autofagia mediata da chaperoni (CMA), è assente nei nostri campioni. Questo dato è in accordo con studi che dimostrano una progressiva diminuzione nell'espressione di questa proteina e il conseguente accumulo di materiale non degradato all'interno dei lisosomi durante l'invecchiamento [292], [293].

#### **4.5.2.2 Proteine della matrice lisosomiale**

Nei campioni si osservano peptidasi, solfatasi, nucleasi e glicosidasi (tab. 4.15). Tra le **peptidasi** sono presenti le proteasi catepsin D, B, L1 e Z. La catepsin D è la principale aspartato proteasi del lisosoma e viene identificata con score elevato in tutti i campioni. Questa proteina è sovra-espressa durante l'invecchiamento e si accumula in neuroni affetti da malattia di Alzheimer [294]. Topi knockout per la catepsin D mostrano neuroni ricchi in autofagosomi ingranditi e corpi di accumulo con un'elevata marcatura per la proteina ATP synthase lipid-binding protein (mitochondrial subunit c), tipico marker delle lipofuscinosi ceroidi neuronali [295]. Altri esperimenti con topi knockout per catepsina D mostrano l'accumulo e l'aggregazione di alpha-synuclein nei corpi cellulari dei neuroni [297]. Sebbene si osservi la proteina catepsina D nei campioni analizzati, resta da verificare se la sua attività enzimatica (e quella di altri enzimi dell'organello) è ancora a livelli fisiologici. Osserviamo inoltre la tripeptidyl-peptidase 1, una proteasi che viene accumulata durante l' invecchiamento [298] e che è anch'essa osservata in corpi di inclusione di accumulo (lipofuscin-like bodies) di origine lisosomiale osservati in placenta umana [289]. La palmitoyl-protein thioesterase 1 è invece un'idrolasi che rompe il legame tio-estere tra acidi grassi (14-19 atomi di carbonio, in particolare residui palmitici) e residui di cisteina di alcune proteine di membrana, come passaggio iniziale della loro degradazione. Ha un ruolo fondamentale nella regolazione del riciclo delle vescicole sinaptiche [299]. Tra le proteine lisosomiali che identifichiamo la sialate O-acetyltransferase è quella con score medio e numero di peptidi più elevati. È un'esterasi che rimuove gruppi acetato dall'acido sialico, specialmente per il catabolismo dei gangliosidi. L'acido sialico possiede molte funzioni tra cui la regolazione delle interazioni cellula-cellula, la protezione delle proteine da degradazione e contribuisce alla carica negativa della superficie delle cellule. Non è chiaro perché questa proteina sia così abbondante nei nostri campioni, è anche possibile che venga degradata con difficoltà all'interno dell'organello oppure che sia più facilmente identificabile con le tecnologie di proteomica che utilizziamo. Un altro gruppo di proteine ben rappresentato nei nostri campioni è quello delle **solfatasi** (iduronate 2-sulfatase, N-acetylgalactosamine-6-sulfatase, N-

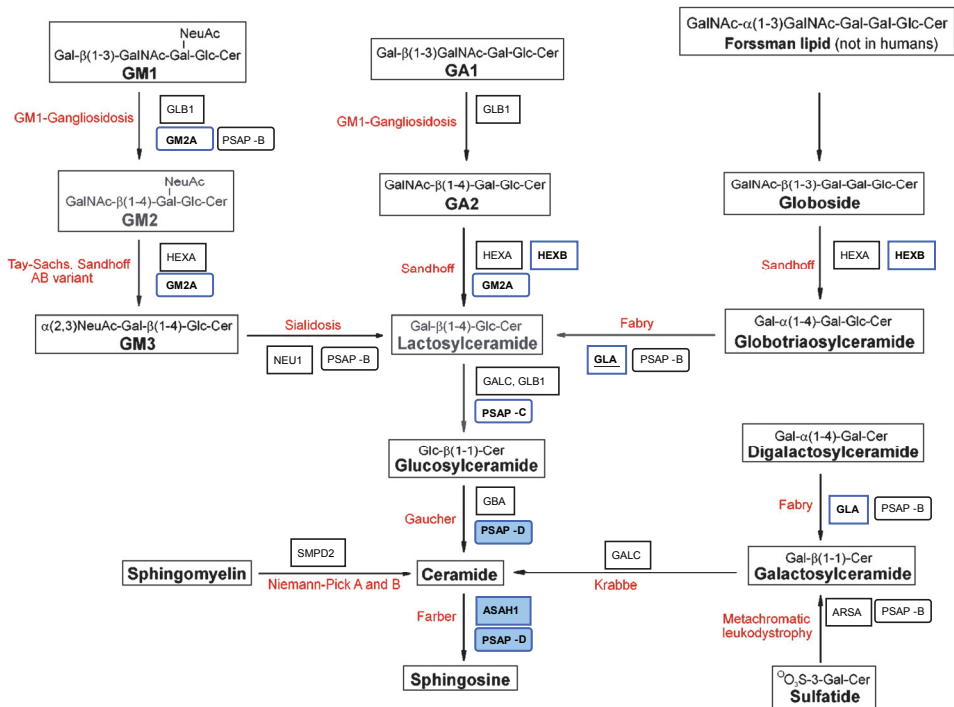
sulphoglucosamine sulphohydrolase/heparan N-sulfatase, arylsulfatase B) coinvolte nel taglio di gruppi solfato da diversi tipi di glicosaminoglicani con funzione strutturale nel tessuto connettivo e nella matrice extracellulare (condroitin-, eparan-, dermatan-, cheratan-solfato). È noto che uno dei marcatori dell'invecchiamento sia l'aumento di danni alle proteine extracellulari come il collagene [5]. Questo potrebbe essere correlato alle elevate quantità di proteine deputate al catabolismo della matrice extracellulare all'interno dell'organello di NM. Tra le proteine lisosomiali troviamo inoltre due **nucleasi**, la deoxyribonuclease II alpha e la ribonucleasi T2, sebbene la prima venga identificata come proteina aspecifica nei campioni di NM (vedi 4.2.2.5) e la seconda venga identificata con un numero basso di peptidi.

Nei campioni analizzati vengono osservate 28 delle 52 proteine della matrice lisosomiale identificate in cervello umano da Sleat et al. [284]. In tabella 4.15, possiamo confrontare l'abbondanza delle proteine osservate nei nostri campioni (score medio) con l'abbondanza con cui sono state osservate le proteine lisosomiali da cervello umano (parametro "log e", come descritto nell'articolo citato) [290]. Sebbene i metodi per ottenere queste proteine siano diversi, possiamo usare questi parametri per individuare in modo approssimativo se nell'organello di NM la distribuzione delle proteine è più o meno sovrapponibile a quella di normali lisosomi isolati da cervello. Tra le 52 proteine identificate da Sleat et al. noi osserviamo la maggior parte delle classi di enzimi lisosomiali rilevando però l'assenza di phospholipase e uno scarso numero di **glicosidasi** deputate alla degradazione di sfingolipidi rispetto all'elevata quantità (in score e numero) rilevata in normali lisosomi cerebrali. Più precisamente, osservando lo schema che descrive gli enzimi coinvolti nella degradazione di sfingolipidi (gangliosidi, globosidi, cerebrosidi e sfingomieline) (fig. 4.15), si può notare nei campioni analizzati, una scarsa presenza di enzimi che fanno parte delle prime fasi di questo pathway catabolico (parte superiore della figura). Per esempio, non osserviamo la presenza (se non in piccole quantità) delle proteine beta-hexominidasi (HEXA e HEXB), sebbene siano tra le proteine lisosomiali più abbondanti per la loro funzione nel rimuovere residui di N-acetil-esosammine (es. N-acetil-glucosamina) da tutti i glicosfingolipidi. D'altra parte osserviamo invece un elevato numero di peptidi corrispondenti all'enzima acid ceramidase (ASA1) e del suo attivatore proattivatore polipeptide (soprattutto saposin chain PSAP-D)<sup>a</sup>. Questa coppia di proteine agisce nell'idrolisi della ceramide in sfingosina e acidi grassi, come ultimo passaggio della degradazione di tutti gli sfingolipidi. Non è chiaro come possa esserci un'elevata quantità di questo enzima che si trova alla fine di un pathway catabolico senza che siano presenti anche altre proteine dello stesso pathway. Sarebbe interessante verificare in dettaglio il contenuto lipidico dell'organello di NM per valutare se le gocce lipidiche contengono molta ceramide e poche molecole precursori (sfingolipidi). In questo caso significherebbe che la ceramide, o comunque altri sfingolipidi già parzialmente degradati, vengono portati dall'esterno in questa condizione. È necessario precisare che la proteina acid ceramidase è un'altra delle principali proteine accumulate in corpi di inclusione (lipofuscin-like bodies) in seguito all'accumulo di materiale indegradabile [289]. Inoltre, l'accumulo

<sup>a</sup> Nei nostri campioni osserviamo molti peptidi derivati dalla catena saposin-D (PSAP-D) e solo un peptide della catena saposin-C (PSAP-C)

di acid ceramidase è osservato in concomitanza con stress ossidativo in neuroni invecchiati e affetti da malattia di Alzheimer [300] e che la saposina catena D è parte del materiale di accumulo in tessuti affetti da lipofuscinosi ceroidi neuronale tipo 1 (CLN1) e tipo 10 (CLN10) [301], [302].

La proteina acid ceramidasi e il suo attivatore saposin chain D potrebbero quindi essere presenti nell'organello di NM come unici enzimi dei pathway metabolici descritti perché difficilmente degradabili in condizioni di invecchiamento lisosomiale e quindi come significativo marker di disfunzione lisosomiale.



**Figura 4.15.** Pathway di degradazione lisosomiale degli sfingolipidi. In questa figura sono rappresentati i principali enzimi (rettangoli) ed eventuali attivatori ad essi associati (rettangoli arrotondati) coinvolti nel catabolismo dei principali sfingolipidi. Le caselle blu rappresentano le proteine osservate nei campioni analizzati, le caselle con la sola cornice blu rappresentano proteine identificate come non rappresentative. In rosso sono indicate le malattie derivate dalla mutazione delle proteine rappresentate. Per i nomi delle proteine corrispondenti ai nomi dei geni riportati vedere in tabella 4.14. Modificato da Schulze et al [291].

In ogni caso, questa panoramica sembra suggerire che all'interno dell'organello di NM non avviene in modo efficace la degradazione e/o il riciclo di fosfolipidi (fosfatidil-colina, -etanolamina, -serina, -inositolo) e di sfingolipidi quali componenti principali delle membrane della cellula. Sappiamo che la degradazione di membrane nel lisosoma avviene soprattutto in seguito a fenomeni di endocitosi, fagocitosi e macroautofagia [291]; sappiamo inoltre che l'organello di NM ha origine (macro)autofagica, dovuta all'osservazione di una doppia membrana in alcuni organelli osservati al microscopio elettronico (sez.4.4 e [229]). Questi permettono di ipotizzare che l'accumulo di lipidi (corpi lipidici) descritto negli

organelli di NM attraverso microscopia elettronica (sez. 4.4 e [168], [174]) e l'elevata quantità di lipidi incorporati nel pigmento di neuromelanina deriverebbero da un continuo apporto di nuove membrane all'interno di un organello di derivazione lisosomiale incapace di degradare efficacemente i lipidi che le costituiscono (vedi schema in fig. 4,16, punto 7). Un altro aspetto da considerare è che studi recenti sui lipidi associati alla NM dimostrano la presenza di una piccola percentuale di fosfolipidi e sfingolipidi, rispetto a un'elevata quantità di dolicoli [193], [194]. L'assenza di enzimi deputati al catabolismo di fosfolipidi e sfingolipidi può derivare dal fatto che all'interno dell'organello di NM non avvenga un apporto di membrane ricche di queste classi di lipidi ma ricche in dolicoli (vedi anche sez. 4.5.3).

Riguardo alle lipasi, una delle proteine della matrice lisosomiale rilevata in tutti i campioni è la phospholipase B-like 2 (PLBD2). Questa proteina non è ancora stata caratterizzata completamente ma è certamente una proteina lisosomiale con un sito catalitico tipico di alcune lipasi [303]. La sua attività enzimatica specifica non è stata dimostrata con l'eccezione di esperimenti sulla proteina omologa (39% di similarità) isolata dall'ameba *Dictyostelium discoideum*. L'enzima di questa ameba è capace di catalizzare l'idrolisi di alcuni fosfolipidi (posfatidilinositolo, -etanolamina, -colina) con preferenza per quelli con catene aciliche che danno come prodotti acido linoleico, stearico, palmitico, oleico, arachidonico) [304]. Dati contrastanti emergono invece da studi sulla struttura tridimensionale dello stesso enzima di origine murina; gli autori suggeriscono che la struttura tridimensionale e l'omologia di questa con altri enzimi portano a pensare che possa catalizzare la rottura di legami peptidici non aminoacidi, tipici di cefalosporine, penicilline, acido biliare e di N-aciletanolammidi (particolari acidi grassi legati a un residuo di etano lamina) [305]. Contestualmente a questa tesi sono stati svolti studi preliminari di docking molecolare (dati non riportati qui) per verificare la possibilità che i dolicoli (o molecole derivate) possano essere substrato di questo enzima non ancora caratterizzato. I risultati di questi studi non hanno confermato questa possibilità. Infatti, ad oggi non si conosce il substrato di questa proteina e, allo stesso tempo non si conosce enzima specifico per la degradazione dei dolicoli (vedi sez. successiva).

#### **4.5.3 L'accumulo e la funzione dei dolicoli alla luce dei dati di proteomica**

##### **4.5.3.1 Nell'organello non sono presenti né enzimi di sintesi né enzimi di degradazione dei dolicoli**

La componente lipidica dell'organello è dovuta soprattutto alla presenza dei corpi lipidici che, osservati in microscopia elettronica, coprono all'incirca il 30-40% percento del loro volume (sez. 4.4 e [168], [174]). Studi sulla componente lipidica del pigmento di NM isolato mostrano che i dolicoli sono i principali lipidi identificati e che costituiscono il 12-14% del peso finale del pigmento isolato [194], [306]. Nei nostri campioni non abbiamo identificato alcun enzima tra quelli coinvolti nella sintesi dei dolicoli che solitamente si trovano a livello del reticolo endoplasmatico [196].

I pathway degradativi dei dolicoli non sono ancora stati definiti chiaramente. I dolicoli vanno incontro a turn-over all'interno dei lisosomi, sebbene questo sia



molto lento (115-137 ore) [195] e sebbene non si conoscano enzimi specifici per la loro degradazione. Sono state identificate *in vivo* reazioni di  $\beta$ -ossidazione dei dolicoli con formazione di acido dolicoico come intermedio di degradazione [307], [308]. Sebbene non si conosca l'enzima che catalizza queste reazioni, nei campioni non abbiamo identificato la presenza di enzimi coinvolti nelle reazioni tipiche di  $\beta$ -ossidazione (tipicamente enzimi del mitocondrio o del perossisoma) o altri enzimi con azione ossido-reduttasica NAD-dipendenti potenzialmente capaci di catalizzare la conversione del dolicolo in acido dolicoico. Da recenti studi sulle componenti lipidiche della NM sono stati però individuati molecole di acido dolicoico [194]. L'ossidazione a gruppo carbossilico del gruppo alcolico dei dolicoli, e quindi la formazione di acido dolicoico, è possibile che nell'organello di NM tale reazione avvenga in assenza di enzimi ma grazie al potere ossidativo del  $Fe^{3+}$  contenuto in abbondanza nel pigmento di NM, anche grazie ai lunghi tempi di vita di questi organelli.

Questi dati sembrerebbe che i dolicoli presenti nell'organello derivino dall'esterno e che una volta all'interno dell'organello non riescano ad essere degradati e ma che al contrario si accumulino sottoforma di corpi lipidici oltre che legarsi e prendere parte al pigmento di NM (vedi schema in fig. 4.16, punto 7). È riportato, ad esempio, che nella lipofuscinosi ceroide neuronale di tipo CLN3, anche molecole di dolicoli (sottoforma di dolicol-fosfato o dolicoli legati a residui di zuccheri) sono tipico materiale di accumulo in conseguenza a mutazioni della proteina di membrana lisosomiale CLN3 (battenin) [301].

#### **4.5.3.2 Relazione tra dolicoli e l'organello di NM**

Considerato che i dolicoli rappresentano una piccola percentuale di tutti i lipidi che costituiscono le membrane [195] e che essi non derivano da sintesi enzimatica nell'organello di NM, ci si chiede per quale motivo queste molecole sono così abbondanti nell'organello di NM.

I pochi dati in letteratura riguardo alle proprietà dei dolicoli, al di là della loro funzione nella glicosilazione delle proteine, indicano un loro ruolo nella modulazione delle proprietà fisiche delle membrane lipidiche (curvatura, fluidità) e una capacità di stimolare la fusione tra vescicole [196]. Questi dati indicano che i dolicoli potrebbero essere presenti soprattutto all'interno di membrane deputato al traffico intracellulare. Ipotizzando che l'organello di NM si formi anche grazie la fusione di vescicole (autofagiche) che trasportano NM neo-formata, la continua fusione di membrane vescicolari ricche in dolicoli all'interno dell'organello di NM mancante di enzimi capaci di degradarli, porterebbe al loro accumulo nell'organello stesso (vedi schema in fig. 4.16, punto 7).

Infine, uno studio specifico su lisosomi isolati da fegato di ratto riporta che i dolicoli sono principalmente contenuti nei lisosomi, in modo particolare in una certa frazione di lisosomi [309]. Gli autori riportano immagini al microscopio elettronico di questa frazione dove i lisosomi appaiono molto eterogenei, con una componente molto elettrone-densa e con numerose gocce lipidiche molto simili a quelle osservate negli organelli di NM [309]. Questa osservazione indica che i dolicoli potrebbero comunemente essere presenti nei lisosomi invecchiati e che la formazione di gocce lipidiche come quelle osservate all'interno dell'organello di NM potrebbero formarsi anche in altre cellule non neuronali e non solo durante l'invecchiamento di cellule post-mitotiche.

#### 4.5.4 Confronto proteomico con i melanosomi dei tessuti periferici

##### 4.5.4.1 *Nell'organello non si osservano enzimi melanogenici*

L'organello di NM e il melanosoma presente nei tessuti periferici, sebbene abbiano origine e funzioni pressoché differenti, condividono alcune caratteristiche lisosomiali e il fatto di contenere entrambi pigmenti melanici. Abbiamo perciò confrontato i nostri risultati con la più recente analisi proteomica di melanosomi che riporta l'identificazione di 1500 proteine delle quali 95 osservate in tutti le 4 fasi della formazione del melanosoma [151]. Le nostre analisi si sovrappongono alla proteomica del melanosoma per le proteine lisosomiali e per alcune proteine rab GTPasi coinvolte nel traffico cellulare, formazione di vescicole e fusione di membrane. Concentrando l'attenzione sulle proteine tipicamente melanosomiali e importanti per la formazione dell'organello e per la sintesi della melanina (tyrosinase, TYRP1, dopachrome tautomerase (DCT), DOPA decarboxylase (DDC), PMEL17, MART1, OA1, OCA2, SLC45A2, SLC24A5) (vedi sez 1.3.3), non osserviamo nessuna sovrapposizione significativa. Tra quelle citate osserviamo dopachrome tautomerase, DOPA decarboxylase e Na/K/Ca exchanger (SLC24A5) ma solamente in alcune analisi singole e con score minimo. Inoltre non identifichiamo proteine tipiche per il trasporto transmembrana di dopamina (dopamine transporter 1 (DAT1), VMAT2, etc.) che potrebbero suggerire un meccanismo di sintesi enzimatica a partire dalla dopamina (o altri catecoli) come precursori. Questi dati confermano che la formazione della NM non avviene attraverso i pathway enzimatici tipici della melanogenesi e che il melanosoma e l'organello di NM siano accomunati soltanto da un carattere lisosomiale.

Si verifica quindi l'ipotesi secondo la quale, come già descritto nell'introduzione (sez. x.x), la NM si formerebbe nel citosol attraverso processi di auto-ossidazione della dopamina e che essa verrebbe in seguito racchiusa in vacuoli autofagici (attraverso macroautofagia) come prima fase della formazione degli organelli di NM [95], [229] (vedi schema in fig. 4.16, punti 1-4).

##### 4.5.4.2 *GPNMB: proteina melanosomiale dell'organello di NM*

L'unica proteina tipicamente melanosomiale che si osserva è la transmembrane glycoprotein NMB (GPNMB), identificata in tutti i campioni analizzati anche se non sempre con score >10.99. Questa proteina è stata recentemente descritta all'interno dei melanosomi [150], [151], la sua mutazione in entrambi i loci causa dispersione della pigmentazione dell'iride in glaucoma pigmentato di topo [310] e la proteina umana con la quale possiede più alta omologia (31%) è la Pmel17 [311]. Pmel17 è una delle prime proteine importate nella fase II della formazione del melanosoma, è una proteina transmembrana che una volta importata nel melanosoma viene tagliata proteoliticamente con il rilascio di una porzione "luminale" contenente un dominio (RTP) capace di formare fibrille [145]. La formazione di tali fibrille all'interno del melanosoma dà forma a un'impalcatura sulla quale comincia a depositarsi la melanina appena sintetizzata fino alla maturazione del melanosoma. La proteina GPNMB non contiene tali domini e non forma fibrille, è inoltre arricchita nelle fasi finali della melanogenesi, sembra quindi che non svolga la stessa funzione di Pmel17 [311].

Inoltre, è stata osservata, un ruolo di questa proteina per la formazione della struttura chimica della melanina nel melanosoma [312]. Recenti studi dimostrano che oltre ad essere una proteina melanosomiale, è over-espressa (15volte) in tessuto ischemico e overespressa (10-volte) in macrofagi che fagocitano corpi di

inclusione apoptotici [313]. Gli stessi autori evidenziano poi la colocalizzazione di GPNMB con vescicole ricche in colesterolo (filipin staining), la colocalizzazione con LC3 (proteina fondamentale nella formazione di autofagosomi) e l'incremento della formazione di autofagosomi in cellule dove GPNMB è over-espressa. Gli autori suggeriscono quindi che GPNMB svolge (nei macrofagi) un ruolo importante nella formazione di autofagosomi per il sequestro e la degradazione di materiale potenzialmente pericoloso per la cellula.

È possibile ipotizzare che anche all'interno del neurone GPNMB sia coinvolta nella formazione di organelli di NM che sequestrano e "tentano" di degradare materiale potenzialmente dannoso come la NM (vedi schema in fig. 4.16, punto 4). Ci sembra importante approfondire le indagini di questa proteina in relazione all'organello di NM; ulteriore ragione di tale interesse è la definizione del gene per GPNMB tra i nuovi loci identificati in correlazione alla malattia di Parkinson nella più recente e autorevole meta-analisi pubblicata dal consorzio International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC) [314].

#### **4.5.5 Proteine coinvolte nella formazione e degradazione di aggregati proteici tipici delle malattie neurodegenerative**

##### **4.5.5.1 Alfa-cristallin catena beta**

L' alpha-crystallin è stata identificata come rappresentativa e con scores relativamente elevati in entrambi i diversi campioni di organelli di NM (ORG-A1,2, ORG-B1,2), soprattutto nel primo.

L' alpha-crystallin fa parte della famiglia di small heat-shock proteins (sHsp) che agiscono da chaperoni molecolari: hanno la capacità di controllare il folding di alcune proteine e di prevenire l'associazione e la precipitazione di proteine [315], [316]. Questa è una proteina espressa in molti tessuti, tra i quali il tessuto cerebrale. Le interazioni tra alpha-crystallin e proteine che possono formare fibrille e/o aggregati cellulari è verificata e oggetto di studi in molte malattie neurodegenerative (es. Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob) e spesso l' alpha-crystallin co-localizza con i depositi tipici di queste malattie (riepilogo in [317]). Inoltre, alfa cristallina è stata osservata insieme ad alpha-synuclein, ubiquitina e altre proteine all'interno di corpi di Lewy di pazienti Parkinsoniani (81,82). Uno studio recente ha indagato l'interazione tra alpha-crystallin e alpha-synuclein [318]. È stato dimostrato che da una parte l' alpha-crystallin inibisce la formazione di fibrille di alpha-synuclein ma che, d'altra parte, porta alla formazione di aggregati amorfi che contengono entrambe le proteine. Inoltre, discrete quantità di alpha-synuclein a temperatura fisiologica portano a una diminuzione dell'attività chaperon dell'alpha-crystallin. Questi due aspetti sono utilizzati per spiegare la colocalizzazione di queste due proteine nei corpi di Lewy. Secondo i nostri dati, in soggetti sani non sono osservate elevate quantità di alpha-synuclein all'interno dell'organello. Pensiamo quindi che il ruolo e l'identificazione di alpha-crystallin nell'organello di NM non sia necessariamente correlato all'alpha-synuclein, sappiamo infatti che alpha-crystallin è una proteina chaperon che non interagisce solamente con alpha-synuclein.

Si può ragionevolmente pensare che la NM neo-formata all'interno del citosol e le proteine che interagiscono con essa prima di essere racchiuse nell'organello di NM, possano essere bersaglio dell'azione dell' alpha-crystallin nel tentativo di limitare l'aggregazione di materiale proteico all'interno della cellula. In

conseguenza di ciò l'alpha-crystallin legata e incastrata nell'aggregato NM e proteine verrebbe portata e accumulata all'interno dell'organello di NM (vedi schema in fig. 4.16, punto 3).

#### **4.5.5.2 Ubiquitina**

Dall'analisi proteomica dei campioni dimostriamo per la prima volta la presenza di ubiquitina all'interno degli organelli di NM. È nostra intenzione verificare attraverso western-blot se l'ubiquitina che osserviamo è in forma di monomero o legata a proteine ubiquitinate.

L'identificazione di proteine ubiquitinate è stata osservata all'interno dei corpi di inclusione tipici di molte malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Parkinson, di Alzheimer e di Pick [319]. Infatti, disfunzioni al sistema degradativo ubiquitina-proteasoma (UPS) portano all'aggregazione e all'accumulo di proteine con la formazione di corpi di inclusione che possono portare a morte cellulare [112]. Nei corpi di Lewy tipici del Parkinson sono colocalizzate  $\alpha$ -synuclein, ubiquitina e subunità del proteasoma [320], [321]. Fin'ora la correlazione tra NM e il sistema UPS è stata evidenziata da alcuni studi dove si dimostra che NM isolata da cervello umano ha la capacità di ridurre l'attività proteolitica del proteasoma 26S [257], [322].

L'ubiquitina è una piccola proteina di 76 aminoacidi che lega proteine per indirizzarle al proteasoma, un macchinario cellulare che le degrada in piccoli oligopeptidi [323]. Questo meccanismo di degradazione (UPS) è solitamente ben distinto dalla macroautofagia, un altro meccanismo degradativo fondamentale della cellula. Infatti, il sistema UPS si trova nel citosol e degrada enzimaticamente proteine solubili, dall'altra parte, la macroautofagia sequestra intere porzioni di citoplasma, coinvolge la formazione dell'autofagosoma, utilizza sistemi di trafficking cellulare ed è capace di degradare praticamente qualsiasi tipo di materiale contenuto nella cellula: dagli aggregati proteici fino a interi organelli. L'ipotesi più accreditata riguardo l'origine di NM è quella autofagica [95], [229]: la sua formazione deriverebbe quindi dal sequestro di NM neo-formata presente nel citosol all'interno di autofagosomi e dalla successiva fusione di questi con il lisosoma. Sebbene per alcuni anni si sia pensato che non ci fosse relazione tra i meccanismi autofagici/lisosomiale e il sistema dipendente da proteasoma e ubiquitina (UPS), numerosi studi dimostrano che questi due meccanismi possono invece interfacciarsi in modo complementare. Ad esempio, Mizushima e collaboratori osservano che, in topi dove la macroautofagia è stata inibita attraverso il knockout di geni autofagici essenziali (Atg5 e Atg7), si osserva un maggiore accumulo di aggregati proteici poliubiquitinati rispetto a topi controllo, sebbene l'attività del proteasoma rimanga invariata [35], [324]. È quindi dimostrato che la macroautofagia può servire come meccanismo degradativo compensatorio nel momento in cui il proteasoma non funziona in modo corretto e quando aggregati di proteine poliubiquitinate non possono essere sfoldate e quindi essere accettate dal proteasoma. Nelle malattie in cui avviene la formazione di aggregati proteici e corpi di inclusione si osserva infatti un incremento dei meccanismi macroautofagici [325].

Alla luce di queste recenti osservazioni, la presenza di proteine poliubiquitinate potrebbe confermare che l'interazione tra la NM e le proteine avviene nel citosol, che la cellula cercherebbe di degradare gli aggregati/addotti NM-proteine attraverso ubiquitinazione ma che l'entità e la complessità degli aggregati (e la già

citata inibizione del proteasoma da parte della NM [257], [322]) porterebbe all'attivazione di meccanismi macroautofagici e alla formazione dell'organello di NM (vedi schema in fig. 4.16, punto 3).

#### **4.5.5.3 TPPP (*Tubulin polymerization-promoting protein*)**

La proteina TPPP viene osservata in modo rappresentativo in entrambi i campioni derivati dall'organello di NM (ORG-A1,2 e ORG-B1,2). Questa è una proteina caratterizzata solo nel 2002 [326] e la sua funzione principale è la regolazione/promozione della polimerizzazione della tubulina. Notevole interesse per TPPP è nato però in seguito alla scoperta della sua capacità di stimolare l'aggregazione di alpha-synuclein e della sua co-localizzazione con alpha-synuclein all'interno di corpi di Lewy di soggetti parkinsoniani e altri corpi di inclusione patologici in soggetti affetti da altre sinuceinopatie [327]. Inoltre è stato osservato che l'over-espressione di TPPP in cellule modello porta alla formazione di aggregosomi che sono il risultato del trasporto di proteine aggregate/misfoldate attraverso citoscheletro (dineina) verso regioni di accumulo specifiche della cellula che sono definiti come punto di partenza per la formazione di inclusioni patologiche come i corpi di Lewy [328].

La proteina TPPP osservata nei nostri campioni potrebbe quindi svolgere un ruolo nella formazione dell'aggregato che chiamiamo NM e nel trasporto di aggregati proteici (o altro materiale come gli aggregati di proteine e NM) verso organelli di NM già formati (vedi schema in fig. 4.16, punto 4).

#### **4.5.5.4 *Alpha-synuclein***

Identifichiamo l' alpha-synuclein nei campioni di organelli (ORG-A1,2) anche se sono in corso esperimenti di validazione per confermare che la sua identificazione non derivi dalla contaminazione da eritrociti in cui questa proteina è presente. Il principale marker patologico della malattia di Parkinson è la presenza, in neuroni della substantia nigra, di corpi di Lewy, composti principalmente dall' alpha-synuclein [44], [329] (vedi sez.1.2.4 e 1.2.5). L'alfa sinucleina è una proteina da 140 aminoacidi che può formare fibrille (o proto fibrille) citotossiche con un importante contributo di una regione idrofobica della proteina chiamata NAC (non-amyloid beta-component) [330]. Alterazioni dei livelli di alfa sinucleina portano a disfunzioni nel docking e nella fusione di vescicole sinaptiche, a una diminuzione del loro riciclo e quindi a un accumulo di dopamina nel citosol che porta a tossicità neuronale. L'accumulo di dopamina citosolica e lo stress ossidativo che ne consegue porta alla formazione di nuove proto-fibrille di alpha-synuclein e quindi a un circolo vizioso che contribuisce nella neurodegenerazione tipica della malattia del Parkinson stessa [331]. Inoltre, l'alpha-synuclein forma facilmente addotti con il dopamina-chinone (un prodotto di ossidazione della dopamina) presente nel citosol e tali addotti incrementano la formazione di proto fibrille citotossiche [332]. Valutazioni sull'associazione tra alpha-synuclein e il pigmento o l'organello di NM sono state svolte recentemente: Fasano et al. identificano la presenza di alpha-synuclein nella componente proteica della NM attraverso western blot ma solo in soggetti parkinsoniani [333]. Halliday et al. identificano alpha-synuclein in associazione con gli organelli di NM attraverso immuno-istochimica e attraverso immuno-microscopia elettronica in corrispondenza dei corpi lipidici degli organelli, ma anche in questo caso solamente in soggetti parkinsoniani [334].

Secondo questi dati la presenza di alpha-synuclein negli organelli di NM deriverebbe soprattutto dalla sua elevata concentrazione e dalla sua facilità di

formare addotti e aggregati nel contesto patologico che caratterizza la malattia di Parkinson. Dai nostri esperimenti si osserva alpha-synuclein in organelli di NM isolati da soggetti sani; ribadendo la necessita di confermare il nostro dato pensiamo che l'elevata sensibilità delle tecnologie di proteomica da noi utilizzate possano rivelare anche bassi livelli di alpha-synuclein presenti negli organelli di NM in soggetti sani mai osservate prima. È comunque possibile che l'alpha-synuclein, per la facilità di formare aggregati con il dopamina-chinone, venga inglobata nella struttura della NM al punto di essere difficilmente riconoscibile da tecnologie a bassa sensibilità utilizzate in altri studi.

Se così fosse l'alfa-sinucleina potrebbe essere più abbondante di quello che si osserva perché parte della struttura stessa della NM. Potrebbe essere una delle proteine che, secondo dati recenti [174], favorirebbe la formazione (polimerizzazione) della NM grazie alla formazione di un substrato proteico ordinato, riconoscibile nella struttura della NM grazie a segnali di scattering di 4.7 Å tipici della struttura fibrillare dei β-foglietti delle fibre di amiloide. (vedi schema in fig. 4.16, punto 3)

È interessante notare come le proteine appena descritte, osservate nell'organello di NM nella sua fase "finale", indichino il possibile percorso da cui deriva la sua formazione. Si osservano infatti proteine citosoliche tipicamente coinvolte nel tentativo di misfoldare (alpha-crystallin), disaggregare (alpha-synuclein), degradare (ubiquitin) e riunire sottoforma di aggregati (TPPP) altre proteine potenzialmente tossiche perché misfoldate e/o legate a componenti non degradabili (ad esempio alpha-synuclein o altre proteine legate alla NM). Queste osservazioni sono conciliabili con la formazione della NM che avviene con molta probabilità all'interno del citosol e con il contributo di proteine che si legano ad essa rendendo loro stesse difficilmente degradabili dai normali sistemi citosolici (vedi schema in fig. 4.16, punto 3).

## **4.5.6 Proteine contro lo stress ossidativo**

### **4.5.6.1 Glutathione Peroxidase 4**

Tra le proteine contro lo stress ossidativo è stata osservata la phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4) solamente in ORG-B1 ma con score relativamente elevato (score : 20.21). Questa proteina è poco studiata ma è certamente uno degli enzimi più importanti per la riduzione dei lipidi di membrana perossidati [335]. Delezioni del gene per la GPX4 portano a mutazione embrionale [336], mutazioni condizionali a livello cerebrali portano a grave neurodegenerazione [337]. Questa proteina è già stata studiata a livello della *Substantia nigra* umana e osservata in organelli di NM sia con tecnologie proteomiche [203] che a livello istologico [338]. A livello istologico è riportata la colocalizzazione di GPX4 e di NM all'interno di neuroni di soggetti sani e di soggetti parkinsoniani. I livelli della proteina sono però significativamente ridotti in neuroni di soggetti parkinsoniani. In aggiunta, gli autori riportano la presenza di GPX4 nei corpi di Lewy. Sebbene GPX4 venga osservata con difficoltà nei nostri campioni, probabilmente a causa della rottura delle membrane dell'organello, riteniamo importante considerarla nella nostra discussione, soprattutto in relazione allo stress ossidativo associato ai lipidi presenti nell'organello di NM (vedi schema in fig. 4.16, punto 7).

#### 4.5.6.2 Apolipoprotein D

Abbiamo osservato la apolipoprotein D (APOD) in tutti i tre diversi campioni analizzati. La APOD è una proteina secreta identificata per la prima volta nelle lipoproteine ad alta densità (HDL) [339]. Possiede affinità per diversi ligandi tra cui acido arachidonico, progesterone, colesterolo e altri lipidi (vedi review [340]) e, diversamente dalle altre apolipoproteine, la APOD non è espressa soprattutto nel fegato ma principalmente nel cervello e nei testicoli. Nel cervello è espressa solitamente nelle cellule gliali e negli astrociti anche se i neuroni possono esprimere APOD in condizione patologiche quali le malattie di Parkinson, di Alzheimer e l'infarto [341]. Questa proteina è una delle proteine i cui livelli di espressione aumentano maggiormente durante l'invecchiamento [342], inoltre, è un'altra proteina tra quelle identificata all'interno dei corpi di inclusione (lipofuscin-like bodies) accumulati come residuo di lisosomi danneggiati [289]. Topi knock-out per APOD mostrano un aumento di lipidi perossidati, problemi locomotori e di apprendimento [343]; altri studi su moscerini (e vegetali) dimostrano lo stesso fenomeno di protezione verso stress e in particolare verso perossidazione di lipidi [344]. Questa proteina risulta quindi molto interessante, soprattutto perché possiede un ruolo durante l'invecchiamento, in relazione ai lipidi e con attività protettiva e antiossidante. Queste caratteristiche potrebbero infatti suggerire una funzione di protezione dalla per ossidazione dei lipidi all'interno dell'organello di NM (vedi schema in fig. 4.16, punti 7,8). Recentemente, attraverso immunologia, è stata dimostrata la presenza di APOD in Substantia nigra umana, con un incremento della sua espressione in soggetti parkinsoniani; i segnali della proteina sono però stati osservati solo nelle cellule della glia e non all'interno dei neuroni [345]. Nel nostro laboratorio stiamo confermando la presenza della APOD con tecniche di immuno microscopia elettronica (immuno-gold).

#### 4.5.7 Traffico cellulare e corpi lipidici

Tra le proteine identificate nei campioni di Organelli (ORG-A1,2 e ORG-B1,2) troviamo anche proteine che stabilizzano i microtubuli citoscheletrici (microtubule associated protein tau (TAU) e microtubule associated protein 6 (MAP6)) e proteine che regolano il traffico cellulare (Ral-A e Rab-1B). Queste proteine sono state prese in considerazione per il ruolo che potrebbero avere nel traffico di vescicole che è tipicamente coinvolto nella formazione e nell'accrescimento di organelli macroautofagici di accumulo e per il loro possibile ruolo nella formazione di gocce lipidiche.

La proteina tau è molto conosciuta per essere una delle principali componenti degli aggregati neurofibrillari che caratterizzano la malattia di Alzheimer [346]. Il ruolo fisiologico di questa proteina non è completamente chiaro ma certamente è una proteina implicata nella stabilizzazione e nella regolazione della struttura dei microtubuli [347]. È stato inoltre dimostrato un ruolo a livello del traffico assonale, precisamente nell'interazione e regolazione nelle proteine motrici di trasporto (dineina e kinesina) [348]. MAP6 (chiamata anche stable tubulin only polipeptides (STOP)) è un'altra proteina importante per la stabilità dei microtubuli [349] ed è una componente degli sferoidi assonali che si accumulano nella sclerosi laterale amiotrofica, insieme ad altre proteine citoscheletriche come le tubuline e la chinsesina [350]. La proteina GTPasi Ral-A è coinvolta nella regolazione di molti processi cellulari ed è inoltre mediatore del traffico di membrana correlato a

meccanismi di eso- ed endocitosi anche se il suo ruolo in questo contesto non è ancora stato chiarito [351].

Nonostante le proteine citate qui siano coinvolte nel traffico cellulare, non è facile intuire come queste proteine possano essere implicate nella formazione e nella crescita dell'organello.

Rab1B è stata identificata nel campione di organelli ORG-A1,2 tra le proteine non rappresentative; anche altre proteine Rab sono state identificate nei campioni ma con un numero di peptidi troppo basso ed osservate in uno solo dei replicati analizzati. Rab1B è una proteina regolatrice GTPasi che è stata inizialmente caratterizzata per la sua funzione regolatoria del traffico di vescicole tra il reticolo endoplasmatico e le vescicole del Golgi [352]. In seguito è stata osservata, insieme ad altre proteine Rab (Rab5, Rab7, Rab18) in almeno 4 studi sulle proteine delle gocce lipidiche (lipid droplets) [353] e come proteina importante per la formazione dell'autofagosoma [354].

Le gocce lipidiche servono come corpi di accumulo di lipidi in tutti gli organismi, soprattutto come riserva nei tessuti adiposi, ma possono avere anche un ruolo protettivo attraverso il recupero di acidi grassi liberi che altrimenti potrebbero dare tossicità cellulare [355]. Le gocce lipidiche più studiate sono infatti quelle degli adipociti o comunque correlate al metabolismo dei lipidi. Solitamente sono costituite da un core idrofobico costituito da molti lipidi neutrali come trigliceridi, steroli, sterol-esteri; sono circondate da una membrana a singolo strato composta da fosfolipidi e proteine e con dimensioni variabili ma mediamente tra i 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  [356].

I corpi lipidici che osserviamo nel nostro organello (sez 4.4.) possiedono caratteristiche morfologiche analoghe a quelle delle tipiche gocce lipidiche appena descritte. A livello molecolare, paragonando la nostra analisi proteomica con le proteine tipiche delle gocce lipidiche (numerosi Rab, SNARE, SNAP23, TIP47 etc.) [356], [357], non abbiamo identificato un numero e una quantità di proteine sufficiente da poter dimostrare una correlazione tra le gocce lipidiche tipiche e i corpi lipidici dell'organello di NM.

Come già discusso pensiamo infatti che i corpi lipidici dell'organello di NM non derivino da sintesi e trasporto specifico di lipidi neutri per scopi metabolici ma da un accumulo di lipidi (di membrane) che una volta giunti all'interno dell'organello non riescono ad essere degradati in modo efficace. La presenza di alcune proteine Rab andrebbe approfondita per verificare quali di esse potrebbero mediare il trasporto e la fusione delle vescicole e delle membrane che contribuiscono alla formazione e all'accrescimento dell'organello (vedi schema in fig. 4.16, punto 7).

#### **4.5.8 Altre proteine**

##### **4.5.8.1 *ATP synthase lipid-binding protein (mitochondrial subunit c), un marker di lipofuscinosi***

La ATP synthase lipid-binding protein, chiamata anche mitochondrial subunit c, viene identificata solamente nei campioni di NM con scores discretamente elevati e la verifica della sua presenza negli organelli di NM è attualmente in corso con tecniche immunologiche. La mitochondrial subunit c è l'unica proteina mitocondriale osservata come rappresentativa nei nostri campioni. Questa proteina



è una piccola subunità (16 kDa, 7 kDa dopo maturazione) della pompa protonica mitocondriale che costituisce il poro attraverso il quale i protoni passano attraverso la membrana interna del mitocondrio. È una proteina posizionata all'interno della membrana e perciò possiede caratteristiche molto lipofile, è infatti solubile in solventi organici (metanolo/cloroformio) ed è classificata come proteolipide [358], [359]. A causa delle sue caratteristiche biochimiche è una proteina difficile da degradare. L'accumulo di questa proteina è il principale marker della maggior parte delle lipofuscinosi ceroidi neuronali (NCL) (CLN2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9, CLCN7) [302]. In aggiunta, l'accumulo della mitochondrial subunit c è osservato anche in neuroni di pazienti affetti da altre malattie lisosomiali da accumulo (lysosomal storage disease) come ad esempio le mucopolisaccaridosi (MPS) [360]. La causa di tali malattie, e quindi dell'accumulo della mitochondrial subunit c, è la mutazione di geni codificanti enzimi o trasportatori lisosomiali. In modelli murini di questo tipo di malattie è stato inoltre dimostrato che (nel caso di mutazione al gene *cln3*, modello di CLN-3) anche i pathway autofagici sono sregolati e contribuiscono all'accumulo di mitochondrial subunit c nei lisosomi e in vacuoli autofagici [361]. La presenza e il probabile accumulo di questa proteina nei nostri campioni suggerisce che l'organello di NM, sebbene sia isolato da soggetti senza alcuna malattia lisosomiale, si presenta come un lisosoma non completamente efficiente e incapace di degradare substrati come la mitochondrial subunit c (vedi schema in fig. 4.16, punto 8). Questo è uno dei dati che dimostra che l'organello di NM potrebbe considerarsi un lisosoma "invecchiato".

#### **4.5.8.2 Phospholipase D3**

La phospholipase D3 (PLD3) chiamata anche Hu-K4, è stata osservata in tutti i campioni analizzati con numero di peptidi e scores elevati. Per questo motivo nasce molto interesse verso questa proteina sebbene si conosca molto poco della sua funzione.

La phospholipase D3 è stata identificata nel 1997 ed ha questo nome perché possiede due motivi HKD (residui aminoacidici) caratteristici del sito attivo della famiglia di phospholipase D3 [362] sebbene non possieda altra similarità con la famiglia delle phospholipase al di fuori del motivo HKD. Le phospholipase D svolgono solitamente l'idrolisi di fosfatidilcolina per ottenere i prodotti colina e acido fosfatidico. Studi della proteina murina ortologa di PLD3 (SAM9) non rilevano alcuna attività fosfolipasica [363]. Da una più recente caratterizzazione di PLD3 [364] è stato riportato che: viene espressa a livelli elevati nel cervello soprattutto a livello dei neuroni e a livelli più bassi in molti altri tessuti; è stata osservata solo in frazioni contenenti le membrane lipidiche; co-localizza con proteine del reticolo endoplasmatico e possiede sia un'ipotetica sequenza transmembrana all'N-ter sia una sequenza di prenilazione al C-ter, attraverso la quale potrebbe legarsi alla membrana.

Purtroppo non c'è stata la possibilità di caratterizzare questa proteina ma sarebbe necessario studiare la sua attività enzimatica (con esperimenti biochimici o di docking molecolare) per verificare la possibilità che possa svolgere funzioni nella degradazione o nella sintesi di lipidi o precursori/metaboliti melanici presenti in abbondanza nell'organello.

#### **4.5.8.3 Ferritine**

Come descritto nell'introduzione (sez 1.4.2.6.) sono stati riportati dati contrastanti rispetto alla presenza di ferritine all'interno dell'organello di NM. In alcuni studi è

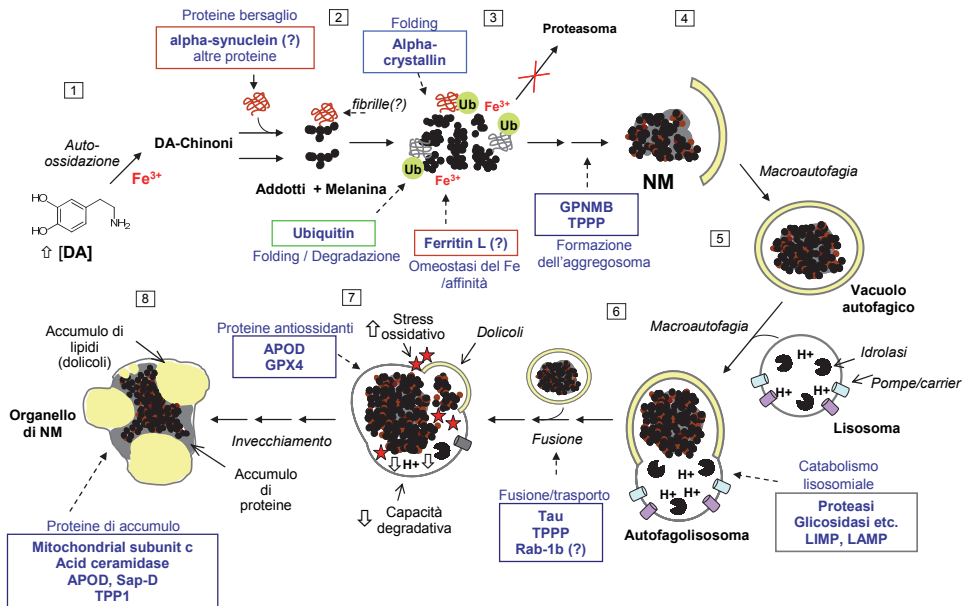
stata riportata l'assenza di ferritina nei neuroni contenenti NM [210] descrivendo la possibilità che in questi neuroni la NM svolga il ruolo di accumulare Fe al posto della ferritina. In altri studi viene riportata la presenza di ferritin L all'interno di organelli di NM isolati da tessuto congelato attraverso immuno-microscopia elettronica [218]. L'identificazione di ferritin L in organelli isolati da tessuto congelato piuttosto che direttamente nel tessuto pone il dubbio che la ferritina sia aspecifica e che derivi dal tessuto durante il suo isolamento.

In questo studio la ferritin L è stata osservata in tutti i campioni e come rappresentativa nella NM isolata da tessuto (NM-1,2) e nell'organello isolato e trattato con shock termico (ORG-B1,2). La ferritina L è stata inoltre osservata tra le proteine che possono legare la NM in modo aspecifico durante le fasi di isolamento del campione (NM-3-TIS). La ferritin H è stata osservata invece in tutti i campioni ma con un numero di peptidi non sufficiente per definirla rappresentativa.

Questi dati indicano che la ferritin L potrebbe legarsi al NM durante il suo accumulo nel citosol del neurone attraverso la forte affinità tra il la NM e il ferro legato alla ferritina (vedi schema in fig. 4.16, punto 3). Il fatto che qui si osservino peptidi della ferritina soprattutto nei campioni di NM e nel campione dove le membrane dell'organello vengono rotte, e considerando anche l'affinità tra il ferro contenuto nella NM e le ferritine, si ritiene comunque necessaria un'ulteriore conferma dei dati attraverso immuno-microscopia elettronica nel tessuto.

#### 4.6 Ipotesi sulla formazione dell'organello di NM sulla base dei dati di proteomica

I dati riportati in questo studio sono in accordo con le ipotesi più recenti sulla formazione dell'organello di NM e sull'accumulo di vacuoli autofagici durante l'invecchiamento [229]. Viene qui proposto un modello della formazione dell'organello di NM e il possibile ruolo delle proteine osservate in questo studio (fig.4.16).



**Figura 4.16: Modello proposto della formazione dell'organello di NM.** Nel testo viene riportata la descrizione dettagliata che segue i numeri riportati in figura.

- 1) Un eccesso di catecoli (dopamina (DA)) nel citosol dei neuroni dopaminergici porta all'aumento di DA-chinoni reattivi che si formano per auto-ossidazione o per catalisi mediata da ioni  $Fe^{3+}$  [95], [240].
- 2) I chinoni e semichinoni formano composti melanici e possono reagire con proteine formando addotti DA-proteina [365]. In particolare, l'aggregazione e la formazione di fibrille di  $\alpha$ -synuclein è accelerata da modificazioni con la DA [63].
- 3) I composti melanici e gli addotti DA-proteina si aggregano nel citosol come precursori della NM; è probabile che siano presenti proteine danneggiate e misfoldate a causa della formazione di addotti. Le proteine danneggiate potrebbero essere riconosciute dall' $\alpha$ -crystallin e dall'ubiquitina, nel tentativo di misfoldarle e portarle verso il proteasoma per la degradazione. Se fosse confermata la presenza di ferritina L nell'organello, potrebbe essere dovuta all'interazione con il Ferro presente nella struttura della NM stessa.

4) Gli aggregati che si formano come precursori della NM non possono essere degradati dal proteasoma e quindi si accumulano nel citosol. La GPMNB e la TPPP sono coinvolte nel sequestro di materiale dannoso per la cellula e nella formazione di aggregosomi [313], [328] e potrebbero svolgere un ruolo in questa fase.

5) La NM che si forma nel citosol dei neuroni viene sequestrata all'interno di vacuoli autofagici [95], [229].

6) I vacuoli autofagici si fondono a lisosomi dando come risultato gli autofagolisosomi che contengono enzimi lisosomiali e proteine tipiche della membrana lisosomiale.

7) Con il passare del tempo è probabile che si verifichi perdita dell'efficienza lisosomiale e una diminuzione della capacità di fusione del lisosoma causate dal normale invecchiamento e dallo stress ossidativo correlato alla NM [366], [367]. In aggiunta, come suggerito dalle immagini al microscopio elettronico (sez. 4.4), è possibile che l'organello di NM si fonda con altre vescicole di trasporto (o vacuoli autofagici) contenenti NM e che la regolazione del traffico sia mediata dalle proteine TPPP, Tau, Rabs. Come già accennato, è possibile che le membrane di queste vescicole contengano elevate quantità di dolicoli (sez. 4.5.3). La presenza di GPX4 e di APOD sarebbe giustificata dall'elevato stress ossidativo presente nell'organello, soprattutto a carico dei lipidi.

8) Infine, in seguito all'aumento di materiale all'interno dell'organello e in seguito a una progressiva perdita dell'attività lisosomiale, l'organello di NM assume l'aspetto che si osserva in microscopia elettronica, caratterizzato da una morfologia eterogenea caratterizzata dall'accumulo di materiale che non viene degradato. La presenza di elevate quantità di dolicoli e di alcune proteine tipiche delle malattie lisosomiali e lipofuscinosi (mitochondrial subunit c, acid ceramidase, saposin-D, TPP-1, APOD) confermerebbe l'ipotesi secondo la quale l'organello di NM sarebbe un lisosoma "invecchiato" e incapace di degradare efficacemente il materiale in esso contenuto.

#### **4.7 Ruolo dell'organello di NM nell'invecchiamento**

Da questo studio emerge chiaramente che l'organello di NM ha un ruolo importante nei meccanismi d'invecchiamento neuronale. L'organello di NM è correlato a molti processi cellulari (catabolismo lisosomiale, omeostasi delle proteine, omeostasi dei lipidi, omeostasi del ferro, controllo dello stress ossidativo) che se non sono regolati o che se poco efficienti portano a neurodegenerazione e alla malattia di Parkinson [4] (fig. 4.17). Date queste caratteristiche, l'organello di NM potrebbe, in certe condizioni, svolgere un ruolo protettivo per la cellula, in altre, potrebbe diventare fonte di stress e possibile contributo alla neurodegenerazione.

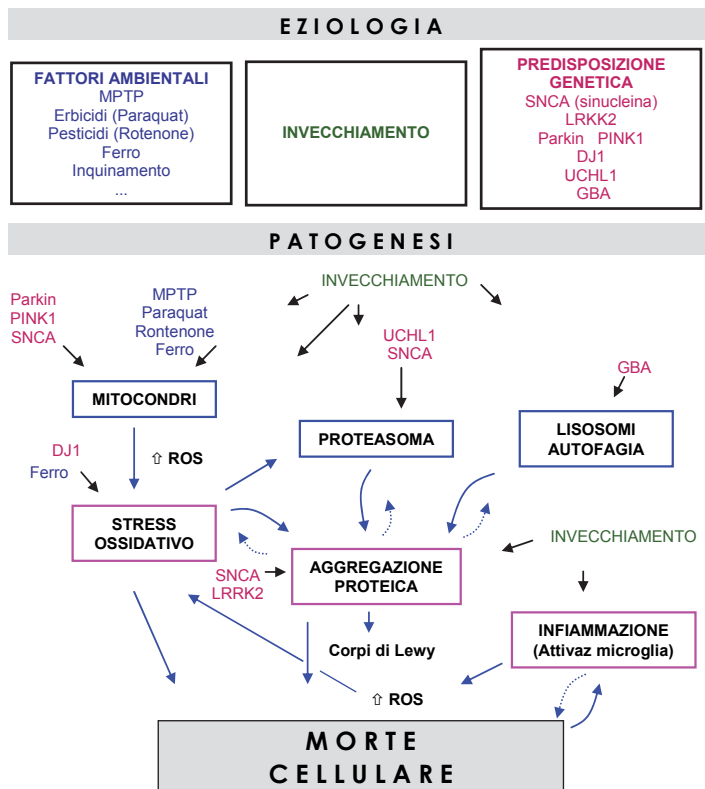
In questo studio si descrive la caratteristica lisosomiale e autofagica dell'organello di NM che rappresenta il tentativo della cellula di sequestrare e degradare materiale potenzialmente tossico presente nel citosol come i prodotti di ossidazione della dopamina (NM), addotti dopamina-proteine e proteine colpite da danni da stress ossidativo. Inoltre, si osserva la presenza di proteine potenzialmente coinvolte nei meccanismi antiossidanti (APOD, GPX4), nei meccanismi coinvolti nel misfolding proteico (alpha-crystallin) e nei meccanismi che portano all'aggregazione e al sequestro di molecole danneggiate (GMNMB, TPPP). In aggiunta, anche grazie agli studi sulla morfologia dell'organello, si conferma la sua capacità di contenere materiale di accumulo, come ad esempio grandi quantità di lipidi (dolicoli), che potrebbero potenzialmente danneggiare la cellula se liberi nel citosol. Riguardo ai dolicoli non sono state osservati enzimi coinvolti nella sintesi e nella degradazione di questa particolare classe di lipidi. È probabile che i dolicoli presenti nell'organello di NM derivino dalla fusione di membrane contenenti questo tipo di lipidi e che l'organello ne accumuli elevate quantità non possedendo specifici pathway per degradarli.

In questo studio è stato osservato che l'organello di NM, oltre a contenere molecole difficilmente degradabili come la NM e i dolicoli, contiene alcune proteine identificate all'interno di corpi di inclusione tipici di malattie lisosomiali di accumulo (mitochondrial subunit c, saposin-D) [302] e in corpi di inclusione di lisosomi danneggiati (acid ceramidase, TPP-1, APOD, LIMP2) [289]. Dall'analisi proteomica abbiamo inoltre osservato la mancanza di alcuni pathway lisosomiali come ad esempio quelli per la degradazione degli sfingolipidi.

Questi dati suggeriscono che l'organello di NM abbia le caratteristiche di un lisosoma o vacuolo autofagico "invecchiato", con elevato accumulo di materiale e ridotta capacità degradativa. È noto che l'accumulo di materiale difficilmente degradabile all'interno dei lisosomi può danneggiarli e inibire la loro capacità degradativa, aumentare il numero di lisosomi/vacuoli danneggiati e portare a un circolo vizioso che causa tossicità neuronale [5], [29]. È quindi possibile che, in un contesto dove la cellula è sottoposta ad altri tipi di stress come quelli presenti durante l'invecchiamento, la presenza di elevate quantità di organelli di NM possa diventare un ulteriore fattore vulnerabilità per la cellula, soggetta a una ridotta capacità degradativa e ad ulteriore accumulo di molecole danneggiate. In aggiunta, recenti studi dimostrano che NM esposta all'ambiente extracellulare è un fattore pro-infiammatorio che attiva la microglia, probabilmente a causa dell'eterogeneità e allo stress ossidativo che la caratterizza [256]. È possibile che parte dell'attivazione

della risposta infiammatoria sia dovuta alle proteine danneggiate accumulate all'interno degli organelli insieme alla NM e allo stress ossidativo ad esse associato.

Queste ipotesi possono aiutare a comprendere i meccanismi dell'invecchiamento e della neurodegenerazione, in modo particolare le condizioni che sussistono durante la malattia di Parkinson che colpisce principalmente la substantia nigra dove gli organelli di NM sono maggiormente presenti. Come descritto nell'introduzione (sez.1.2.5), la malattia di Parkinson si sviluppa in una condizione caratterizzata da più fattori di vulnerabilità, tra cui l'accumulo di materiale cellulare, disfunzioni della degradazione di proteine, stress ossidativo e infiammazione (fig.4.17). L'accumulo di organelli di NM, sebbene non sia ad oggi considerato come fattore di rischio per la malattia di Parkinson, sembra essere correlato a molti di questi fattori che stanno alla base della vulnerabilità della substantia nigra verso la neurodegenerazione.



**Figura 4.17. Riepilogo dei fattori ritenuti importanti per l'eziologia e la patogenesi della malattia di Parkinson (vedi introduzione alla sez.1.2).** L'organello di NM possiede un ruolo nella protezione del neurone verso alcuni fattori come lo stress ossidativo e l'accumulo di materiale intracellulare. D'altra parte, l'organello di NM potrebbe contribuire all'abbassamento della capacità lisosomiale/autofagica, all'aumento dello stress ossidativo e all'aumento di infiammazione osservati durante la patogenesi della malattia di Parkinson.

## 5 CONCLUSIONI

In questa tesi è stato caratterizzato l'organello di NM della substantia nigra umana con approccio proteomico. Grazie all'utilizzo di tecnologia proteomica MudPIT è stato possibile identificare un numero elevato di proteine anche se presenti in bassa quantità nei campioni. L'elevata sensibilità della tecnologia MudPIT ha infatti permesso di definire con buona confidenza le proteine significative dell'organello di NM nonostante l'utilizzo di piccole quantità di campione. Inoltre, l'utilizzo di MudPIT, con separazione dei peptidi attraverso cromatografia liquida, ha consentito l'identificazione di proteine con pesi molecolari e punti isoelettrici che ne avrebbero impedito l'identificazione con metodi proteomici basati su gel-elettroforesi.

La caratterizzazione di organelli di NM è avvenuta attraverso l'analisi di campioni di diverso tipo: organelli di NM isolato in toto, organelli di NM trattati per la rimozione delle membrane, pigmento di NM isolato direttamente da tessuto. Questo approccio ha reso possibile l'identificazione di più proteine e con livelli di confidenza più elevati, e la localizzazione di alcune proteine nelle diverse componenti dell'organello.

Grazie allo studio della componente proteica dell'organello è stato possibile identificare alcune proteine potenzialmente coinvolte nella formazione della NM e nella formazione dell'organello di NM. È stata confermata la presenza di proteine già note per essere correlate con la formazione dell'organello di NM come quelle lisosomiali. Di notevole interesse è stata l'osservazione di alcune proteine non lisosomiali ma con altre particolari caratteristiche; ad esempio l'identificazione di proteine d'accumulo tipiche di malattie lisosomiali, di proteine importanti nei meccanismi antiossidanti e di proteine coinvolte nei meccanismi di controllo qualità delle proteine.

I risultati ottenuti hanno suggerito nuove ipotesi per spiegare l'origine dell'organello di NM e per comprendere la sua stretta connessione con alcuni tra i fenomeni maggiormente coinvolti durante l'invecchiamento e la neurodegenerazione (danni ai sistemi lisosomiali/autofagici, accumulo di materiale intracellulare, aumento dello stress ossidativo).

Questo studio apre a nuove linee di ricerca atte ad approfondire alcuni aspetti emersi dai risultati ottenuti. Successivamente alla validazione di alcune proteine osservate, è di notevole interesse la caratterizzazione di organelli di NM isolati da soggetti parkinsoniani e l'indagine di proteine diversamente espresse e/o accumulate durante la malattia. Questo tipo di studio potrebbe aiutare a comprendere quali caratteristiche assume l'organello durante la neurodegenerazione e quali caratteristiche lo rendono potenzialmente citotossico per la cellula. Parallelamente, con l'ausilio di modelli cellulari, sarebbe necessario capire quali delle proteine osservate in questo studio possono favorire l'aggregazione e la formazione di NM. Analogamente, in cultura cellulare, si dovrebbe verificare che tipo di meccanismo autofagico regola formazione dell'organello di NM. Data la protezione che deriva dalla formazione di NM e dal

suo contenimento in organelli autofagici sarebbe una possibile prospettiva la ricerca di molecole capaci di stimolare questi meccanismi proteggendo la cellula da tossicità dovuta a stress ossidativo e accumulo di materiale intracellulare.



## 6 BIBLIOGRAFIA

- [1] D. J. Moore, A. B. West, V. L. Dawson, and T. M. Dawson, "MOLECULAR PATHOPHYSIOLOGY OF PARKINSON'S DISEASE," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 28, no. 1, pp. 57-87, Jul. 2005.
- [2] M. P. Mattson, "Pathways towards and away from Alzheimer's disease," *Nature*, vol. 430, no. 7000, pp. 631-639, Aug. 2004.
- [3] K. A. Sieradzan and D. M. Mann, "The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 27, no. 1, pp. 1-21, Feb. 2001.
- [4] M. P. Mattson and T. Magnus, "Ageing and neuronal vulnerability," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 7, no. 4, pp. 278-294, Apr. 2006.
- [5] Y. S. Rajawat, Z. Hilioti, and I. Bossis, "Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system," *Ageing Research Reviews*, vol. 8, no. 3, pp. 199-213, Jul. 2009.
- [6] F. Serrano and E. Klann, "Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus," *Ageing Research Reviews*, vol. 3, no. 4, pp. 431-443, Nov. 2004.
- [7] L. Zecca, M. B. H. Youdim, P. Riederer, J. R. Connor, and R. R. Crichton, "Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 5, no. 11, pp. 863-873, 2004.
- [8] B. N. Ames, "Delaying the mitochondrial decay of aging," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1019, pp. 406-411, Jun. 2004.
- [9] T. Lu et al., "Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain," *Nature*, vol. 429, no. 6994, pp. 883-891, Jun. 2004.
- [10] D. A. Gray, M. Tsigotis, and J. Wouffe, "Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain," *Science of Aging Knowledge Environment: SAGE KE*, vol. 2003, no. 34, p. RE6, Aug. 2003.
- [11] D. HARMAN, "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry," *Journal of Gerontology*, vol. 11, no. 3, pp. 298-300, Jul. 1956.
- [12] R. S. Sohal and R. Weindruch, "Oxidative stress, caloric restriction, and aging," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 273, no. 5271, pp. 59-63, Jul. 1996.
- [13] D. Harman, "The aging process," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 11, pp. 7124-7128, Nov. 1981.
- [14] A. H. Schapira and P. Jenner, "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease," *Movement Disorders*, vol. 26, no. 6, pp. 1049-1055, May 2011.
- [15] S. Melov, "Modeling mitochondrial function in aging neurons," *Trends in Neurosciences*, vol. 27, no. 10, pp. 601-606, Oct. 2004.
- [16] C. A. Ross and M. A. Poirier, "Protein aggregation and neurodegenerative disease," *Nature Medicine*, vol. 10, pp. S10-17, Jul. 2004.
- [17] R. R. Kopito, "Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation," *Trends in Cell Biology*, vol. 10, no. 12, pp. 524-530, Dec. 2000.
- [18] A. Ciechanover, "Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting," *Cell Death and Differentiation*, vol. 12, no. 9, pp. 1178-1190, Sep. 2005.
- [19] A. Ciechanover, A. Orian, and A. L. Schwartz, "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 77, no. 34, pp. 40-51, Jan. 2000.
- [20] G. Carrard, A.-L. Bulteau, I. Petropoulos, and B. Friguet, "Impairment of proteasome structure and function in aging," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 34, no. 11, pp. 1461-1474, Nov. 2002.
- [21] H. Ohtsuka, R. Takahashi, and S. Goto, "Age-related accumulation of high-molecular-weight ubiquitin protein conjugates in mouse brains," *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 50, no. 5, pp. B277-281, Sep. 1995.
- [22] C. De Duve and R. Wattiaux, "Functions of lysosomes," *Annual Review of Physiology*, vol. 28, pp. 435-492, 1966.
- [23] J. P. Luzio, P. R. Pryor, and N. A. Bright, "Lysosomes: fusion and function," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 8, pp. 622-632, Aug. 2007.
- [24] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, "Autophagy fights disease through cellular self-digestion," *Nature*, vol. 451, no. 7182, pp. 1069-1075, Feb. 2008.
- [25] J. F. Dice, "Chaperone-mediated autophagy," *Autophagy*, vol. 3, no. 4, pp. 295-299, Aug. 2007.
- [26] W. F. Ward, "Protein degradation in the aging organism," *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, vol. 29, pp. 35-42, 2002.
- [27] G. O. Ivy, F. Schottler, J. Wenzel, M. Baudry, and G. Lynch, "Inhibitors of lysosomal enzymes: accumulation of lipofuscin-like dense bodies in the brain," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 226, no. 4677, pp. 985-987, Nov. 1984.
- [28] D. A. Gray and J. Wouffe, "Lipofuscin and Aging: A Matter of Toxic Waste," *Sci. Aging Knowl. Environ.*, vol. 2005, no. 5, p. re1, Feb. 2005.
- [29] U. T. Brunk and A. Terman, "Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 33, no. 5, pp. 611-619, Sep. 2002.

- [30] A. Terman, H. Dalen, and U. T. Brunk, "Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during amino acid starvation," *Experimental Gerontology*, vol. 34, no. 8, pp. 943-957, Dec. 1999.
- [31] R. A. Nixon, P. M. Mathews, and A. M. Cataldo, "The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease," *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, vol. 3, no. 1, pp. 97-107, Feb. 2001.
- [32] B. Levine and D. J. Klionsky, "Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy," *Developmental Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 463-477, Apr. 2004.
- [33] C.-W. Wang and D. J. Klionsky, "The molecular mechanism of autophagy," *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, vol. 9, no. 3-4, pp. 65-76, Apr. 2003.
- [34] T. Yorimitsu and D. J. Klionsky, "Autophagy: molecular machinery for self-eating," *Cell Death and Differentiation*, vol. 12 Suppl 2, pp. 1542-1552, Nov. 2005.
- [35] T. Hara et al., "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice," *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 885-889, Jun. 2006.
- [36] M. Komatsu et al., "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice," *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 880-884, Jun. 2006.
- [37] D. C. Rubinsztein, J. E. Gestwicki, L. O. Murphy, and D. J. Klionsky, "Potential therapeutic applications of autophagy," *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 6, no. 4, pp. 304-312, Apr. 2007.
- [38] J. Parkinson, *An Essay on the Shaking Palsy*. Whittingham and Rowland, London, 1817.
- [39] J. Charcot, *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière*. Bureau du Progrès Médical: V.A. Delahaye et Co.: Paris, 1880.
- [40] A. Carlsson, M. LINDQVIST, T. MAGNUSSON, and B. WALDECK, "On the presence of 3-hydroxytyramine in brain," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 127, no. 3296, p. 471, Feb. 1958.
- [41] H. Ehringer and O. Hornykiewicz, "Verteilung Von Noradrenalin Und Dopamin (3-Hydroxytyramin) Im Gehirn Des Menschen Und Ihr Verhalten Bei Erkrankungen Des Extrapyramidalen Systems," *Klinische Wochenschrift*, vol. 38, pp. 1236-1239, Dec. 1960.
- [42] O. Hornykiewicz, "[The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease]," *Wiener Klinische Wochenschrift*, vol. 75, pp. 309-312, May 1963.
- [43] S. Fahn, "Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 991, no. 1, pp. 1-14, Jun. 2003.
- [44] A. J. Lees, J. Hardy, and T. Revesz, "Parkinson's disease," *Lancet*, vol. 373, no. 9680, pp. 2055-2066, Jun. 2009.
- [45] W. Dauer and S. Przedborski, "Parkinson's disease: mechanisms and models," *Neuron*, vol. 39, no. 6, pp. 889-909, 2003.
- [46] C. D. Marsden, "Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals," *Journal of Anatomy*, vol. 95, pp. 256-261, Apr. 1961.
- [47] J. M. FEARNLEY and A. J. LEES, "AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY," *Brain*, vol. 114, no. 5, pp. 2283-2301, Oct. 1991.
- [48] D. J. Brooks, "Detection of preclinical Parkinson's disease with PET," *Neurology*, vol. 41, no. 5 Suppl 2, pp. 24-27, May 1991.
- [49] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R. A. I. de Vos, E. N. H. Jansen Steur, and E. Braak, "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 24, no. 2, pp. 197-211, Apr. 2003.
- [50] W. R. Gibb and A. J. Lees, "The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease," *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, vol. 51, no. 6, pp. 745-752, Jun. 1988.
- [51] L. S. Forno, "Neuropathology of Parkinson's disease," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 55, no. 3, pp. 259-272, Mar. 1996.
- [52] M. G. Spillantini, R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert, "α-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 11, pp. 6469-6473, May 1998.
- [53] I. Martin, V. L. Dawson, and T. M. Dawson, "Recent advances in the genetics of Parkinson's disease," *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, vol. 12, pp. 301-325, Sep. 2011.
- [54] J. Hardy, "Genetic Analysis of Pathways to Parkinson Disease," *Neuron*, vol. 68, no. 2, pp. 201-206, Oct. 2010.
- [55] M. Vila and S. Przedborski, "Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease," *Nature Medicine*, vol. 10, pp. S58-62, Jul. 2004.
- [56] R. Jakes, M. G. Spillantini, and M. Goedert, "Identification of two distinct synucleins from human brain," *FEBS Letters*, vol. 345, no. 1, pp. 27-32, May 1994.
- [57] T. B. Sherer et al., "An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 16, pp. 7006-7015, Aug. 2002.
- [58] K. Nuytemans, J. Theuns, M. Cruts, and C. Van Broeckhoven, "Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update," *Human Mutation*, vol. 31, no. 7, pp. 763-780, Jul. 2010.
- [59] M. C. Irizarry et al., "Characterization of the precursor protein of the non-A beta component of senile plaques (NACP) in the human central nervous system," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 55, no. 8, pp. 889-895, Aug. 1996.
- [60] V. M. Nemani et al., "Increased Expression of α-Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis," *Neuron*, vol. 65, pp. 66-79, Jan. 2010.

- [61] B. D. Lee et al., "Inhibitors of leucine-rich repeat kinase-2 protect against models of Parkinson's disease," *Nat Med*, vol. 16, no. 9, pp. 998-1000, 2010.
- [62] T. M. Dawson, H. S. Ko, and V. L. Dawson, "Genetic Animal Models of Parkinson's Disease," *Neuron*, vol. 66, pp. 646-661, Jun. 2010.
- [63] K. A. Conway, J. C. Rochet, R. M. Bieganski, and P. T. Lansbury, "Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, no. 5545, pp. 1346-1349, Nov. 2001.
- [64] B. I. Giasson et al., "Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 290, no. 5493, pp. 985-989, Nov. 2000.
- [65] A. Velayati, W. H. Yu, and E. Sidransky, "The Role of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease and Lewy Body Disorders," *Current Neurology and Neuroscience Reports*, vol. 10, pp. 190-198, Apr. 2010.
- [66] A. B. West et al., "Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 46, pp. 16842-16847, Nov. 2005.
- [67] M. R. Cookson, "The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease," *Nat Rev Neurosci*, vol. 11, no. 12, pp. 791-797, Dec. 2010.
- [68] C. Gaig, M. J. Martí, M. Ezquerra, M. J. Rey, A. Cardozo, and E. Tolosa, "G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies," *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, vol. 78, no. 6, pp. 626-628, Jun. 2007.
- [69] X. Lin et al., "Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein," *Neuron*, vol. 64, no. 6, pp. 807-827, Dec. 2009.
- [70] M. W. Dodson and M. Guo, "Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease," *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 17, no. 3, pp. 331-337, Jun. 2007.
- [71] A. J. Whitworth and L. J. Pallanck, "The PINK1/Parkin pathway: a mitochondrial quality control system?," *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 41, pp. 499-503, Dec. 2009.
- [72] C. Zhou et al., "The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 33, pp. 12022-12027, 2008.
- [73] T. M. Dawson and V. L. Dawson, "The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease," *Movement Disorders*, vol. 25, no. 1, p. S32-S39, Jan. 2010.
- [74] H. S. Ko et al., "Phosphorylation by the c-Abl protein tyrosine kinase inhibits parkin's ubiquitination and protective function," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 38, pp. 16691-16696, 2010.
- [75] J. C. Greene, A. J. Whitworth, I. Kuo, L. A. Andrews, M. B. Feany, and L. J. Pallanck, "Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 7, pp. 4078-4083, Apr. 2003.
- [76] Y. Pesah et al., "*Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress," *Development (Cambridge, England)*, vol. 131, no. 9, pp. 2183-2194, May 2004.
- [77] J. Wang et al., "Analysis of SCA2 and SCA3/MJD repeats in Parkinson's disease in mainland China: Genetic, clinical, and positron emission tomography findings," *Movement Disorders*, vol. 24, no. 13, pp. 2007-2011, Oct. 2009.
- [78] C. Vives-Bauza and S. Przedborski, "PINK1 points Parkin to mitochondria," *Autophagy*, vol. 6, pp. 674-675, Jul. 2010.
- [79] D. P. Narendra et al., "PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin," *PLoS Biol*, vol. 8, no. 1, p. e1000298, Jan. 2010.
- [80] S. Geisler et al., "The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations," *Autophagy*, vol. 6, pp. 871-878, Oct. 2010.
- [81] V. Bonifati et al., "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 299, no. 5604, pp. 256-259, Jan. 2003.
- [82] J.-M. Kim et al., "Importance of Low-Range CAG Expansion and CAA Interruption in SCA2 Parkinsonism," *Arch Neurol*, vol. 64, no. 10, pp. 1510-1518, Oct. 2007.
- [83] M. S. Goldberg et al., "Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1," *Neuron*, vol. 45, no. 4, pp. 489-496, Feb. 2005.
- [84] E. Andres-Mateos et al., "DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 37, pp. 14807-14812, 2007.
- [85] K. J. Thomas et al., "DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy," *Human Molecular Genetics*, vol. 20, no. 1, pp. 40-50, Jan. 2011.
- [86] W. Zhou and C. R. Freed, "DJ-1 Up-regulates Glutathione Synthesis during Oxidative Stress and Inhibits A53T  $\alpha$ -Synuclein Toxicity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 52, pp. 43150-43158, Dec. 2005.
- [87] T. P. Singer, N. Castagnoli Jr., R. R. Ramsay, and A. J. Trevor, "Biochemical Events in the Development of Parkinsonism Induced by 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine," *Journal of Neurochemistry*, vol. 49, no. 1, pp. 1-8, Jul. 1987.
- [88] J. D. Adams Jr. and I. N. Odunze, "Oxygen free radicals and Parkinson's disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 10, no. 2, pp. 161-169, 1991.
- [89] C. M. Tanner and S. M. Goldman, "Epidemiology of Parkinson's disease," *Neurologic Clinics*, vol. 14, no. 2, pp. 317-335, May 1996.
- [90] L. M. L. de Lau and M. M. B. Breteler, "Epidemiology of Parkinson's disease," *Lancet Neurology*, vol. 5, no. 6, pp. 525-535, Jun. 2006.

- [91] H. H. Liou et al., "Environmental risk factors and Parkinson's disease," *Neurology*, vol. 48, no. 6, pp. 1583-1588, Jun. 1997.
- [92] R. Betarbet, T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov, and J. T. Greenamyre, "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease," *Nature Neuroscience*, vol. 3, no. 12, pp. 1301-1306, Dec. 2000.
- [93] M. A. Hernán, B. Takkouche, F. Caamaño-Isorna, and J. J. Gestal-Otero, "A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease," *Annals of Neurology*, vol. 52, no. 3, pp. 276-284, Sep. 2002.
- [94] U. Ungerstedt, T. Ljungberg, and G. Steg, "Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons," *Advances in Neurology*, vol. 5, pp. 421-426, 1974.
- [95] D. Sulzer et al., "Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 22, pp. 11869-11874, 2000.
- [96] L. Zecca, F. A. Zucca, H. Wilms, and D. Sulzer, "Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics," *Trends in Neurosciences*, vol. 26, no. 11, pp. 578-580, 2003.
- [97] D. T. Dexter et al., "Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia," *Brain: A Journal of Neurology*, vol. 114 ( Pt 4), pp. 1953-1975, Aug. 1991.
- [98] O. Hornykiewicz and S. J. Kish, "Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease," *Advances in Neurology*, vol. 45, pp. 19-34, 1987.
- [99] Z. I. Alam, S. E. Daniel, A. J. Lees, D. C. Marsden, P. Jenner, and B. Halliwell, "A Generalised Increase in Protein Carbonyls in the Brain in Parkinson's but Not Incidental Lewy Body Disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 69, no. 3, pp. 1326-1329, Sep. 1997.
- [100] D. T. Dexter et al., "Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: An HPLC and ESR study," *Movement Disorders*, vol. 9, no. 1, pp. 92-97, Jan. 1994.
- [101] M. Gu et al., "Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 158, no. 1, pp. 24-29.
- [102] A. H. V. Schapira, "The clinical relevance of levodopa toxicity in the treatment of Parkinson's disease," *Movement Disorders*, vol. 23, no. 3, p. S515-S520, Jan. 2008.
- [103] A. H. Schapira, J. M. Cooper, D. Dexter, P. Jenner, J. B. Clark, and C. D. Marsden, "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease," *Lancet*, vol. 1, no. 8649, p. 1269, Jun. 1989.
- [104] A. H. V. Schapira et al., "Anatomic and Disease Specificity of NADH CoQ1 Reductase (Complex I) Deficiency in Parkinson's Disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 55, no. 6, pp. 2142-2145, Dec. 1990.
- [105] D. T. Dexter, P. Jenner, A. H. V. Schapira, and C. D. Marsden, "Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia," *Annals of Neurology*, vol. 32, no. 1, p. S94-S100, Jan. 1992.
- [106] V. M. Mann et al., "Complex I, Iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra," *Annals of Neurology*, vol. 36, no. 6, pp. 876-881, Dec. 1994.
- [107] A. H. V. Schapira, "Oxidative stress in Parkinson's disease," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 21, no. 1, pp. 3-9, Feb. 1995.
- [108] W.-W. Li et al., "Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice," *Neuroreport*, vol. 18, no. 15, pp. 1543-1546, Oct. 2007.
- [109] F. Kamp et al., "Inhibition of mitochondrial fusion by  $\alpha$ -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1," *The EMBO Journal*, vol. 29, no. 20, pp. 3571-3589, Oct. 2010.
- [110] M. G. Spillantini, R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert, "alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 11, pp. 6469-6473, May 1998.
- [111] T. Kitada et al., "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism," *Nature*, vol. 392, no. 6676, pp. 605-608, Apr. 1998.
- [112] E. Leroy et al., "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease," *Nature*, vol. 395, no. 6701, pp. 451-452, Oct. 1998.
- [113] K. S. P. McNaught, R. Belzaira, O. Isacson, P. Jenner, and C. W. Olanow, "Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease," *Experimental Neurology*, vol. 179, no. 1, pp. 38-46, Jan. 2003.
- [114] K. S. McNaught, C. W. Olanow, B. Halliwell, O. Isacson, and P. Jenner, "Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease," *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 2, no. 8, pp. 589-594, Aug. 2001.
- [115] K. S. P. McNaught, R. Belzaira, P. Jenner, C. W. Olanow, and O. Isacson, "Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease," *Neuroscience Letters*, vol. 326, no. 3, pp. 155-158, Jul. 2002.
- [116] L. Alvarez-Erviti et al., "Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains," *Archives of Neurology*, Aug. 2010.
- [117] B. Dehay et al., "Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 37, pp. 12535-12544, Sep. 2010.
- [118] Y. Chen, E. McMillan-Ward, J. Kong, S. J. Israels, and S. B. Gibson, "Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species," *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 23, pp. 4155-4166, Dec. 2007.

- [119] M. E. Gegg and A. H. V. Schapira, "PINK1-parkin-dependent mitophagy involves ubiquitination of mitofusins 1 and 2: Implications for Parkinson disease pathogenesis," *Autophagy*, vol. 7, no. 2, pp. 243-245, Feb. 2011.
- [120] E. C. Hirsch and S. Hunot, "Nitric oxide, glial cells and neuronal degeneration in parkinsonism," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 21, no. 5, pp. 163-165, May 2000.
- [121] S. Santorius, *De statica medicina ad respensione ad statica masticem. Sphorismorum sectionibus septem comprehensa*. Marantonio Brogiollo, Venezia, Italy, 1614.
- [122] A. Littré, *Histoire de l'academie royale des sciences*. Hochereau, Paris, 1720.
- [123] V. Furth, O. Schmeider, and H. Schneider, "Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung," *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.*, vol. 1, p. 229, 1902.
- [124] H. S. Raper, "The Tyrosinase-tyrosine Reaction: Production from Tyrosine of 5: 6-Dihydroxyindole and 5: 6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid-the Precursors of Melanin," *The Biochemical Journal*, vol. 21, no. 1, pp. 89-96, 1927.
- [125] G. Prota and R. A. Nicolaus, *On the biogenesis of phaeomelanins, Advances in Biology of Skin, vol 8, The Pigmentary System*. W Montagna, F Hu Pergamon Press, New York, 1967.
- [126] G. Prota and R. A. Nicolaus, "Struttura e biogenesi delle feomelanine. I. Isolamento e proprietà dei pigmenti delle piume," *Gazz. Chim. Ital.*, vol. 97, p. 665, 1967.
- [127] R. A. Nicolaus, *Melanins*. Hermann Press, Paris, 1968.
- [128] G. Prota, G. Scherillo, E. Napolano, and R. A. Nicolaus, "Struttura e biogenesi delle feomelanine. II. Sulla reazione tra chinoni e cisteina," *Gazz. Chim. Ital.*, vol. 97, p. 1451, 1967.
- [129] G. Prota, G. Scherillo, and R. A. Nicolaus, "Struttura e biogenesi delle feomelanine. IV. Sintesi e proprietà della 5-S-cisteinildopa," *Gazz. Chim. Ital.*, vol. 98, p. 495, 1968.
- [130] L. Minale, E. Fattorusso, G. Cimino, S. De Stefano, and R. A. Nicolaus, "Struttura e biogenesi delle feomelanine. III. Prodotti di de-gradazione," *Gazz. Chim. Ital.*, vol. 97, p. 1636, 1967.
- [131] S. Ito and K. Wakamatsu, "Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 84, no. 3, pp. 582-592, Jun. 2008.
- [132] L. Panizzi and R. A. Nicolaus, "Ricerche sulle melanine - I. Sulla melanina di Seppia," *Gazz. Chim. Ital.*, vol. 82, p. 435, 1952.
- [133] E. Fattorusso, L. Minale, S. De Stefano, G. Cimino, and R. A. Nicolaus, "Struttura e biogenesi delle feomelanine. Nota V. Sulla struttura della gallofeomelanina-1," *Gazz. Chim. Ital.*, vol. 98, p. 1443, 1968.
- [134] S. Ito, K. Wakamatsu, and H. Ozeki, "Chemical Analysis of Melanins and its Application to the Study of the Regulation of Melanogenesis," *Pigment Cell Research*, vol. 13, pp. 103-109, Jun. 2000.
- [135] K. Wakamatsu, S. Ito, and J. L. Rees, "The Usefulness of 4-Amino-3-hydroxyphenylalanine as a Specific Marker of Pheomelanin," *Pigment Cell Research*, vol. 15, no. 3, pp. 225-232, Jun. 2002.
- [136] K. Wakamatsu and S. Ito, "Advanced Chemical Methods in Melanin Determination," *Pigment Cell Research*, vol. 15, no. 3, pp. 174-183, Jun. 2002.
- [137] S. Ito and K. Wakamatsu, "An Improved Modification of Permanganate Oxidation of Eumelanin That Gives a Constant Yield of Pyrrole-2,3,5-Tricarboxylic Acid," *Pigment Cell Research*, vol. 7, no. 3, pp. 141-144, Jun. 1994.
- [138] H. Ozeki, S. Ito, K. Wakamatsu, and A. J. Thody, "Spectrophotometric Characterization of Eumelanin and Pheomelanin in Hair," *Pigment Cell Research*, vol. 9, no. 5, pp. 265-270, Oct. 1996.
- [139] H. Ozeki, K. Wakamatsu, S. Ito, and I. Ishiguro, "Chemical Characterization of Eumelanins with Special Emphasis on 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid Content and Molecular Size," *Analytical Biochemistry*, vol. 248, no. 1, pp. 149-157, May 1997.
- [140] B. COMMONER, J. TOWNSEND, and G. E. PAKE, "Free radicals in biological materials," *Nature*, vol. 174, no. 4432, pp. 689-691, Oct. 1954.
- [141] C. C. Felix, J. S. Hyde, T. Sarna, and R. C. Sealy, "Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 100, p. 3922, 1978.
- [142] P. A. Riley, "Melanin," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 29, no. 11, pp. 1235-1239, Nov. 1997.
- [143] D. Van Neste and D. J. Tobin, "Hair cycle and hair pigmentation: dynamic interactions and changes associated with aging," *Micron*, vol. 35, no. 3, pp. 193-200, Apr. 2004.
- [144] M. SEIJI, T. B. FITZPATRICK, and M. S. BIRBECK, "The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 36, pp. 243-252, Apr. 1961.
- [145] G. Raposo and M. S. Marks, "Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 10, pp. 786-797, Ottobre 2007.
- [146] F. R. Maxfield and T. E. McGraw, "Endocytic recycling," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 5, no. 2, pp. 121-132, Feb. 2004.
- [147] T. Kushimoto et al., "A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 19, pp. 10698 - 10703, 2001.
- [148] C. E. Futter, "The molecular regulation of organelle transport in mammalian retinal pigment epithelial cells," *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, vol. 19, no. 2, pp. 104-111, Apr. 2006.
- [149] K. Van Den Bossche, J.-M. Naeyaert, and J. Lambert, "The quest for the mechanism of melanin transfer," *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, vol. 7, no. 7, pp. 769-778, Jul. 2006.
- [150] V. Basur et al., "Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins," *Journal of Proteome Research*, vol. 2, no. 1, pp. 69-79, Feb. 2003.

- [151] A. Chi et al., "Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes," *Journal of Proteome Research*, vol. 5, no. 11, pp. 3135-3144, Nov. 2006.
- [152] B. S. Kwon et al., "A melanocyte-specific gene, Pmel 17, maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is in a syntenic region on human chromosome 12," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 20, pp. 9228-9232, Oct. 1991.
- [153] V. J. Hearing and K. Tsukamoto, "Enzymatic control of pigmentation in mammals," *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 5, no. 14, pp. 2902-2909, Nov. 1991.
- [154] K. Tsukamoto, I. J. Jackson, K. Urabe, P. M. Montague, and V. J. Hearing, "A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase," *The EMBO Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 519-526, Feb. 1992.
- [155] B. S. Kwon, "Pigmentation genes: the tyrosinase gene family and the pmel 17 gene family," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 100, no. 2, p. 134S-140S, Feb. 1993.
- [156] F. Giordano, S. Simoes, and G. Raposo, "The ocular albinism type 1 (OA1) GPCR is ubiquitinated and its traffic requires endosomal sorting complex responsible for transport (ESCRT) function," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 29, pp. 11906-11911, Jul. 2011.
- [157] S. Rosemblat, D. Durham-Pierre, J. M. Gardner, Y. Nakatsu, M. H. Brilliant, and S. J. Orlow, "Identification of a melanosomal membrane protein encoded by the pink-eyed dilution (type II oculocutaneous albinism) gene," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 25, pp. 12071-12075, Dec. 1994.
- [158] J. M. Newton et al., "Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4," *American Journal of Human Genetics*, vol. 69, no. 5, pp. 981-988, Nov. 2001.
- [159] R. L. Lamason et al., "SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 310, no. 5755, pp. 1782-1786, Dec. 2005.
- [160] F. Vicq d'Azyr, *Traité d'anatomie et de physiologie avec des planches colores représentant au naturel les divers organes de l'Homme et des Animaux*. Paris: F. A. Didot, 1786.
- [161] H. J. Scherer, "Melanin pigmentation of the substantia nigra in primates," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 71, no. 1, pp. 91-98, Aug. 1939.
- [162] R. D. Lillie, "Metal reduction reactions of the melanins: histochemical studies," *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, vol. 5, no. 4, pp. 325-333, Jul. 1957.
- [163] R. D. Lillie, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. New York: The Blakiston Company, 1954.
- [164] R. D. Lillie, "The basophilia of melanins," *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, vol. 3, no. 6, pp. 453-454, Nov. 1955.
- [165] T. G. Bonner and Duncana, "Infra-red spectra of some melanins," *Nature*, vol. 194, pp. 1078-1079, Jun. 1962.
- [166] M. H. Van Woert, K. N. Prasad, and D. C. Borg, "Spectroscopic Studies of Substantia Nigra Pigment in Human Subjects," *Journal of Neurochemistry*, vol. 14, no. 7, pp. 707-716, Jul. 1967.
- [167] A. J. D. AGOSTINO and S. A. LUSE, "ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON THE HUMAN SUBSTANTIA NIGRA," *Neurology*, vol. 14, pp. 529-536, Jun. 1964.
- [168] P. E. Duffy and V. M. Tennyson, "Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus caeruleus in Parkinson's disease," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 24, no. 3, pp. 398-414, 1965.
- [169] H. Barden, "The histochemical relationship of neuromelanin and lipofuscin," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 28, no. 3, pp. 419-441, Jul. 1969.
- [170] C. D. Marsden, "Neuromelanin and Parkinson's disease," *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, vol. 19, pp. 121-141, 1983.
- [171] D. G. Graham, "On the origin and significance of neuromelanin," *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 103, no. 7, pp. 359-362, Jul. 1979.
- [172] D. M. Mann and P. O. Yates, "Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 21, no. 2, pp. 193-203, Feb. 1983.
- [173] E. Hirsch, A. M. Graybiel, and Y. A. Agid, "Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease," *Nature*, vol. 334, no. 6180, pp. 345-348, Jul. 1988.
- [174] L. Zecca et al., "New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 45, pp. 17567-17572, 2008.
- [175] L. Zecca, C. Mecacci, R. Seraglia, and E. Parati, "The chemical characterization of melanin contained in substantia nigra of human brain," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1138, no. 1, pp. 6-10, Jan. 1992.
- [176] L. Zecca et al., "Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain," *Neuroscience*, vol. 73, no. 2, pp. 407-415, 1996.
- [177] W. S. Enochs, M. J. Nilges, and H. M. Swartz, "Purified human neuromelanin, synthetic dopamine melanin as a potential model pigment, and the normal human substantia nigra: characterization by electron paramagnetic resonance spectroscopy," *Journal of Neurochemistry*, vol. 61, no. 1, pp. 68-79, Jul. 1993.
- [178] L. Zecca and H. M. Swartz, "Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin," *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section*, vol. 5, no. 3, pp. 203-213, 1993.

- [179] L. Zecca, R. Pietra, C. Goj, C. Mecacci, D. Radice, and E. Sabbioni, "Iron and other metals in neuromelanin, substantia nigra, and putamen of human brain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 62, no. 3, pp. 1097-1101, Mar. 1994.
- [180] E. Rosengren, E. Linder-Eliasson, and A. Carlsson, "Detection of 5-S-cysteinyl dopamine in human brain," *Journal of Neural Transmission*, vol. 63, no. 3-4, pp. 247-253, 1985.
- [181] K. Wakamatsu, S. Ito, and T. Nagatsu, "Cysteinyl dopamine is not incorporated into neuromelanin," *Neuroscience Letters*, vol. 131, no. 1, pp. 57-60, Sep. 1991.
- [182] R. Carstam, C. Brinck, A. Hindemith-Augustsson, H. Rorsman, and E. Rosengren, "The neuromelanin of the human substantia nigra," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1097, no. 2, pp. 152-160, Sep. 1991.
- [183] G. Odh, R. Carstam, J. Paulson, A. Wittbjer, E. Rosengren, and H. Rorsman, "Neuromelanin of the human substantia nigra: a mixed-type melanin," *Journal of Neurochemistry*, vol. 62, no. 5, pp. 2030-2036, May 1994.
- [184] K. Wakamatsu, K. Fujikawa, F. A. Zucca, L. Zecca, and S. Ito, "The structure of neuromelanin as studied by chemical degradative methods," *Journal of Neurochemistry*, vol. 86, no. 4, pp. 1015-1023, 2003.
- [185] M. G. Bridelli, D. Tampellini, and L. Zecca, "The structure of neuromelanin and its iron binding site studied by infrared spectroscopy," *Febs Letters*, vol. 457, no. 1, pp. 18-22, 1999.
- [186] W. D. Bush et al., "The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 40, pp. 14785-14789, 2006.
- [187] J. Cheng, S. C. Moss, and M. Eisner, "X-Ray Characterization of Melanins—II," *Pigment Cell Research*, vol. 7, no. 4, pp. 263-273, Aug. 1994.
- [188] O. S. Makin and L. C. Serpell, "Structures for amyloid fibrils," *FEBS Journal*, vol. 272, no. 23, pp. 5950-5961, Dec. 2005.
- [189] S. Aime, M. Fasano, B. Bergamasco, L. Lopiano, and G. Valente, "Evidence for a Glycidic-Lipidic Matrix in Human Neuromelanin, Potentially Responsible for the Enhanced Iron Sequestering Ability of Substantia Nigra," *Journal of Neurochemistry*, vol. 62, no. 1, pp. 369-371, Jan. 1994.
- [190] A. Dzierzega-Leczna et al., "GC/MS analysis of thermally degraded neuromelanin from the human substantia nigra," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 15, no. 6, pp. 920-926, Jun. 2004.
- [191] K. L. Double et al., "Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins," *Journal of Neurochemistry*, vol. 75, no. 6, pp. 2583-2589, 2000.
- [192] L. Zecca, P. Costi, C. Mecacci, S. Ito, M. Terreni, and S. Sonnino, "Interaction of human substantia nigra neuromelanin with lipids and peptides," *Journal of Neurochemistry*, vol. 74, no. 4, pp. 1758-1765, 2000.
- [193] H. Fedorow et al., "Dolichol is the major lipid component of human substantia nigra neuromelanin," *Journal of Neurochemistry*, vol. 92, no. 4, pp. 990-995, Feb. 2005.
- [194] W. C. Ward et al., "Identification and quantification of dolichol and dolichoic acid in neuromelanin from substantia nigra of the human brain," *Journal of Lipid Research*, vol. 48, no. 7, pp. 1457-1462, 2007.
- [195] T. Chojnacki and G. Dallner, "THE BIOLOGICAL ROLE OF DOLICHOL," *Biochemical Journal*, vol. 251, no. 1, pp. 1-9, 1988.
- [196] V. Cantagrel and D. J. Lefeber, "From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases," *Journal of Inherited Metabolic Disease*, vol. 34, pp. 859-867, Mar. 2011.
- [197] C. Valtersson, G. Vanduyn, A. J. Verkleij, T. Chojnacki, B. Dekruiff, and G. Dallner, "THE INFLUENCE OF DOLICHOL, DOLICHOL ESTERS, AND DOLICHYL PHOSPHATE ON PHOSPHOLIPID POLYMORPHISM AND FLUIDITY IN MODEL MEMBRANES," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, no. 5, pp. 2742-2751, 1985.
- [198] S. M. Gruner, "Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 11, pp. 3665-3669, Jun. 1985.
- [199] G. van Duijn, C. Valtersson, T. Chojnacki, A. J. Verkleij, G. Dallner, and B. de Kruijff, "Dolichyl phosphate induces non-bilayer structures, vesicle fusion and transbilayer movement of lipids: a model membrane study," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 861, no. 2, pp. 211-223, Oct. 1986.
- [200] E. Bergamini et al., "Ageing and oxidative stress: A role for dolichol in the antioxidant machinery of cell membranes?," *Journal of Alzheimers Disease*, vol. 6, no. 2, pp. 129-135, 2004.
- [201] V. Pallottini, M. Marino, G. Cavallini, E. Bergamini, and A. Trentalancia, "Age-related changes of isoprenoid biosynthesis in rat liver and brain," *Biogerontology*, vol. 4, pp. 371-378, 2003.
- [202] M. Marino et al., "Age-Dependent Accumulation of Dolichol in Rat Liver: Is Tissue Dolichol a Biomarker of Aging?," *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 53, no. 2, p. B87-B93, Mar. 1998.
- [203] F. Tribl et al., "Subcellular proteomics' of neuromelanin granules isolated from the human brain," *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, vol. 4, no. 7, pp. 945-957, Jul. 2005.
- [204] R. R. Crichton, S. Wilmet, R. Leggsyter, and R. J. Ward, "Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 91, no. 1, pp. 9-18, Jul. 2002.
- [205] P. Arosio, R. Ingrassia, and P. Cavadini, "Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more," *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1790, no. 7, pp. 589-599, Jul. 2009.
- [206] J. R. Connor and S. L. Menzies, "Cellular management of iron in the brain," *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 134, no. 0, pp. 33-44, Dec. 1995.

- [207] J. R. Connor, K. L. Boeshore, S. A. Benkovic, and S. L. Menzies, "Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 37, no. 4, pp. 461-465, Mar. 1994.
- [208] B. HALLGREN and P. SOURANDER, "The effect of age on the non-haemin iron in the human brain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 3, no. 1, pp. 41-51, Oct. 1958.
- [209] J. R. Connor, B. S. Snyder, P. Arosio, D. A. Loeffler, and P. LeWitt, "A quantitative analysis of isoferritins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains," *Journal of Neurochemistry*, vol. 65, no. 2, pp. 717-724, Aug. 1995.
- [210] L. Zecca et al., "The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 26, pp. 9843-9848, 2004.
- [211] L. Zecca et al., "Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes," *Journal of Neurochemistry*, vol. 76, no. 6, pp. 1766-1773, 2001.
- [212] L. Zecca et al., "The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals," *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, vol. 109, no. 5-6, pp. 663-672, May 2002.
- [213] S. Bohic et al., "Intracellular chemical imaging of the developmental phases of human neuromelanin using synchrotron X-ray microspectroscopy," *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 24, pp. 9557-9566, Dec. 2008.
- [214] K. Jellinger et al., "Iron-Melanin Complex in Substantia Nigra of Parkinsonian Brains: An X-Ray Microanalysis," *Journal of Neurochemistry*, vol. 59, no. 3, pp. 1168-1171, Sep. 1992.
- [215] M. Gerlach, A. X. Trautwein, L. Zecca, M. B. Youdim, and P. Riederer, "Mössbauer spectroscopic studies of purified human neuromelanin isolated from the substantia nigra," *Journal of Neurochemistry*, vol. 65, no. 2, pp. 923-926, Aug. 1995.
- [216] K. L. Double et al., "Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra," *Biochemical Pharmacology*, vol. 66, no. 3, pp. 489-494, 2003.
- [217] A. J. Kropf et al., "X-ray absorption fine-structure spectroscopy studies of Fe sites in natural human neuromelanin and synthetic analogues," *Biophysical Journal*, vol. 75, no. 6, pp. 3135-3142, 1998.
- [218] F. Tribl et al., "Identification of L-ferritin in neuromelanin granules of the human substantia nigra: a targeted proteomics approach," *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, vol. 8, no. 8, pp. 1832-1838, Aug. 2009.
- [219] L. Zecca, F. A. Zucca, A. Albertini, E. Rizzio, and R. G. Fariello, "A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease," *Neurology*, vol. 67, no. 7, p. S8-S11, 2006.
- [220] R. D'Amato, Z. Lipman, and S. Snyder, "Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin," *Science*, vol. 231, no. 4741, pp. 987-989, Feb. 1986.
- [221] J. W. Langston, P. Ballard, J. W. Tetrud, and I. Irwin, "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis," *Science*, vol. 219, no. 4587, pp. 979-80, 1983.
- [222] M. Gerlach, P. Riederer, H. Przuntek, and M. B. H. Youdim, "MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease," *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, vol. 208, no. 4, pp. 273-286, Dec. 1991.
- [223] R. J. D'Amato, G. M. Alexander, R. J. Schwartzman, C. A. Kitt, D. L. Price, and S. H. Snyder, "Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity," *Nature*, vol. 327, no. 6120, pp. 324-326, May 1987.
- [224] M. T. Herrero et al., "Does neuromelanin contribute to the vulnerability of catecholaminergic neurons in monkeys intoxicated with MPTP?," *Neuroscience*, vol. 56, no. 2, pp. 499-511, Sep. 1993.
- [225] N. G. Lindquist, B. S. Larsson, and A. Lydén-Sokolowski, "Autoradiography of [<sup>14</sup>C]paraquat or [<sup>14</sup>C]diquat in frogs and mice: Accumulation in neuromelanin," *Neuroscience Letters*, vol. 93, no. 1, pp. 1-6, Oct. 1988.
- [226] L. Zecca, D. Tampellini, M. Gerlach, P. Riederer, R. G. Fariello, and D. Sulzer, "Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour," *Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology*, vol. 54, no. 6, pp. 414-418, 2001.
- [227] M. Salazar, T. D. Sokoloski, and P. N. Patil, "Binding of dopaminergic drugs by the neuromelanin of the substantia nigra, synthetic melanins and melanin granules," *Federation Proceedings*, vol. 37, no. 10, pp. 2403-2407, Aug. 1978.
- [228] H. L. Moses, C. E. Ganote, D. L. Beaver, and S. S. Schuffman, "Light and electron microscopic studies of pigment in human and rhesus monkey substantia nigra and locus coeruleus," *The Anatomical Record*, vol. 155, no. 2, pp. 167-183, Jun. 1966.
- [229] D. Sulzer, E. Mosharov, Z. Tallozy, F. A. Zucca, J. D. Simon, and L. Zecca, "Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 106, no. 1, pp. 24-36, 2008.
- [230] J. M. Foley and D. Baxter, "On the nature of pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 17, no. 4, pp. 586-598, Oct. 1958.
- [231] M. Bazelon, G. M. Fenichel, and J. Randall, "Studies on neuromelanin. I. A melanin system in the human adult brainstem," *Neurology*, vol. 17, no. 5, pp. 512-519, May 1967.
- [232] D. Cowen, "The melanoneurons of the human cerebellum (nucleus pigmentosus cerebellaris) and homologues in the monkey," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 45, no. 3, pp. 205-221, May 1986.



- [233] W. Hild, *Das Neuron*. In: Möllendorff, W. v. a. B. (Ed.) *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. Viertes Band; Nervensystem; Viertes Teil; Das Neuron, Die Nervenzelle, Die Nervenfasern*. Berlin: W. Springer-Verlag, 1959.
- [234] L. Zecca, R. Fariello, P. Riederer, D. Sulzer, A. Gatti, and D. Tampellini, "The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease," *Febs Letters*, vol. 510, no. 3, pp. 216-220, 2002.
- [235] F. A. Zucca et al., "Neuromelanin and iron in human locus coeruleus and substantia nigra during aging: consequences for neuronal vulnerability," *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, vol. 113, no. 6, pp. 757-767, Jun. 2006.
- [236] Y. Xu, A. H. Stokes, W. M. Freeman, S. C. Kumer, B. A. Vogt, and K. E. Vrana, "Tyrosine mRNA is expressed in human substantia nigra," *Molecular Brain Research*, vol. 45, no. 1, pp. 159-162, Apr. 1997.
- [237] K. Tief, A. Schmidt, and F. Beermann, "New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain," *Molecular Brain Research*, vol. 53, no. 1-2, pp. 307-310, Jan. 1998.
- [238] K. Ikemoto, I. Nagatsu, S. Ito, R. A. King, A. Nishimura, and T. Nagatsu, "Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra?," *Neuroscience Letters*, vol. 253, no. 3, pp. 198-200, Sep. 1998.
- [239] F. A. Zucca et al., "The neuromelanin of human substantia nigra: Physiological and pathogenic aspects," *Pigment Cell Research*, vol. 17, no. 6, pp. 610-617, 2004.
- [240] B. Fornstedt, E. Rosengren, and A. Carlsson, "Occurrence and distribution of 5-S-cysteinylyl derivatives of dopamine, dopa and dopac in the brains of eight mammalian species," *Neuropharmacology*, vol. 25, no. 4, pp. 451-454, Apr. 1986.
- [241] Y. Liu and R. H. Edwards, "The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 20, pp. 125-156, 1997.
- [242] F. Solano, V. J. Hearing, and J. C. García-Borrón, "Neurotoxicity due to o-Quinones: Neuromelanin formation and possible mechanisms for o-Quinone detoxification," *Neurotoxicity Research*, vol. 1, pp. 153-169, Sep. 1999.
- [243] C. Liang, O. Nelson, U. Yazdani, P. Pasbakhsh, and D. C. German, "Inverse relationship between the contents of neuromelanin pigment and the vesicular monoamine transporter 2: Human midbrain dopamine neurons," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 473, no. 1, pp. 97-106, May 2004.
- [244] D. J. Klionsky et al., "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes," *Autophagy*, vol. 4, no. 2, pp. 151-175, Feb. 2008.
- [245] A. Biederbick, H. F. Kern, and H. P. Elsässer, "Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles," *European Journal of Cell Biology*, vol. 66, no. 1, pp. 3-14, Jan. 1995.
- [246] E. Brissaud, *Leçons sur les Maladies Nerveuses*. Masson et Cie. Paris, 1895.
- [247] A. Kastner, E. C. Hirsch, O. Lejeune, F. Javoy-Agid, O. Rascol, and Y. Agid, "Is the Vulnerability of Neurons in the Substantia Nigra of Patients with Parkinson's Disease Related to Their Neuromelanin Content?," *Journal of Neurochemistry*, vol. 59, no. 3, pp. 1080-1089, Sep. 1992.
- [248] D. Sulzer, "Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease," *Trends in Neurosciences*, vol. 30, no. 5, pp. 244-250, May 2007.
- [249] L. Zecca et al., "Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 106, no. 4, pp. 1866-1875, 2008.
- [250] S. Hunot and E. C. Hirsch, "Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease," *Annals of Neurology*, vol. 53, no. 3, p. S49-S60, Jan. 2003.
- [251] C. K. Glass, K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto, and F. H. Gage, "Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 918-934, Mar. 2010.
- [252] M. L. Block, L. Zecca, and J. S. Hong, "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 8, no. 1, pp. 57-69, 2007.
- [253] J. Bové, D. Prou, C. Perier, and S. Przedborski, "Toxin-induced models of Parkinson's disease," *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, vol. 2, no. 3, pp. 484-494, Jul. 2005.
- [254] H. WILMS, P. ROSENSTIEL, J. SIEVERS, G. DEUSCHL, L. ZECCA, and R. LUCIUS, "Activation of microglia by human neuromelanin is NF- $\kappa$ B dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease," *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 3, pp. 500-502, Mar. 2003.
- [255] L. Zecca et al., "Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease," *Acta Neuropathologica*, vol. 116, no. 1, pp. 47-55, 2008.
- [256] W. Zhang et al., "Neuromelanin Activates Microglia and Induces Degeneration of Dopaminergic Neurons: Implications for Progression of Parkinson's Disease," *Neurotoxicity Research*, Dec. 2009.
- [257] M. Shamoto-Nagai et al., "Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells," *Journal of Neural Transmission*, vol. 111, no. 10-11, pp. 1253-1265, 2004.
- [258] International Human Genome Sequencing Consortium, "Initial sequencing and analysis of the human genome," *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860-921, Feb. 2001.
- [259] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray," *Science*, vol. 270, no. 5235, pp. 467-470, Oct. 1995.
- [260] M. L. Yarmush and A. Jayaraman, "Advances in proteomic technologies," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 4, pp. 349-373, Aug. 2002.
- [261] J. R. Yates, C. I. Ruse, and A. Nakorchevsky, "Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 11, pp. 49-79, 2009.

- [262] M. Gstaiger and R. Aebersold, "Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology," *Nat Rev Genet*, vol. 10, no. 9, pp. 617-627, 2009.
- [263] F. Iborra and J.-M. Buhler, "Protein subunit mapping. A sensitive high resolution method," *Analytical Biochemistry*, vol. 74, no. 2, pp. 503-511, Aug. 1976.
- [264] C. Eckerskorn, K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, and F. Lottspeich, "Mass spectrometric analysis of blotted proteins after gel electrophoretic separation by matrix-assisted laser desorption/ionization," *ELECTROPHORESIS*, vol. 13, no. 1, pp. 664-665, Jan. 1992.
- [265] B. R. Herbert, J. L. Harry, N. H. Packer, A. A. Gooley, S. K. Pedersen, and K. L. Williams, "What place for polyacrylamide in proteomics?," *Trends in Biotechnology*, vol. 19, Supplement 1, no. 0, pp. 3-9, Oct. 2001.
- [266] L. Monteoliva and J. P. Albar, "Differential proteomics: An overview of gel and non-gel based approaches," *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, vol. 3, no. 3, pp. 220-239, Nov. 2004.
- [267] A. Pandey and M. Mann, "Proteomics to study genes and genomes," *Nature*, vol. 405, no. 6788, pp. 837-846, Jun. 2000.
- [268] H. Liu, D. Lin, and J. R. Yates 3rd, "Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era," *BioTechniques*, vol. 32, no. 4, pp. 898, 900, 902 passim, Apr. 2002.
- [269] D. A. Wolters, M. P. Washburn, and J. R. Yates 3rd, "An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics," *Analytical Chemistry*, vol. 73, no. 23, pp. 5683-5690, Dec. 2001.
- [270] X. Han, A. Aslanian, and J. R. Yates III, "Mass spectrometry for proteomics," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 12, no. 5, pp. 483-490, Oct. 2008.
- [271] B. Domon and R. Aebersold, "Mass Spectrometry and Protein Analysis," *Science*, vol. 312, no. 5771, pp. 212-217, Apr. 2006.
- [272] M. Hardman and A. A. Makarov, "Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source," *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 7, pp. 1699-1705, Apr. 2003.
- [273] P. Liao and J. Allison, "Dissecting matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 30, no. 5, pp. 763-766, May 1995.
- [274] P. R. Griffin, J. A. Coffman, L. E. Hood, and J. R. Yates III, "Structural analysis of proteins by capillary HPLC electrospray tandem mass spectrometry," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 111, no. 0, pp. 131-149, Dec. 1991.
- [275] M. R. Emmett and R. M. Caprioli, "Micro-electrospray mass spectrometry: Ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 5, pp. 605-613, Jul. 1994.
- [276] M. P. Washburn, D. Wolters, and J. R. Yates, "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology," *Nature Biotechnology*, vol. 19, no. 3, pp. 242-247, Mar. 2001.
- [277] F. Lavatelli et al., "A novel approach for the purification and proteomic analysis of pathogenic immunoglobulin free light chains from serum," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1814, no. 3, pp. 409-419, Mar. 2011.
- [278] E. M. Pasini, M. Kirkegaard, P. Mortensen, H. U. Lutz, A. W. Thomas, and M. Mann, "In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells," *Blood*, vol. 108, no. 3, pp. 791-801, 2006.
- [279] F. Roux-Dalvai et al., "Extensive Analysis of the Cytoplasmic Proteome of Human Erythrocytes Using the Peptide Ligand Library Technology and Advanced Mass Spectrometry," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 7, no. 11, pp. 2254-2269, Nov. 2008.
- [280] R. D. Bagshaw, D. J. Mahuran, and J. W. Callahan, "A Proteomic Analysis of Lysosomal Integral Membrane Proteins Reveals the Diverse Composition of the Organelle," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 4, no. 2, pp. 133-143, Feb. 2005.
- [281] H. Barden, "Relationship of golgi thiaminepyrophosphatase and lysosomal acid phosphatase to neuromelanin and lipofuscin in cerebral neurons of the aging rhesus monkey," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 29, no. 2, pp. 225-240, Apr. 1970.
- [282] T. Lübke, P. Lobel, and D. E. Sleat, "Proteomics of the lysosome," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1793, no. 4, pp. 625-635, Apr. 2009.
- [283] B. A. Schröder, C. Wrocklage, A. Hasilik, and P. Saftig, "The proteome of lysosomes," *Proteomics*, vol. 10, no. 22, pp. 4053-4076, Nov. 2010.
- [284] D. E. Sleat et al., "The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins," *Proteomics*, vol. 5, no. 6, pp. 1520-1532, Apr. 2005.
- [285] D. Reczek et al., "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase," *Cell*, vol. 131, no. 4, pp. 770-783, Nov. 2007.
- [286] D. Gao, M. Z. Ashraf, N. S. Kar, D. Lin, L. M. Sayre, and E. A. Podrez, "Structural basis for the recognition of oxidized phospholipids in oxidized low density lipoproteins by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 7, pp. 4447-4454, Feb. 2010.
- [287] E. R. M. Eckhardt et al., "High density lipoprotein endocytosis by scavenger receptor SR-BII is clathrin-dependent and requires a carboxyl-terminal dileucine motif," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 7, pp. 4348-4353, Feb. 2006.
- [288] M. R. Brodeur, L. Brissette, L. Falstraull, V. Luangrath, and R. Moreau, "Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL3," *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 23, no. 3, pp. 326-337, Mar. 2008.
- [289] B. Schröder, H.-P. Elsässer, B. Schmidt, and A. Hasilik, "Characterisation of lipofuscin-like lysosomal inclusion bodies from human placenta," *FEBS Letters*, vol. 581, no. 1, pp. 102-108, Jan. 2007.

- [290] D. E. Sleat, M. C. Della Valle, H. Zheng, D. F. Moore, and P. Lobel, "The mannose 6-phosphate glycoprotein proteome," *Journal of Proteome Research*, vol. 7, no. 7, pp. 3010-3021, Jul. 2008.
- [291] H. Schulze, T. Kolter, and K. Sandhoff, "Principles of lysosomal membrane degradation Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation," *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, vol. 1793, no. 4, pp. 674-683, 2009.
- [292] A. M. Cuervo and J. F. Dice, "Age-related decline in chaperone-mediated autophagy," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 40, pp. 31505-31513, Oct. 2000.
- [293] C. Zhang and A. M. Cuervo, "Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function," *Nature Medicine*, vol. 14, no. 9, pp. 959-965, Sep. 2008.
- [294] R. A. Nixon et al., "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 64, no. 2, pp. 113-122, Feb. 2005.
- [295] M. Koike et al., "Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons," *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 18, pp. 6898-6906, Sep. 2000.
- [296] L. Schneider and J. Zhang, "Lysosomal function in macromolecular homeostasis and bioenergetics in Parkinson's disease," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 5, p. 14, 2010.
- [297] L. Qiao et al., "Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity," *Molecular Brain*, vol. 1, no. 1, p. 17, 2008.
- [298] E. Kida, A. A. Golabek, M. Walus, P. Wujek, W. Kaczmarek, and K. E. Wisniewski, "Distribution of tripeptidyl peptidase I in human tissues under normal and pathological conditions," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 60, no. 3, pp. 280-292, Mar. 2001.
- [299] S.-J. Kim et al., "Palmitoyl protein thioesterase-1 deficiency impairs synaptic vesicle recycling at nerve terminals, contributing to neuropathology in humans and mice," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 9, pp. 3075-3086, Sep. 2008.
- [300] R. G. Cutler et al., "Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 7, pp. 2070-2075, Feb. 2004.
- [301] G. Dawson and S. Cho, "Batten's disease: clues to neuronal protein catabolism in lysosomes," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 60, no. 2, pp. 133-140, Apr. 2000.
- [302] A. Jalanko and T. Brulke, "Neuronal ceroid lipofuscinoses," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1793, no. 4, pp. 697-709, Apr. 2009.
- [303] A. G. Jensen et al., "Biochemical characterization and lysosomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76 (hypothetical protein LOC196463)," *Biochem J*, vol. 402, no. 3, pp. 449-58, 2007.
- [304] C. P. Morgan, R. Insall, L. Haynes, and S. Cockcroft, "Identification of phospholipase B from Dictyostelium discoideum reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast," *Biochemical Journal*, vol. 382, pp. 441-449, 2004.
- [305] K. Lakomek, A. Dickmanns, M. Kettwig, H. Urlaub, R. Ficner, and T. Lübke, "Initial insight into the function of the lysosomal 66.3 kDa protein from mouse by means of X-ray crystallography," *BMC Structural Biology*, vol. 9, p. 56, 2009.
- [306] H. Fedorow, F. Tribl, G. Halliday, M. Gerlach, P. Riederer, and K. L. Double, "Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease," *Progress in Neurobiology*, vol. 75, no. 2, pp. 109-124, Feb. 2005.
- [307] G. Vandessel, A. Lagrou, H. J. Hilderson, and W. Dierick, "CHARACTERIZATION OF THE INVITRO CONVERSION OF DOLICHOL TO DOLICHOATE IN BOVINE THYROID," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1167, no. 3, pp. 307-315, 1993.
- [308] H. A. VanHoute, P. P. VanVeldhoven, G. P. Mannaerts, M. I. Baes, and P. E. Declercq, "Metabolism of dolichol, dolichoic acid and nordolichoic acid in cultured cells," *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1347, no. 1, pp. 93-100, 1997.
- [309] T. K. Wong, G. L. Decker, and W. J. Lennarz, "Localization of dolichol in the lysosomal fraction of rat liver," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 11, pp. 6614-6618, Jun. 1982.
- [310] M. G. Anderson et al., "Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmented glaucoma in DBA/2J mice," *Nature Genetics*, vol. 30, no. 1, pp. 81-85, Jan. 2002.
- [311] T. Hoashi, S. Sato, Y. Yamaguchi, T. Passeron, K. Tamaki, and V. J. Hearing, "Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b, a melanocytic cell marker, is a melanosome-specific and proteolytically released protein," *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 24, no. 5, pp. 1616-1629, May 2010.
- [312] T. Haraszti, C. M. Trantow, A. Hedberg-Buenz, M. Grunze, and M. G. Anderson, "Spectral analysis by XANES reveals that GPNMB influences the chemical composition of intact melanosomes," *Pigment Cell & Melanoma Research*, vol. 24, no. 1, pp. 187-196, Feb. 2011.
- [313] B. Li et al., "The melanoma-associated transmembrane glycoprotein Gpnmb controls trafficking of cellular debris for degradation and is essential for tissue repair," *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Aug. 2010.
- [314] "A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease," *PLoS Genetics*, vol. 7, no. 6, p. e1002142, Jun. 2011.
- [315] J. Horwitz, "Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 21, pp. 10449-10453, Nov. 1992.
- [316] J. A. Carver, A. Rekas, D. C. Thorn, and M. R. Wilson, "Small Heat Shock Proteins and Clusterin: Intra- and Extracellular Molecular Chaperones with a Common Mechanism of Action and Function?," *IUBMB Life*, vol. 55, no. 12, pp. 661-668, Dec. 2003.

- [317] H. Ecroyd and J. A. Carver, "Crystallin proteins and amyloid fibrils," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 66, no. 1, pp. 62-81, Jan. 2009.
- [318] A. Rekas et al., "Interaction of the molecular chaperone alphaB-crystallin with alpha-synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity," *Journal of Molecular Biology*, vol. 340, no. 5, pp. 1167-1183, Jul. 2004.
- [319] J. Lowe et al., "Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease," *The Journal of Pathology*, vol. 155, no. 1, pp. 9-15, May 1988.
- [320] K. Ii, H. Ito, K. Tanaka, and A. Hirano, "Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 56, no. 2, pp. 125-131, Feb. 1997.
- [321] W. P. Gai, H. X. Yuan, X. Q. Li, J. T. Power, P. C. Blumbergs, and P. H. Jensen, "In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies," *Experimental Neurology*, vol. 166, no. 2, pp. 324-333, Dec. 2000.
- [322] W. Maruyama, M. Shamoto-Nagai, Y. Akao, P. Riederer, and M. Naoi, "The effect of neuromelanin on the proteasome activity in human dopaminergic SH-SY5Y cells," *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, no. 70, pp. 125-132, 2006.
- [323] A. Hershko, A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas, and I. A. Rose, "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 77, no. 4, pp. 1783-1786, Apr. 1980.
- [324] M. Komatsu et al., "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice," *The Journal of Cell Biology*, vol. 169, no. 3, pp. 425-434, May 2005.
- [325] N. Mizushima, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, "Autophagosome formation in mammalian cells," *Cell Structure and Function*, vol. 27, no. 6, pp. 421-429, Dec. 2002.
- [326] E. Hlavanda, J. Kovács, J. Oláh, F. Orosz, K. F. Medzihradsky, and J. Ovádi, "Brain-specific p25 protein binds to tubulin and microtubules and induces aberrant microtubule assemblies at substoichiometric concentrations," *Biochemistry*, vol. 41, no. 27, pp. 8657-8664, Jul. 2002.
- [327] E. Lindersson et al., "p25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 7, pp. 5703-5715, Feb. 2005.
- [328] A. Lehotzky et al., "Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival," *Journal of Cell Science*, vol. 117, no. 25, pp. 6249-6259, Dec. 2004.
- [329] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert, "Alpha-synuclein in Lewy bodies," *Nature*, vol. 388, no. 6645, pp. 839-840, Aug. 1997.
- [330] B. I. Giasson, I. V. J. Murray, J. Q. Trojanowski, and V. M.-Y. Lee, "A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of  $\alpha$ -Synuclein Is Essential for Filament Assembly," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 4, pp. 2380-2386, Jan. 2001.
- [331] L. L. Venda, S. J. Cragg, V. L. Buchman, and R. Wade-Martins, " $\alpha$ -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease," *Trends in Neurosciences*, vol. 33, no. 12, pp. 559-568, Dec. 2010.
- [332] B. Fornstedt and A. Carlsson, "A marked rise in 5-S-cysteinyldopamine levels in guinea-pig striatum following reserpine treatment," *Journal of Neural Transmission*, vol. 76, pp. 155-161, Jun. 1989.
- [333] M. Fasano, S. Giraudo, S. Coha, B. Bergamasco, and L. Lopiano, "Residual substantia nigra neuromelanin in Parkinson's disease is cross-linked to alpha-synuclein," *Neurochemistry International*, vol. 42, no. 7, pp. 603-606, Jun. 2003.
- [334] G. M. Halliday et al., " $\alpha$ -Synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease," *Brain*, vol. 128, no. 11, pp. 2654-2664, Nov. 2005.
- [335] F. P. Bellinger, A. V. Raman, M. A. Reeves, and M. J. Berry, "Regulation and function of selenoproteins in human disease," *The Biochemical Journal*, vol. 422, no. 1, pp. 11-22, Aug. 2009.
- [336] H. Imai et al., "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 305, no. 2, pp. 278-286, May 2003.
- [337] A. Seiler et al., "Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death," *Cell Metabolism*, vol. 8, no. 3, pp. 237-248, Sep. 2008.
- [338] F. P. Bellinger et al., "Glutathione Peroxidase 4 is associated with Neuromelanin in Substantia Nigra and Dystrophic Axons in Putamen of Parkinson's brain," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 6, no. 1, p. 8, 2011.
- [339] W. J. McConathy and P. Alaupovic, "Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system," *FEBS Letters*, vol. 37, no. 2, pp. 178-182, Dec. 1973.
- [340] J. Muffat and D. W. Walker, "Apolipoprotein D: an overview of its role in aging and age-related diseases," *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 9, no. 2, pp. 269-273, Jan. 2010.
- [341] W.-Y. Ong, C.-Y. Hu, and S. C. Patel, "Apolipoprotein D in the Niemann-Pick type C disease mouse brain: an ultrastructural immunocytochemical analysis," *Journal of Neurocytology*, vol. 31, no. 2, pp. 121-129, Feb. 2002.
- [342] J. P. de Magalhães, J. Curado, and G. M. Church, "Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging," vol. 25, no. 7, pp. 875-881, Apr. 2009.
- [343] M. D. Ganformina et al., "Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress," *Aging Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 506-515, Aug. 2008.
- [344] J. Muffat, D. W. Walker, and S. Benzer, "Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*," *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 19, pp. 7088-7093, May 2008.
- [345] C. Ordoñez, A. Navarro, C. Perez, A. Astudillo, E. Martínez, and J. Tolivia, "Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease," *Histology and Histopathology*, vol. 21, no. 4, pp. 361-366, Apr. 2006.
- [346] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, and H. M. Wisniewski, "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 13, pp. 6084-6089, May 1986.
- [347] M. Morris, S. Maeda, K. Vossel, and L. Mucke, "The many faces of tau," *Neuron*, vol. 70, no. 3, pp. 410-426, May 2011.
- [348] R. Dixit, J. L. Ross, Y. E. Goldman, and E. L. F. Holzbaur, "Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau," *Science*, vol. 319, no. 5866, pp. 1086-1089, Feb. 2008.
- [349] C. Bosc et al., "Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 5, pp. 2125-2130, Mar. 1996.
- [350] F. Letournel, A. Bocquet, F. Dubas, A. Barthelaix, and J. Eyer, "Stable tubule only polypeptides (STOP) proteins co-aggregate with spheroid neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 62, no. 12, pp. 1211-1219, Dec. 2003.
- [351] E. M. van Dam and P. J. Robinson, "Ral: Mediator of membrane trafficking," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 38, no. 11, pp. 1841-1847, 2006.
- [352] H. Plutner et al., "Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments.," *The Journal of Cell Biology*, vol. 115, no. 1, pp. 31-43, Oct. 1991.
- [353] S. Murphy, S. Martin, and R. G. Parton, "Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1791, no. 6, pp. 441-447, Jun. 2009.
- [354] C. E. L. Chua, B. Q. Gan, and B. L. Tang, "Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation," *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, vol. 68, no. 20, pp. 3349-3358, Oct. 2011.
- [355] C. M. Kusminski, S. Shetty, L. Orci, R. H. Unger, and P. E. Scherer, "Diabetes and apoptosis: lipotoxicity," *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, vol. 14, no. 12, pp. 1484-1495, Dec. 2009.
- [356] M. Beller, K. Thiel, P. J. Thul, and H. Jäckle, "Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus," *FEBS Letters*, vol. 584, no. 11, pp. 2176-2182, Jun. 2010.
- [357] Y. Fujimoto et al., "Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1644, no. 1, pp. 47-59, Feb. 2004.
- [358] I. M. Fearnley et al., "The sequence of the major protein stored in ovine ceroid lipofuscinosis is identical with that of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive proteolipid of mitochondrial ATP synthase.," *Biochemical Journal*, vol. 268, no. 3, pp. 751-758, Jun. 1990.
- [359] D. N. Palmer et al., "Mitochondrial ATP synthase subunit c storage in the ceroid-lipofuscinoses (Batten disease)," *American Journal of Medical Genetics*, vol. 42, no. 4, pp. 561-567, Feb. 1992.
- [360] M. Elleder, J. Sokolová, and M. Hrebíček, "Follow-up study of subunit c of mitochondrial ATP synthase (SCMAS) in Batten disease and in unrelated lysosomal disorders," *Acta Neuropathologica*, vol. 93, no. 4, pp. 379-390, Apr. 1997.
- [361] Y. Cao et al., "Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 29, pp. 20483-20493, Jul. 2006.
- [362] J. X. Cao, B. F. Koop, and C. Upton, "A human homolog of the vaccinia virus HindIII K4L gene is a member of the phospholipase D superfamily," *Virus Research*, vol. 48, no. 1, pp. 11-18, Apr. 1997.
- [363] K. M. Pedersen, B. Finsen, J. E. Celis, and N. A. Jensen, "Expression of a novel murine phospholipase D homolog coincides with late neuronal development in the forebrain," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 47, pp. 31494-31504, Nov. 1998.
- [364] A. Munck, C. Bohm, N. M. Seibel, Z. H. Hosseini, and W. Hampe, "Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum," *Febs Journal*, vol. 272, no. 7, pp. 1718-1726, 2005.
- [365] D. Sulzer and L. Zecca, "Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review," *Neurotox Res*, vol. 1, no. 3, pp. 181-95, 2000.
- [366] J. N. Keller, E. Dimayuga, Q. Chen, J. Thorpe, J. Gee, and Q. Ding, "Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 36, no. 12, pp. 2376-2391, Dec. 2004.
- [367] A. Terman and U. T. Brunk, "Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 8, no. 1-2, pp. 197-204, Feb. 2006.



## 7 APPENDICE

**Tabella A:** vengono riportate tutte le proteine identificate nei tre campioni principali: NM-1, NM-2, ORG-A1, ORG-A2, ORG-B1, ORG-B2.

Le proteine sono ordinate per nome. Per ogni proteina dei campioni NM-1, NM-2, ORG-A1, ORG-A2 viene riportata la frequenza (numero di volte in cui è stata identificata la proteina tra le analisi MudPIT in replicato), il numero di score medio e il numero medio dei peptidi identificati. Per i campioni ORG-B1, ORG-B2 analizzati in singolo viene riportato lo score e il numero di peptidi identificati per ogni proteina

**Tabella B:** vengono riportate tutte le proteine identificate nei campioni di neuromelanina: NM-0, NM-1, NM-2, NM-3, NM-3-TIS. Le proteine sono ordinate per nome. Per ogni proteina viene riportata la frequenza (numero di volte in cui è stata identificata la proteina tra le analisi MudPIT in replicato), il numero di score medio e il numero medio dei peptidi identificati.

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
4504523	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPF1	Mitochondrion	1	10.19	1													
4507949	P31946	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAH	Cytoplasm	2	10.19	1				2	10.20	2	2	15.16	2				
5803225	P62258	14-3-3 protein epsilon	YWHAH	Cytoplasm	2	20.19	4				3	20.28	5	1	20.14	3				
4507951	Q04917	14-3-3 protein eta	YWHAH	Cytoplasm										1	10.18	1				
9507245	P61983	14-3-3 protein gamma	Ywha9	Cytoplasm	1	10.14	1							3	20.20	3	10.14	2		
5454052	P31947	14-3-3 protein sigma	SFN	Cytoplasm													10.16	1		
4507953	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	Cytoplasm	3	10.30	13				2	15.28	4	3	23.54	4				
180687	P09543	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	CNP	Synapse	1	10.30	2				1	20.14	2	3	20.21	4	40.31	9		
6679501	P62192	26S protease regulatory subunit 4	Psmc1	Nucleus							1	10.22	1							
1526426	P62333	26S protease regulatory subunit S10B	PSMC6	Nucleus							2	10.16	2							
7657441	Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	PDAP1	Unknown										1	10.16	1				
40254471	Q16880	2-hydroxyacylphosphingosine 1-beta-galactosyltransferase	UGT8	Membrane										1	10.12	2				
11545403	Q9H2F3	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7	HSD3B7	ER	1	10.13	2													
432376	P25325	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	MPST	Mitochondrion							1	10.24	2							
3088338	P46783	40S ribosomal protein S10	RPS10	Ribosome							2	10.17	2	2	10.13	1	10.15	1		
5032051	P62263	40S ribosomal protein S14	RPS14	Ribosome							1	10.13	2	3	20.18	8	10.17	2		
4506691	P62249	40S ribosomal protein S16	RPS16	Ribosome										1	10.12	1				
4506695	P39019	40S ribosomal protein S19	RPS19	Ribosome										2	15.14	3				
4506697	P60866	40S ribosomal protein S20	RPS20	Ribosome							1	10.19	1							
4506707	P62851	40S ribosomal protein S25	RPS25	Ribosome							1	10.13	1	2	10.13	2				
6677809	P62754	40S ribosomal protein S6	Rps6	Ribosome										3	10.16	1				
4506741	P62081	40S ribosomal protein S7	RPS7	Ribosome										1	10.16	2	10.27	3		
4506743	P62241	40S ribosomal protein S8	RPS8	Ribosome										2	10.19	2				
110624792	Q8IZH2	5'-3' exonuclease 1	XRN1	Cytoplasm	1	10.16	1													
4505237	Q00013	55 kDa erythrocyte membrane protein	MPP1	Cytoskeleton							1	10.25	1							
31542947	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	Mitochondrion	1	20.17	2													
495126	P62913	60S ribosomal protein L11	RPL11	Ribosome										3	10.21	2				
4506597	P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	Ribosome										1	10.20	3				
4506645	P63173	60S ribosomal protein L38	RPL38	Ribosome				1	20.18	4				1	10.21	2	10.17	1	10.17	1
3088347	P32969	60S ribosomal protein L9	RPL9	Ribosome										1	10.15	1				
48762920	P17858	6-phosphofructokinase, liver type	PFKL	Cytoplasm							1	10.16	2							
16507237	P11021	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	ER										3	28.21	3				
38649249	Q8TE60	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 18	ADAMTS18	Extracellular										1	10.14	1				
29336810	Q8TE59	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 19	ADAMTS19	Extracellular							1	10.14	1							
23200008	Q8NFV4	Abhydrolase domain-containing protein 11	ABHD11	Extracellular													10.10	1		
8247915	Q13510	Acid ceramidase	ASAH1	Lysosome	2	15.15	2	2	15.18	3	3	43.63	16	3	60.20	32	60.31	59	20.16	9
133893286	Q9BZP6	Acidic mammalian chitinase	CHIA	Cytoplasm										1	10.13	1				
4501867	Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2	Mitochondrion										1	20.17	2				
26252201	Q8TED9	Actin filament-associated protein 1-like 1	AFAP1L1	Cytoskeleton										1	10.14	1				
4501881	P68133	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	Cytoskeleton	3	28.90	9				3	26.88	7	3	38.91	11	30.20	6		
4501885	P60709	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	Cytoskeleton	1	10.20	2				3	10.22	1	3	10.22	6	20.21	3		
62421045	Q562T0	Actin-like protein	ACT	Cytoskeleton													10.17	2		
62421077	Q562R4	Actin-like protein	ACT	Cytoskeleton	1	10.17	1													
197098442	Q5R6D0	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	SUB1	Cytoskeleton										1	10.13	1				
7019319	Q9ULW3	Activator of basal transcription 1	ABT1	Nucleus							1	10.15	1							
23510451	P13798	Acylation-acid-releasing enzyme	APEH	Cytoplasm							2	10.19	2	1	10.14	2				
19911070	Q8TAF6	Acyl-CoA synthetase 4	FACL4	Mitochondrion										1	10.16	1				
120433590	P07108	Acyl-CoA-binding protein	DBI	Unknown	1	10.17	3													
51094730	A4D1Y5	Acylglyceryl hydrolase	AOAH	Lysosome													10.19	1		
20149322	P14621	Acyolphosphatase-2	ACYP2	Unknown							1	10.15	2	1	10.14	1	20.17	3		
50845382	O43506	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 mot	ADAM20	Membrane	1	10.13	1													
119588191	-	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 mot		Membrane							1	10.15	1							
119631214	-	ADAM metalloproteinase with thrombospondin		Membrane	2	10.18	2													



TABELLA A					NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
9951915	P23526	Adenosylhomocysteinase	AHCY	Melanosome							1	10.16	2							
24497587	Q8NFM4	Adenylate cyclase type 4	ADCY4	Membrane	1	10.16	2													
4502011	P00568	Adenylate kinase isoenzime 1	AK1	Cytoplasm							3	26.91	6	1	10.13	1				
7706212	Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzime 6	TAF9	Nucleus							1	10.18	44	1	10.17	3				
4557269	P30566	Adenylosuccinate lyase	ADSL	Cytoplasm							1	10.27	2							
55749577	P12235	ADP/ATP translocase 1	SLC25A4	Mitochondrion										1	10.11	2				
4502203	P61204	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	Golgi apparatus							2	10.21	1							
4502209	P84085	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	Golgi apparatus							1	10.18	1	2	10.17	2	10.14	1		
4502211	P62330	ADP-ribosylation factor 6	ARF6	Golgi apparatus	1	10.11	1													
7021541	Q9UJY4	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2	GGA2	Golgi apparatus	1	10.15	1													
961444	Q9NZ52	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA3	GGA3	Golgi apparatus							1	10.15	1							
62088268	Q8IVW1	ADP-ribosylation factor-like protein 17	ARL17A	Golgi apparatus	1	10.22	1				1	10.22	1							
37594464	Q9UUK9	ADP-sugar pyrophosphatase	NUDT5	Cytoplasm										1	10.14	1				
33319156	-	AF471306_1 Ig heavy chain variable region, VH3 family		Uncharact.Prot.	1	10.12	1													
54873613	O00468	Aggrin	AGRN	Extracellular										1	10.14	1				
6005709	Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2	AKAP2	Unknown							1	10.15	1							
22538387	Q99996	A-kinase anchor protein 9	AKAP9	Synapse	1	10.15	1													
62897255	Q9H2A2	Aldehyde dehydrogenase family 8 member A1	ALDH8A1	Cytoplasm							1	10.10	1							
28595	-	aldolase A protein		Cytoplasm	1	10.15	1				3	20.18	3	2	10.19	1				
4501993	O00116	Alkylidihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	AGPS	Peroxisome	2	10.16	1													
4758406	Q11130	Alpha-	FUT7	Golgi apparatus							3	10.14	2							
183805	P78461	Alpha-1 thalassemia globin gene.	HBA1	Cytoplasm				1	10.20	1				3	90.24	22	20.37	7		
6912502	Q9UM21	Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A	MGAT4A	Golgi apparatus							1	10.12	1							
4505163	Q10469	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	MGAT2	Golgi apparatus							1	10.13	1							
112911	P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M	Extracellular	1	10.16	1													
2804273	O43707	Alpha-actinin-4	ACTN4	Nucleus	3	13.51	4													
29826319	P35611	Alpha-adducin	ADD1	Cytoskeleton							3	13.51	2							
4503057	P02511	Alpha-crystallin B chain	CRYAB	Cytoplasm							3	30.19	4	3	30.17	5	100.32	68	10.14	2
4503571	P06733	Alpha-enolase	ENO1	Cytoplasm	3	23.49	3				1	10.17	2	3	10.15	2				
178246	P06280	Alpha-galactosidase A	GLA	Lysosome	1	10.14	1	1	18.19	1				1	10.22	1				
7706180	Q9NZD4	Alpha-hemoglobin-stabilizing protein	AHSP	Cytoplasm							3	10.16	3							
14249342	Q16352	Alpha-internexin	INA	Cytoskeleton							1	10.15	1				10.14	1		
974734	Q16706	Alpha-mannosidase 2	MAN2A1	Golgi apparatus				1	10.18	1							10.20	1		
13569938	Q9BVH7	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5	ST6GALNAC5	Golgi apparatus	1	10.13	1													
3929617	P54920	Alpha-soluble NSF attachment protein	NAPA	ER							1	10.19	1							
4507109	P37840	Alpha-synuclein	SNCA	Synapse							3	33.58	5	3	16.87	3				
154813201	Q15699	ALX homeobox protein 1	ALX1	Nucleus							1	10.20	1							
4557315	O15123	Angiopoietin-2	ANGPT2	Extracellular				1	10.22	1										
4557287	P01019	Angiotensinogen	AGT	Extracellular	2	10.18	6							2	10.18	11				
16306483	Q8TE54	Anion exchange transporter	SLC26A7	Membrane							1	10.13	1	1	10.14	1				
117306456	AQJLW0	ANKLE1 protein	ANKLE1	Cytoskeleton															10.14	4
85396861	Q2M3V2	Ankyrin repeat domain-containing protein 43	ANKRD43	Cytoskeleton										1	10.13	1				
28702	P16157	Ankyrin-1	ANK1	Cytoskeleton							3	126.26	24	3	52.89	9				
4803663	Q01484	Ankyrin-2	ANK2	Cytoskeleton										3	16.16	2	10.19	1		
71773329	P08133	Annexin A6	ANXA6	Melanosome							1	10.14	1							

**TABELLA A**

GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
					Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
5453541	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	AGR2	Extracellulare	2	15.24	4													
415819	P46013	Antigen KI-67	MKI67	Nucleus	1	10.13	1													
189069199	P01008	Antithrombin-III	SERPINC1	Extracellulare																
20178274	Q95782	AP-2 complex subunit alpha-1	AP2A1	Vesicle													10.22	1	10.20	1
5689377	Q9UPM8	AP-4 complex subunit epsilon-1	AP4E1	Vesicle								1	10.14	1						
4502163	P05090	Apolipoprotein D	APOD	Extracellulare	3	26.85	8	3	16.83	4	1	10.15	1	3	18.84	6	20.19	20		
4557325	P02649	Apolipoprotein E	APOE	Extracellulare										1	10.17	1				
10947139	P05089	Arginase-1	ARG1	Cytoplasm							1	10.26	2							
4503281	P20711	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	DDC	Cytoplasm							1	10.13	1							
9963861	Q9HBK9	Arsenite methyltransferase	AS3MT	Cytoplasm							1	10.12	1							
2094739	O00327	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1	ARNTL	Nucleus				1	10.15	1	1	10.14	1							
825628	P15848	Arylsulfatase B	ARSB	Lysosome	3	43.52	9	3	33.49	6	1	10.15	1				10.16	2	10.12	2
158255130	A8K482	Aspartate aminotransferase		Cytoplasm									1	10.13	1					
4504067	P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	Cytoplasm	1	10.14	1													
4502301	P48201	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial	ATP5G3	Mitochondrion	3	13.52	2	3	26.88	5										
4757810	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	Mitochondrion	1	20.18	3						3	43.54	6					
28940	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	Mitochondrion	3	20.20	3						2	20.19	6					
4502297	P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	ATP5D	Mitochondrion									2	10.19	1					
4502303	P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O	Mitochondrion															10.20	1
7705927	Q9UII2	ATPase inhibitor, mitochondrial	ATPIF1	Mitochondrion	3	10.14	1													
7242140	O76031	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	CLPX	Mitochondrion							1	10.15	1							
45446743	Q86XP3	ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42	Nucleus	1	10.15	1													
7243169	A5YM72	ATP-grasp domain-containing protein 1	CARNS1	Unknown				1	10.12	1										
6599196	Q4LE39	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	ARID4B	Nucleus	1	10.21	1													
47078224	Q03989	AT-rich interactive domain-containing protein 5A	ARID5A	Nucleus				1	10.12	1										
17366241	O94817	Autophagy-related protein 12	ATG12	Cytoplasm							1	10.16	1							
89274173	Q6ZTR8	Axonemal dynein heavy chain 12-like protein	DNAH12L	Vesicle							2	10.19	5							
10241474	Q5W0U4	B box and SPRY domain-containing protein	BSPRY	Cytoplasm							1	10.14	1							
4507021	P02730	Band 3 anion transport protein	SLC4A1	Membrane				3	150.32	77			3	63.55	21	60.22	14			
2224617	Q9H4G0	Band 4.1-like protein 1	EPB41L1	Cytoskeleton				1	10.15	1										
20454827	Q9BXC9	Bardet-Biedl syndrome 2 protein	BBS2	Cytoskeleton													10.15	1		
119581587	-	basigin		Unknown									1	10.14	1					
6456033	Q9UL32	Bcl-2 related ovarian killer	BOK	Nucleus	1	10.12	1													
63055057	Q562R1	Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	Cytoskeleton							1	10.15	1							
119567601	A1Y208	Beta-globin	HBB	Cytoplasm									2	10.22	2					
4504373	P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	Lysosome									2	15.16	3					
28376633	Q86Z14	Beta-klotho	KLB	Membrane	1	10.13	1													
55583953	Q8N3L3	Beta-taxilin	TXLNB	Cytoplasm	1	10.16	1										10.16	1		
20127454	P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	Unknown							1	10.23	2							
4502351	Q14032	Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	BAAT	Cytoplasm				3	10.14	2										
4502445	P07738	Bisphosphoglycerate mutase	BPGM	Cytoplasm				3	26.92	5	1	10.19	1							
62148934	Q58A63	BNIP2 motif-containing molecule at the C-terminal region 1	BMCC1	Cytoplasm	1	18.17	1													
179506	P12645	Bone morphogenetic protein 3	BMP3	Extracellulare	1	10.15	1													
16551604	P54687	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	BCAT1	Cytoplasm	1	10.14	1													
6552299	P38398	Breast cancer type 1 susceptibility protein	BRCA1	Nucleus	1	10.15	1													
2315186	P51587	Breast cancer type 2 susceptibility protein	BRCA2	Nucleus									1	10.15	1					
6331358	Q8IJZ3	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8	CPAMD8	Extracellulare							2	10.15	3							
7656967	Q9N9Y6	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	CELSR1	Membrane							1	10.14	1							
40255133	Q6ZTQ4	Cadherin-related family member 3	CDHR3	Membrane									1	10.15	1					
2499445	Q14123	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C	PDE1C	Cytosol									1	10.15	1					

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
14196445	Q96NX5	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1G	CAMK1G	Cytoplasm	3	10.14	1	1	10.15	2										
148839294	Q86UW7	Calcium-dependent secretion activator 2	CADPS2	Synapse										1	10.14	1				
825635	P62158	Calmodulin	CALM1	Cytoskeleton	2	10.16	1				2	25.25	6	1	10.13	1				
303599	P20810	Calpastatin	CAST	Cytoplasm							3	20.23	4							
4757900	P27797	Calreticulin	CALR	ER	1	10.19	4													
119604285	-	cAMP responsive element binding protein 3-like 2, is		Unknown							1	10.15	1							
4502517	P00915	Carbonic anhydrase 1	CA1	Cytoplasm	3			3	135.61	94				3	82.92	60				
4557395	P00918	Carbonic anhydrase 2	CA2	Cytoplasm	3			3	73.60	51				3	59.59	23				
13436164	P07451	Carbonic anhydrase 3	CA3	Cytoplasm	2			2	14.23	2										
4502599	P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	CBR1	Cytoplasm	1			1	10.20	1										
37182131	Q5XG92	Carboxylesterase UNQ440/PRO873	CES4A	Extracellular	1			1	10.17	1										
6429043	P16870	Carboxypeptidase E	CPE	Synapse	1			1	10.16	1										
50949448	Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5	CMYA5	Cytoplasm	1			1	10.12	1										
73623030	P50416	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	CPT1A	Mitochondrion	1			1	10.12	2										
6912288	Q9UKL3	CASP8-associated protein 2	CASP8AP2	Nucleus	1	10.13	1													
14790124	P55211	Caspase-9	CASP9	Cytoplasm				1	10.15	5				1	10.15	1				
4557014	P04040	Catalase	CAT	Peroxisome							3	110.34	42							
4502969	P21964	Catechol O-methyltransferase	COMT	Membrane										1	10.14	1				
3929733	Q6LAF9	Cathepsin B	CTSB	Lysosome				3	19.58	14	1	10.18	2	2	10.26	9	18.30	9	10.24	11
4503139	P07858	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	3	170.32	163	3	166.27	119	3	54.93	24	3	52.26	21	78.30	48	40.24	21
4503143	P07339	Cathepsin D	CTSD	Lysosome	3	26.87	5	3	40.21	12	3	50.27	37	3	46.92	32	80.27	63	10.23	13
4503155	P07711	Cathepsin L1	CTSL1	Lysosome	3	20.23	6	3	16.83	7										
22538442	Q9UBR2	Cathepsin Z	CTSZ	Lysosome	3	30.22	18	3	33.54	19	2	10.18	2	3	26.87	14	20.17	5	10.18	4
24308071	Q96F85	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	CNRIP1	Unknown										3	10.20	1	10.20	1		
31873819	A5YKK6	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	CNOT1	Unknown				1	10.13	1										
4502679	P08962	CD63 antigen	CD63	Lysosome										2	10.15	2	10.14	2		
7020375	Q5VV42	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1	CDKAL1	Membrane				1	10.15	1										
10432682	Q9HAL1	cDNA FLJ11426 fis, clone HEMBA1001059,	GALNS	Lysosome	3	20.19	3	1	10.14	1									20.21	3
10436199	Q9H868	cDNA FLJ13916 fis, clone Y79AA1000342,	CIZ1	Nucleus	1	10.13	1	1	12.16	1										
10436476	Q9HY71	cDNA FLJ14101 fis, clone MAMMA1000859	STEAP3	Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
18676893	Q8TEA2	cDNA FLJ23741 fis, clone HEP15377	FOXP1	Nucleus							1	10.13	1							
21758578	Q8N7G1	cDNA FLJ25678 fis, clone TST04067,	NP	Nucleus							2	30.16	4							
34526321	Q6ZP94	CDNA FLJ26204 fis, clone ADG07455		Uncharact.Prot.				1	10.11	1										
21752231	Q8N9Y7	cDNA FLJ36058 fis, clone TESTI2018476,		Nucleus	1	10.13	1													
21758244	Q8N7K6	cDNA FLJ40946 fis, clone UTERU2009435	CASC4	Uncharact.Prot.	1	10.19	1													
34529711	Q6ZVV6	cDNA FLJ42031 fis, clone SPLEN2037194, weakly similar to NORQ PROTEIN		Uncharact.Prot.										1	10.13	1				
34530363	Q6ZV10	cDNA FLJ42559 fis, clone BRACE3006226	LOC388692	Uncharact.Prot.							1	10.16	1							
193785307	B3KXE8	cDNA FLJ45306 fis, clone BRHIP3004215,		Uncharact.Prot.										1	10.13	1				
34535632	Q6ZRDO	cDNA FLJ46459 fis, clone THYMU3020970	LOC389607	Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
194388088	B4E3B6	cDNA FLJ54408, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1		Uncharact.Prot.										1	10.15	1				
194379628	B4DYL8	cDNA FLJ54894, weakly similar to Dentin sialophosphoprotein	KIAA1107	Uncharact.Prot.	1	10.15	1													
194387892	B4DRP7	cDNA FLJ55154	C1orf112	Uncharact.Prot.	1	10.17	1													
194380812	B4DIP7	cDNA FLJ57114, highly similar to Niemann-Pick C1 protein	NPC1	Lysosome				1	10.14	1										
194375323	B4DVR2	cDNA FLJ58127, highly similar to Thymidine phosphorylase		Uncharact.Prot.										1	10.11	4				
194381036	B4DZH4	cDNA FLJ59078, highly similar to Ran-binding protein 2-like 6	RGPD4	Uncharact.Prot.										1	10.13	1				
194375606	B4DDI7	cDNA FLJ59457, highly similar to NADPH:adenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	FDXR	Mitochondrion	1	10.15	1													
194381300	B4DIU2	cDNA FLJ60046, highly similar to Coronin-1B	CORO1B	Uncharact.Prot.	1	10.14	1													
194376966	B4DWI2	cDNA FLJ60925, highly similar to ATP-binding	ABCC11	Membrane	1	10.13	1													

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2			
Uniprot GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi	
194382524	B4E0H0	cassette transporter sub-family C member 11		Uncharact.Prot.										1	10.14	1					
158260139	A8K0J3	cDNA FLJ76732, highly similar to Homo sapiens TAO kinase 3		Uncharact.Prot.										1	10.13	1					
22761740	Q8N2D7	cDNA PSEC0233 fis, clone HEMBA1006813	IL17RC	Uncharact.Prot.	1	10.13	1							1	10.18	1					
456727	B2R858	cDNA, FLJ93750, Homo sapiens DEAD		Uncharact.Prot.										1	10.11	1					
189053958	B2R9B8	cDNA, FLJ94320	FAM164A	Uncharact.Prot.										1	10.19	1					
10440238	Q9H5E2	CDNA: FLJ23519 fis, clone LNG04908	RNH1	Uncharact.Prot.										1	10.25	1					
4757952	P60953	Cell division control protein 42 homolog	CDC42	Membrane	1	10.13	1							1	10.13	1					
118402582	Q12834	Cell division cycle protein 20 homolog	CDC20	Cytoplasm																	
34596115	Q6UFV3	Central open reading frame		Uncharact.Prot.	1	10.13	1														
13129022	Q9NSP4	Centromere protein M	CENPM	Nucleus	1	10.17	1														
4757922	P23435	Cerebellin-1	CBLN1	Synapse	3	66.90	28	3	46.91	41				3	13.56	5	10.22	2			
32698861	Q8IUk8	Cerebellin-2	CBLN2	Synapse	3	16.88	3	3	13.54	5											
144226251	P36222	Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1	Extracellular										1	10.13	1					
194239631	Q8NCS7	Choline transporter-like protein 5	SLC44A5	Membrane										1	10.14	3					
119610800	-	cholinergic receptor, nicotinic, epsilon, isoform CR		Unknown													10.10	1			
4502807	-	chromogranin B precursor		Unknown	1	10.17	1														
119601186	-	chromosome 14 open reading frame 39, isoform CRA_a		Uncharact.Prot.				1	10.17	1											
33772099	Q6XZE5	CINCIN1	CINCIN1	Cytoplasm										1	10.15	1					
21735569	Q9HAW4	Claspin	CLSPN	Nucleus	1	10.17	1														
22748877	Q8NFJ8	Class E basic helix-loop-helix protein 22	BHLHE22	Nucleus										1	10.13	1					
7671635	Q60641	Clathrin coat assembly protein AP180	SNAP91	Membrane										2	10.19	1					
49065366	Q6FIF6	CLDN12 protein	CLDN12	Membrane	1	10.11	1														
197304653	O75122	CLIP-associating protein 2	CLASP2	Golgi apparatus	1	10.13	1														
42740907	P10909	Clusterin	CLU	Extracellular										1	10.17	1					
28373078	Q11203	CMP-N-acetylneuraminatase-beta-1,4-galactosidase alpha-2,3-sialyltransferase	ST3GAL3	Golgi apparatus										1	10.13	1					
4503647	P00451	Coagulation factor VIII	F8	Extracellular										1	10.15	1					
5031635	P23528	Cofilin-1	CFL1	Nucleus	3	13.56	8							2	20.34	4					
119582086	D3DQH5	coiled-coil domain containing 69, isoform CRA_a	CCDC69	Unknown										1	10.15	1			10.15	1	
20139283	Q9UL16	Coiled-coil domain-containing protein 19	CCDC19	Mitochondrion	1	10.15	1														
12330993	Q6P9F0	Coiled-coil domain-containing protein 60	CCDC62	Nucleus										1	10.13	1					
10435800	Q9H8E5	Coiled-coil domain-containing protein 69	CCDC69	Unknown	1	10.11	1														
28839601	Q9Y2M0	Coiled-coil domain-containing protein MTMR15	FAN1	Unknown															10.11	1	
3288487	-	COL1A1 and PDGFB fusion transcript		Extracellular	1	10.23	6							1	10.14	1					
4502847	Q14011	Cold-inducible RNA-binding protein	CIRBP	Nucleus										2	10.28	1					
30023	P08123	Collagen alpha-2	COL1A2	Extracellular				1	10.19	2											
30099	P08123	Collagen alpha-2	COL1A2	Extracellular										1	10.15	3					
119508426	Q14050	Collagen alpha-3	COL9A3	Extracellular															10.12	2	
4502491	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1QBP	Mitochondrion	1	10.20	1														
4557389	P07357	Complement component C8 alpha chain	C8A	Extracellular										1	10.13	2					
12644525	P57678	Component of gems 4	GEMIN4	Nucleus															10.18	1	
4503123	P29279	Connective tissue growth factor	CTGF	Extracellular															10.11	1	
4827022	Q02246	Contactin-2	CNTN2	Membrane										1	10.14	1					
64174737	P35670	Copper-transporting ATPase 2	ATP7B	Golgi apparatus															10.15	1	
20070952	Q9UQ03	Coronin-2B	CORO2B	Cytoskeleton										1	10.10	1					
21536286	P12777	Creatine kinase B-type	CKB	Cytoplasm	2	30.19	5							1	10.22	1	3	40.24	8	20.27	5
16758920	P97536	Cullin-associated NEBD8-dissociated protein 1	Cand1	Nucleus	1	10.30	2							1	10.11	1					
119570240	-	cutC copper transporter homolog		Unknown										1	10.11	1					
4503117	P04080	Cystatin-B	CSTB	Nucleus	3	13.53	3	2	20.20	6				2	10.18	2					
4503107	P01034	Cystatin-C	CST3	Extracellular										2	10.16	2					

TABELLA A					NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi	
4758086	P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	Nucleus																	
4503049	P52943	Cysteine-rich protein 2	CRIP2	Unknown																	
90421313	P13569	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	CFTR	Membrane	1	10.20	1														
41281768	P00167	Cytochrome b5	CYB5A	ER							1	10.15	1								
50592988	P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	UQCRC2	Mitochondrion										1	10.14	1					
17017988	P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B	Mitochondrion										1	10.12	1					
71891782	Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1	Cytoplasm																10.12	1
24307879	Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DYNC1I2	Cytoskeleton	1	10.17	1														
62087880	P0C869	Cytosolic phospholipase A2 beta	PLA2G4B	Cytoplasm							1	10.14	1								
24158478	Q9N1F0	Dapper homolog 1	DACT1	Cytoplasm																10.15	1
4503291	P30046	D-dopachrome decarboxylase	DDT	Cytoplasm							1	10.16	2								
16550229	Q9N677	Dedicator of cytokinesis protein 7	DOCK7	Cytoskeleton							1	10.15	1								
51094465	A4D2P6	Delphinin	GRID2IP	Synapse										1	16.15	1					
70995211	Q13011	Delta	ECH1	Peroxisome							1	10.13	1								
189083849	P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	ALAD	Cytoplasm							3	10.20	2	1	10.15	2					
166706875	Q08495	Dematin	EPB49	Cytoskeleton							2	30.25	6								
6635137	A2RUS2	DENN domain-containing protein 3	DENND3	Unknown										1	10.14	1					
71891699	O75064	DENN domain-containing protein 4B	DENND4B	Unknown	2	10.14	1														
3482908	Q9BU89	Deoxyhypusine hydroxylase	DOHH	Unknown							1	10.15	2								
4503325	P49366	Deoxyhypusine synthase	DHPS	Cytoplasm							1	10.14	1								
4503347	Q92874	Deoxyribonuclease-1-like 2	DNASE1L2	Extracellular	1	10.16	1														
1905907	Q00115	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNASE2	Lysosome	2	15.18	2	3	16.84	4	1	10.17	2	1	10.17	1					
16751921	P81605	Dermcidin	DCD	Extracellular							1	10.19	1	3	13.50	2					
1147813	P15924	Desmoplakin	DSP	Cytoskeleton	1	10.17	1				1	14.22	1	2	17.20	2					
5802966	P60981	Dextrin	DSTN	Cytoskeleton	2	10.15	1														
4503377	Q16555	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	Cytoskeleton	3	40.22	8														
15080291	Q9UHL4	Dipeptidyl-peptidase 2	DPP7	Lysosome							3	40.20	7	3	73.59	23	20.17	2	10.17	2	
29337230	Q13444	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 15	ADAM15	Membrane										1	10.21	1					
73620749	Q6PJP8	DNA cross-link repair 1A protein	DCLRE1A	Nucleus				1	10.15	1											
2662381	P52701	DNA mismatch repair protein Msh6	MSH6	Nucleus	1	10.14	1														
106507301	P09884	DNA polymerase alpha catalytic subunit	POLA1	Nucleus				1	10.16	1											
28375587	O15315	DNA repair protein RAD51 homolog 2	RAD51B	Nucleus	1	10.13	1														
1232077	P49736	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	Nucleus	1	10.15	1														
121946796	Q2KHR2	DNA-binding protein RFX7	RFX7	Nucleus	1	10.13	1														
13654237	P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	Nucleus							1	10.17	2								
4885495	O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6	DNAJB6	Cytosol										1	10.15	1					
8745331	Q9NQL9	Doublesex- and mab-3-related transcription factor 3	DMRT3	Nucleus	1	10.18	2														
4589670	Q6XZF7	Dynamin-binding protein	DNMBP	Synapse							1	10.11	1								
15395290	Q96DT5	Dynein heavy chain 11, axonemal	DNAH11	Cytoskeleton										1	12.14	1					
6102880	Q9UFH2	Dynein heavy chain 17, axonemal	DNAH17	Cytoskeleton	1	10.16	1														
13626507	Q9Y4J8	Dystrobrevin alpha	DTNA	Synapse	1	10.13	1							1	10.13	1					
115855	P22681	E3 ubiquitin-protein ligase CBL	CBL	Cytoplasm							1	10.17	1								
40788325	Q86Y13	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	DZIP3	Cytoplasm	1	10.13	1														
71891755	O95071	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	Cytoplasm	1	10.14	1														
50874	Q03112	Ecotropic virus integration site 1 protein homolog	MECOM	Nucleus							1	10.17	1								
2465540	O14638	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	ENPP3	Membrane										1	10.15	1					
4877552	Q9Y6R3	Electrogenic Na+ bicarbonate cotransporter	NBC	Membrane	1	10.13	1														
4503471	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	Cytoplasm										3	13.48	2	20.17	2			
4503475	Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	Cytosol													10.23	2	10.13	3	
7023042	Q8BW60	Elongation of very long chain fatty acids protein	ELOVL1	ER	1	10.11	1														

TABELLA A					NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi	
4557553	P50402	Emerin	EMD	Nucleus							1	10.15	1								
22748703	Q96DNO	Endoplasmic reticulum resident protein ERp27	ERP27	ER	1	10.14	1							1	20.18	2					
4507677	P14625	Endoplasmic reticulum chaperone protein BiP	HSP90B1	ER										1	10.15	2					
4557547	P24530	Endothelin B receptor	EDNRB	Membrane																	
30913103	Q96BJ8	Engulfment and cell motility protein 3	ELMO3	Cytoskeleton	1	10.14	1														
729422	-	ENO1B_HUMAN Alpha-enolase, lung specific		Unknown	1	10.15	1							1	10.19	2			2	10.16	1
68563322	K4KKX0	EPB42 protein	EPB42	Unknown							3	33.57	6	1	10.19	2					
22760965	Q8TE68	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 1	EPS8L1	Cytoplasm							1	10.13	1								
5453678	P61916	Epididymal secretory protein E1	NPC2	Lysosome				1	10.12	1											
3980313	Q9UGP6	Epsilon COP	COPE	Vesicle	1	10.13	1														
38016911	P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM	Cytoskeleton							3	23.54	5	2	10.21	2					
3108055	O60686	Erythroid alpha-spectrin	SPTA1	Cytoskeleton							1	10.15	1								
4503591	P19235	Erythropoietin receptor	EPOR	Membrane										2	10.17	4			10.14	1	
41872448	P28324	ETS domain-containing protein Elk-4	ELK4	Nucleus							1	10.12	1								
86756027	B0KYV4	Ets family transcription factor ELF2C	ELF2	Unknown	1	10.12	1														
4503529	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	Nucleus							2	10.24	2								
23397429	Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	EIF3M	Cytoplasm							1	10.18	1								
288100	P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	Nucleus							1	10.11	2								
11559923	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H	Nucleus							1	10.23	1								
4503545	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	Nucleus							1	10.25	3								
15029675	Q96FE8	EWSR1 protein	EWSR1	Nucleus							1	10.17	1	3	12.83	3			10.14	1	
15146354	Q96S40	Excision repair protein 1	ERCC1	Nucleus	1	10.11	1														
169790839	P43003	Excitatory amino acid transporter 1	SLC1A3	Synapse							1	10.14	1								
82546830	Q96A65	Exocyst complex component 4	EXOC4	Vesicle							1	10.11	1								
191252816	-	extracellular leucine-rich repeat and fibronectin		Extracellular										1	10.13	1					
31283	P15311	Ezrin	EZR	Cytoskeleton	1	10.23	2										10.16	1			
119612775	-	family with sequence similarity 98, member B, isoform		Unknown	1	10.15	1														
2230888	O15360	Fanconi anemia group A protein	FANCA	Nucleus							2	10.15	1								
67476453	P49327	Fatty acid synthase	FASN	Lysosome	3	46.90	15														
5912201	Q86XK2	F-box only protein 11	FBXO11	Nucleus	2	10.13	7							2	10.12	3			10.13	2	
10503978	Q6PUJ6	F-box only protein 38	FBXO38	Nucleus	1	10.17	1							2	10.14	2					
7020055	Q9UKA1	F-box/LRR-repeat protein 5	FBXL5	Nucleus										1	10.17	1					
37537802	Q8N3Y1	F-box/WD repeat-containing protein 8	FBXW8	Nucleus				1	10.13	1											
40788358	O94868	FCH and double SH3 domains protein 2	FCHSD2	Unknown				1	10.14	1											
121941988	Q2WGJ9	Fer-1-like protein 6	FER1L6	Membrane							1	10.14	1								
56682959	P02794	Ferritin heavy chain	FTL1	Cytoplasm	1	20.14	2	1	10.16	1				2	19.14	2	20.21	5	10.10	1	
20149498	P02792	Ferritin light chain	FTL	Cytoplasm	3	30.23	10	3	30.22	11				3	33.56	13	40.23	17	10.15	2	
74750503	Q86W11	Fibrocystin-L	PKHD1L1	Membrane										2	10.15	3	3	10.15	3		
60097902	P20930	Filaggrin	FLG	Cytoskeleton							2	10.15	1								
62122917	Q5D862	Filaggrin-2	FLG2	Unknown	1	10.13	1	2	20.25	3	1	10.26	2								
4503729	Q02790	FK506-binding protein 4	FKBP4	Nucleus	1	10.21	2														
4502419	P30043	Flavin reductase	BLVRB	Cytoplasm							3	80.32	29	3	36.91	9					
21748606	Q8NF22	FLJ00380 protein	FLJ00380	Uncharact.Prot.				1	10.13	1											
5031699	O75955	Flotillin-1	FLOT1	Vesicle							1	20.20	3								
82546824	P85037	Forkhead box protein K1	FOXP1	Nucleus															10.13	1	
109132400	Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	FHL1	Cytosol							1	10.17	1	3	20.17	6	20.19	7	10.17	3	
21361122	Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	FHL1	Unknown										1	10.17	2					
312137	P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	Cytoskeleton	1	10.17	1														
28071028	Q86TV2	Full-length cDNA clone CS001002YH20 of Placenta of Homo sapiens	LGMN	Unknown													10.15	1			
157738667	Q9BQS8	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	FYCO1	Unknown				1	10.11	1											
22001632	Q9NYZ3	G2 and S phase-expressed protein 1	GTSE1	Cytoskeleton							1	10.13	1								
3980466	Q9UBS5	Gamma-aminobutyric acid type B receptor	GABBR1	Membrane										1	10.13	1					

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
13377002	P07320	Gamma-crystallin D subunit 1	CRYGD	Cytosol	1	10.12	1	1	10.13	1										
5803011	P09104	Gamma-enolase	ENO2	Cytoplasm	3	13.49	2										10.13	1		
4503987	Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	Lysozyme	3	202.93	118	3	141.61	118	3	58.26	22	3	72.87	39	100.25	51	70.23	44
7023016	Q9UGJ1	Gamma-tubulin complex component 4	TUBGCP4	Cytoskeleton				1	10.21	1							18.20	3		
31853	P17900	Ganglioside GM2 activator	GM2A	Lysozyme				1	10.21	1							10.21	1		
4504001	P17302	Gap junction alpha-1 protein	GJA1	Membrane	1	10.13	1				1	10.19	1							
55953076	P48165	Gap junction alpha-8 protein	GJA8	Membrane	1	10.16	1													
21281675	Q8NHY3	GAS2-like protein 2	GAS2L2	Cytoskeleton										1	10.15	1				
4507709	Q13630	GDP-L-fucose synthetase	TSTA3	Cytoplasm				3	10.19	2										
4504165	P06396	Gelsolin	GSN	Cytoskeleton	1	10.14	2													
169881252	P78347	General transcription factor II-I	GTF2I	Nucleus				1	16.18	1										
24307907	P07093	Glia-derived nexin	SERPINE2	Extracellular	1	10.17	1										10.15	1		
4503979	P14136	Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Cytoskeleton	3	80.26	22	1	10.14	1	1	10.13	1	3	63.56	15	70.21	13		
4503947	P47871	Glucagon receptor	GCGR	Membrane							2	10.15	1							
18201905	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	Cytoplasm				3	10.23	2										
18201966	Q15399	Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon-4	GRIN2D	Membrane															10.14	1
31815	P49448	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	GLUD2	Mitochondrion	1	10.20	1							2	10.14	1				
14149793	Q9H0J4	Glutamine-rich protein 2	QRICH2	Unknown				1	10.12	1										
4467837	P07203	Glutathione peroxidase 1	GPX1	Cytosol				1	10.19	2										
2160390	P22352	Glutathione peroxidase 3	GPX3	Extracellular	1	10.13	1													
93278663	P00390	Glutathione reductase, mitochondrial	GSR	Mitochondrion	1	10.16	1													
4758484	P78417	Glutathione S-transferase omega-1	GSTO1	Cytoplasm							1	10.16	2							
4504183	P09211	Glutathione S-transferase P	GSTP1	Cytoplasm							1	10.20	2							
7669492	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Cytoplasm	3	57.01	59	1	10.23	2	3	50.38	17	3	26.86	4	20.31	4		
31542868	P13807	Glycogen [starch] synthase, muscle	GYS1	Nucleus	1	10.19	1				2	10.18	2				10.15	1		
1857620	P35573	Glycogen debranching enzyme	AGL	Cytoplasm													10.14	1		
21361370	P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	Cytoplasm				1	10.17	1				1	10.16	4				
20127457	P46976	Glycogenin-1	GYG1	Cytoplasm										3	16.84	3	40.19	8		
75813628	P02724	Glycophorin-A	GYPA	Membrane													10.30	1		
462190	P35052	Glypican-1	GPC1	Membrane										1	10.13	1				
156104880	P36959	GMP reductase 1	GMPR	Nucleus							1	10.16	1							
30089940	Q08378	Golgin subfamily A member 3	GOLGA3	Golgi apparatus				1	10.16	1										
57157123	Q5KU20	G-protein coupled receptor	KPG_008	Membrane	1	10.12	1													
4557617	Q14393	Growth arrest-specific protein 6	GAS6	Extracellular										1	10.13	1				
5453555	P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	Melanosome				2	10.14	2							10.14	1		
4504053	P16520	Guanine nucleotide-binding protein G	GNB3	Nucleus				2	10.15	2				2	10.14	2				
13937391	P62880	Guanine nucleotide-binding protein G	Gnb2	Nucleus										3	10.17	2				
162461738	P09471	Guanine nucleotide-binding protein G	GNAO1	Nucleus	1	10.17	1							3	13.51	2				
1620396	P00739	Haptoglobin-related protein	HPR	Extracellular							2	10.15	1							
119632126	-	hCG14576, isoform CRA_a	-	Uncharact.Prot.				1	10.12	1										
119623464	-	hCG1641086, isoform CRA_a	-	Uncharact.Prot.							1	10.17	1							
186671	B2RA23	HCG1642166, isoform CRA_b	hCG_1642166	Uncharact.Prot.										1	10.14	1				
119609297	-	hCG1642354	-	Uncharact.Prot.										3	10.17	4				
119606427	D3DRW8	hCG1643971, isoform CRA_a	hCG_1643971	Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
119632110	-	hCG1644968	-	Uncharact.Prot.	1	10.15	1													
119573241	-	hCG1645093	-	Uncharact.Prot.							1	10.17	1							
119629388	-	hCG1646279	-	Uncharact.Prot.							1	10.14	1							
119625788	-	hCG1648150	-	Uncharact.Prot.	1	10.12	1													
119618943	-	hCG1744452, isoform CRA_a	-	Uncharact.Prot.										1	10.13	1				
119619735	-	hCG1744879	-	Uncharact.Prot.																
119622575	-	hCG1774364	-	Uncharact.Prot.													10.11	1		
119585439	-	hCG1784128	-	Uncharact.Prot.										1	10.12	1	10.15	1		
119587134	-	hCG1798187	-	Uncharact.Prot.										1	10.15	1				
119574123	-	hCG1801795	-	Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
119598840	-	hCG1803572	-	Uncharact.Prot.							1	10.13	5							
119619424	-	hCG18053	-	Uncharact.Prot.	1	10.15	1												10.17	1

**TABELLA A**

GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
					Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
119597552	-	hCG1806822		Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
119613078	-	hCG1808534		Uncharact.Prot.	2	10.14	1													
119581544	-	hCG1808619		Uncharact.Prot.				1	12.17	1										
119600292	-	hCG1811380, isoform CRA_b		Uncharact.Prot.													10.13	1		
119609449	-	hCG1811735, isoform CRA_b		Uncharact.Prot.							1	10.14	1							
119615328	-	hCG1812044		Uncharact.Prot.									1	10.15	1					
119579860	-	hCG1816984		Uncharact.Prot.									2	10.13	2					
119569811	-	hCG1818116		Uncharact.Prot.				1	10.12	1										
119568628 E1P563		HCG1820801, isoform CRA_a	hCG_1820801	Uncharact.Prot.									1	10.13	1					
119615942	-	hCG1980041		Uncharact.Prot.									1	10.13	1					
119587055	-	hCG1983510, isoform CRA_a		Uncharact.Prot.									1	10.13	1					
119610039	-	hCG1987621		Uncharact.Prot.									1	10.10	1					
119593876	-	hCG1988207		Uncharact.Prot.														10.12	1	
119570614	-	hCG1990246		Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
119575164	-	hCG1992642		Uncharact.Prot.							1	10.16	1							
119624943	-	hCG2000782		Uncharact.Prot.									1	10.10	1					
119593297	-	hCG2001975		Uncharact.Prot.							1	10.14	1							
119568272	-	hCG2030186		Uncharact.Prot.				1	10.17	1										
119627502	-	hCG2036582, isoform CRA_c		Uncharact.Prot.				1	10.12	1										
119612359	-	hCG2036685, isoform CRA_a		Uncharact.Prot.							1	10.12	1							
119581199	-	hCG2036742		Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
119574494	-	hCG2038204		Membrane				1	10.13	1							10.13	1		
119617556	-	hCG2038212		Uncharact.Prot.									1	10.14	2					
119605306	-	hCG2038294		Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
119584901	-	hCG2038659, isoform CRA_a		Uncharact.Prot.									1	10.14	1					
119582094	-	hCG2038686		Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
119600873	-	hCG2039036		Uncharact.Prot.	1	10.15	1						1	10.14	1					
119613121	-	hCG2039070		Uncharact.Prot.									1	10.11	1					
119574212	-	hCG2040157		Uncharact.Prot.	1	10.22	1											10.21	1	
119620296	-	hCG2040443		Uncharact.Prot.									1	10.13	1					
119583897	-	hCG2041258		Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
119575421	-	hCG2041563		Uncharact.Prot.									1	10.17	3					
119593222	-	hCG2042264		Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
119615460	-	hCG2042294		Uncharact.Prot.									1	10.11	1					
119606810	-	hCG2042336		Uncharact.Prot.							1	10.12	1							
119572363	-	hCG22067		Uncharact.Prot.				2	10.16	2								10.17	3	
119621187	-	hCG22389, isoform CRA_b		Uncharact.Prot.							1	10.16	3	1	10.15	4				
119589378	-	hCG22561, isoform CRA_b		Uncharact.Prot.									1	10.13	1					
119625474	-	hCG38879		Uncharact.Prot.									1	14.13	1					
6808082 Q9NT86		HCG42237	DKFZp434C0923	Uncharact.Prot.									1	10.13	1					
148596992 Q86TB3		heart alpha-kinase	ALPK2	Unknown	1	10.14	1													
7243209 Q9P2D3		HEAT repeat-containing protein 5B	HEATR5B	Unknown							1	10.13	1	1	10.15	1				
4529894 P34931		Heat shock 70 kDa protein 1L	HSPA1L	Cytoplasm	1	10.15	2						2	10.14	3					
34419635 P17066		Heat shock 70 kDa protein 6	HSPA6	Cytoplasm							2	10.17	2	3	10.17	2				
24234686 P11142		Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	Cytoplasm							1	20.21	2	1	10.18	2				
155722983 Q12931		Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	Cytoplasm									3	10.23	4					
4504517 P04792		Heat shock protein beta-1	HSPB1	Cytoskeleton									1	10.13	1					
32486 P07900		Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	Cytoplasm									3	10.15	3					
32488 P07900		Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	Cytoplasm	3	10.18	2											10.13	1	
20149594 P08238		Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Cytoplasm	1	18.26	1						1	18.22	1					
13676857 P54652		Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2	Cytoplasm				1	10.16	1										
27902682 Q86YQ1		Hemoglobin alpha-2	HBA2	Cytoplasm									1	10.14	1					
33694204 Q6VFO6		Hemoglobin beta chain	HBB	Cytoplasm									1	10.16	3					
66731527 Q4TZM4		Hemoglobin beta chain	HBB	Cytoplasm									1	14.20	1					
68005524 Q4JLR8		Hemoglobin beta chain	HBB	Cytoplasm									2	10.14	2			16.11	1	
23268451 Q8LZ10		Hemoglobin beta chain variant Hb-I, Toulouse	HBB	Cytoplasm																
4504345 P69905		Hemoglobin subunit alpha	HBA1;	Cytoplasm	3	20.23	4						3	218.27	789			20.25	28	
26892090 P68871		Hemoglobin subunit beta	HBB	Cytoplasm							1	12.14	1					20.26	30	



TABELLA A			NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2			
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
4504351	P02042	Hemoglobin subunit delta	HBD	Cytoplasm																
209447032	P61920	Hemoglobin subunit gamma-1	HBG1	Cytoplasm	3	10.18	2				3	218.30	499	3	100.94	147				
4885397	P02008	Hemoglobin subunit zeta	HBZ	Cytoplasm							3	20.28	10	3	26.93	20				
4504349	D9YZU5	Hemoglobin, beta	HBB	Cytoplasm							3	13.50	10	3	10.14	5				
62087380	Q59H59	Hepatocyte growth factor isoform 1 preproprotein variant	HGF	Unknown	1	10.16	1							3	90.93	349	54.27	77	18.24	4
33286416	Q92902	Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein	HPS1	Lysosome				1	10.15	1										
4456989	Q9Y610	HERV-K_7p22.1 provirus ancestral Pro protein	ERVK6	Cytoplasm	1	10.14	1													
74739411	-	HES7_HUMAN RecName: Full=Transcription factor HES-7; Alt		Unknown										1	10.14	1				
1711240	P49312	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Hnmpa1	Nucleus	1	10.16	2				1	10.15	1							
929663	Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	Nucleus										3	10.21	2	20.24	2		
56699409	P38159	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	RBMX	Nucleus							2	10.15	2							
26341878	P61979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Hnmpk	Nucleus							1	10.13	2							
32356	P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	Nucleus													10.14	1		
14141152	P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	Nucleus							2	10.19	1							
4504447	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	Nucleus							1	10.13	2							
968888	P09429	High mobility group protein B1	HMGB1	Nucleus													10.17	3	10.14	1
4504489	P04196	Histidine-rich glycoprotein	HRG	Extracellular										2	10.16	1	30.27	8		
40805843	Q92831	Histone acetyltransferase KAT2B	KAT2B	Nucleus													10.16	1		
4885373	Q02539	Histone H1.1	HIST1H1A	Nucleus										3	10.17	2				
4885377	P16402	Histone H1.3	HIST1H1D	Nucleus							1	10.14	1				10.21	1		
4885381	P16401	Histone H1.5	HIST1H1B	Nucleus							1	10.13	1							
28195394	Q8IU66	Histone H2A type 2-B	HIST2H2AB	Nucleus													10.21	2		
4504255	P0C0S5	Histone H2A.Z	H2AFZ	Nucleus							1	10.14	1							
1568557	P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	HIST1H2BC	Nucleus													10.22	2		
4504301	P62805	Histone H4	HIST1H4A	Nucleus	1	10.15	1													
210032580	Q9UPS6	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1B	SETD1B	Nucleus							1	10.21	1							
20521978	Q9BYW2	Histone-lysine N-methyltransferase SETD2	SETD2	Nucleus							1	10.13	1	1	10.13	1				
11493712	Q9H2Z4	Homeobox protein Nkx-2.4	NKX2-4	Nucleus	1	10.11	1													
4759198	Q86YM7	Homer protein homolog 1	HOMER1	Synapse	1	10.13	1													
19923193	P50502	Hsc70-interacting protein	ST13	Cytoplasm							2	10.15	1							
90903231	P42858	Huntingtin	HTT	Vesicle				1	10.12	1	1	10.18	1							
6807686	Q4G0P3	Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	Unknown							1	10.13	1							
133922590	Q8IIWW8	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial	ADHFE1	Mitochondrion										1	10.15	1				
119580057	-	hypothetical protein DKFZp434K191, isoform CRA_a		Uncharact.Prot.										1	10.13	1				
119599630	-	hypothetical protein FLJ35880		Uncharact.Prot.															10.11	1
22749117	-	hypothetical protein LOC152405		Uncharact.Prot.										1	10.14	1				
7705775	-	hypothetical protein LOC51101		Uncharact.Prot.	1	10.14	1													
119591728	-	hypothetical protein LOC51252, isoform CRA_b		Uncharact.Prot.										1	10.17	1				
119604784	-	hypothetical protein MGC11271, isoform CRA_c		Extracellular				2	10.21	2										
4504483	P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT1	Cytoplasm							1	10.13	1							
4557659	P22304	Iduronate 2-sulfatase	IDS	Lysosome	3	36.90	6	3	46.92	10				3	49.55	9	20.19	2	40.22	11
3004778	-	Ig heavy chain variable region		Immunoglobulin										1	10.13	1				
2345024	-	Ig heavy chain VH3 region		Immunoglobulin							1	10.15	1							
441347	-	Ig kappa light chain		Immunoglobulin															10.17	2
68533121	Q4LE38	IKBKAP variant protein	IKBKAP	Unknown							1	10.15	1							
62871100	-	immunoglobulin alpha heavy chain variable region		Immunoglobulin													10.14	1		
12054072	-	immunoglobulin heavy chain constant region gamma 1		Immunoglobulin	3	13.48	2													
112697059	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin										1	10.10	1				
112699904	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin				1	10.11	1										
112700480	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin	1	10.13	1													

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
112702504	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin				1	10.13	1				1	10.14	2				
20975646	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin																
21988608	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin																
70798520	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin										1	10.11	1				
8809998	-	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin							1	10.14	1							
140064301	-	immunoglobulin heavy chain variable region VH3-30		Immunoglobulin				2	10.15	1							10.16	2		
21668566	-	immunoglobulin heavy chain VHDJ region		Immunoglobulin				1	10.10	1										
21669913	-	immunoglobulin heavy chain VHDJ region		Immunoglobulin	1	10.11	1													
9968442	-	immunoglobulin kappa chain variable region		Immunoglobulin							2	10.14	1	1	10.15	1				
3169770	-	immunoglobulin kappa light chain		Immunoglobulin										1	10.16	1				
21669337	-	immunoglobulin kappa light chain VLJ region		Immunoglobulin										3	12.92	3			10.16	1
3769587	-	immunoglobulin lambda light chain		Immunoglobulin										1	10.15	2				
4566073	-	immunoglobulin lambda light chain		Immunoglobulin							1	10.16	1							
7573013	-	immunoglobulin lambda light chain variable region		Immunoglobulin							2	10.17	1	3	10.15	7				
37789767	-	immunoglobulin lambda light chain variable region		Immunoglobulin							1	10.13	1							
4761377	-	immunoglobulin lambda light chain variable region		Immunoglobulin	1	10.15	1													
114385775	-	immunoglobulin light chain variable region		Immunoglobulin										2	10.13	2				
186196	-	immunoglobulin mu chain		Immunoglobulin										1	10.15	1				
54780380	-	immunoglobulin mu heavy chain		Immunoglobulin	1	10.14	1													
54780518	-	immunoglobulin mu heavy chain		Immunoglobulin										3	10.13	2				
148717951	-	immunoglobulin mu heavy chain		Immunoglobulin							1	10.10	1							
2645890	Q8N6C5	Immunoglobulin superfamily member 1	IGSF1	Immunoglobulin										1	10.15	1				
1934907	O00505	Importin subunit alpha-3	KPNA3	Nucleus							1	10.15	1							
19923142	Q14974	Importin subunit beta-1	KPNB1	Nucleus							1	10.18	1							
40788022	Q70EL1	Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 54	USP54	Unknown							1	10.12	1							
49256587	Q9NXR8	Inhibitor of growth protein 3	ING3	Nucleus										1	10.14	1				
41352712	Q14920	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	IKBKB	Cytoplasm										1	10.13	1			10.13	1
21956641	Q96A47	Insulin gene enhancer protein ISL-2	ISL2	Nucleus																
74724241	Q96LV5	Integrator complex subunit 4-like protein 1	INTS4L1	Unknown	1	10.16	1													
31874666	Q75QN2	Integrator complex subunit 8	INTS8	Nucleus							1	10.15	1							
4504753	-	integrin alpha 7 precursor		Unknown	1	10.14	1													
32727	Q14618	Interferon alpha-N	IFNA16	Extracellular				1	10.12	1	1	10.15	1							
62088828	Q59F37	Interferon regulatory factor 1 variant	IRF1	Unknown							1	10.13	1							
10719608	Q8N6P7	Interleukin-22 receptor subunit alpha-1	IL22RA1	Membrane													10.13	1	10.13	1
4504673	P08887	Interleukin-6 receptor subunit alpha	IL6R	Membrane	1	10.13	1													
32526901	Q8WYA0	Intraflagellar transport protein 81 homolog	IFT81	Unknown	1	10.14	2				3	10.15	3	2	10.14	3	10.15	1		
6683647	Q8N2Y8	Iporin	RUSC2	Cytoplasm							1	10.12	2							
872121	P48735	Iso citrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	Mitochondrion	1	10.14	1													
60729620	-	JC7963 phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate p		Unknown							3	10.16	2							
60729665	-	JC8008 beta3-glycosyltransferase-like protein - human		Unknown	3	10.15	2	2	10.14	2				3	10.14	1	10.13	2	10.13	2
38372909	Q7LBC6	JmjC domain-containing histone demethylation protein 2B	KDM3B	Nucleus							1	10.18	1							
542837	-	JN0908 H4-exporting ATPase		Unknown										3	10.12	2				
4504811	P14923	Junction plakoglobin	JUP	Membrane	1	10.13	1													
60594967	Q5BQ95	Kallikrein 13 splice variant 7	KLK13	Unknown	1	10.12	1													
55956888	Q8NEP7	Kelch domain-containing protein 9	KLHDC9	Unknown							1	10.17	1							
13359195	Q9BY99	KIAA1661 protein	KIAA1661	Unknown				1	10.16	1										
21748896	Q6ZWJ8	Kielin/chordin-like protein	KCP	Extracellular										1	10.14	1				
1212917	Q12756	Kinesin-like protein KIF1A	KIF1A	Synapse	1	10.15	1													
29421178	O60333	Kinesin-like protein KIF1B	KIF1B	Vesicle										1	16.20	1				
27552819	Q5T7N3	KN motif and ankyrin repeat domain-containing	KANK4	Cytoskeleton				1	10.23	1										

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
56121703	P84560	Ladybird homeobox corepressor 1	SKOR1	Nucleus	1	10.13	1													
438056	P24043	Laminin subunit alpha-2	LAMA2	Extracellulare				1	10.12	2										
167614504	P07942	Laminin subunit beta-1	LAMB1	Extracellulare										1	10.14	1				
5174445	O43813	LanC-like protein 1	LANCL1	Membrane										1	10.15	1				
10440225	Q659C4	La-related protein 2	LARP1B	Cytoplasm	1	10.16	1													
29375	P48634	Large proline-rich protein BAT2	PRRC2A	Cytoplasm															10.17	1
66361584	Q9BS40	Latexin	LXN	Cytoplasm							1	10.13	2							
57165355	O94910	Latrophilin-1	LPHN1	Membrane							1	10.15	1							
51095091	Q6P5Q4	Leiomodrin-2	LMOD2	Cytoskeleton							1	10.13	1	1	10.13	1				
169170527	A4D1F6	Leucine-rich repeat and death domain-containing protein LOC401387	LRRD1	Unknown							1	10.13	1							
37181688	Q96FE5	Leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing nogo receptor-interacting protein 1	LINGO1	Membrane													10.16	1		
153791507	Q9H3W5	Leucine-rich repeat neuronal protein 3	LRRN3	Membrane	1	10.19	1													
33341790	Q15345	Leucine-rich repeat-containing protein 41	LRRC41	Unknown							1	10.21	1	1	10.20	3				
116283620	Q05C16	Leucine-rich repeat-containing protein 63	LRRC63	Unknown							1	10.13	1							
5803066	O75019	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 1	LILRA1	Membrane										1	10.11	2				
440855	P29376	Leukocyte tyrosine kinase receptor	LTK	Membrane													10.22	1		
4505977	O43688	Lipid phosphate phosphohydrolase 2	PPAP2C	Membrane	1	10.11	1													
32189362	O75145	Liprin-alpha-3	PPFIA3	Membrane										1	10.12	1				
55769554	O75335	Liprin-alpha-4	PPFIA4	Cytoplasm							2	10.22	1							
5031857	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	Cytoplasm	1	10.15	1				2	10.16	2							
4557032	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	Cytoplasm	3	16.85	4				3	33.58	10	3	20.15	2				
4504975	P01130	Low-density lipoprotein receptor	LDLR	Membrane	2	10.16	1													
1809240	P98164	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	LRP2	Lysosome							1	10.17	1							
13111975	P11117	Lysosomal acid phosphatase	ACP2	Lysosome															10.14	2
126590	P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA	Lysosome	3	26.85	5	3	29.55	4	1	10.24	1	3	13.51	2			10.16	1
2209015	O00754	Lysosomal alpha-mannosidase	MAN2B1	Lysosome				1	20.16	2										
4826940	P42785	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	Lysosome	2	10.14	2				3	26.95	9	3	30.19	13	30.22	14	40.16	8
5031631	Q14108	Lysosome membrane protein 2	SCARB2	Lysosome							2	15.15	2	3	23.51	7	30.32	3	10.15	2
112380628	P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP1	Lysosome													10.21	1		
1065033	P61626	Lysozyme C	LYZ	Extracellulare										3	10.20	2			10.16	1
4506113	P04156	Major prion protein	PRNP	Golgi apparatus													10.14	2		
5174539	P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	Cytoplasm	3	10.14	1				1	10.19	1							
27477045	Q8IVS2	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial	MCAT	Mitochondrion							1	10.12	1							
24475586	Q9UM22	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1	Lysosome	3	153.60	221	3	169.59	184	3	30.20	16	3	63.57	41	68.24	60	50.21	24
7706611	-	MAP3K12 binding inhibitory protein 1	Unknown	Unknown										2	10.14	1				
13491174	P49006	MARCKS-related protein	MARCKSL1	Unknown										1	10.13	1				
14149712	Q9BY79	Membrane frizzled-related protein	MFRP	Membrane				1	10.11	2										
60115373	Q5D1Q2	Membrane-associated phospholipase A1 beta splice variant	LOC375108	Unknown													10.15	1		
45267839	Q8N344	Mesoderm induction early response protein 2	MIER2	Nucleus										1	10.14	1				
4504141	Q14833	Metabotropic glutamate receptor 4	GRM4	Synapse	1	10.10	1													
51095079	O00222	Metabotropic glutamate receptor 8	GRM8	Membrane				1	10.16	1										
4826830	P51608	Methyl-CpG-binding protein 2	MECP2	Nucleus										1	10.14	1				
218456537	B7UDB2	MHC class II antigen	HLA-DRB1	Membrane							1	10.14	1							
4758714	O14880	Microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3	ER				1	10.18	1										
29893564	Q96E28	Microspherule protein 1	MCRS1	Nucleus										1	10.16	1				
1850617	P11137	Microtubule-associated protein 2	MAP2	Cytoskeleton							3	23.53	6				10.15	2		
14017973	Q96JE9	Microtubule-associated protein 6	MAP6	Cytoskeleton							3	13.52	2	3	33.56	7	10.14	1		
8400711	P10636	Microtubule-associated protein tau	MAPT	Cytoskeleton							3	16.90	5	3	34.18	3	20.16	2		
24415404	Q9N2U2	Midasin	MDN1	Nucleus				1	10.17	4										

**TABELLA A**

GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
					Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
20149598	Q9UBX3	Mitochondrial dicarboxylate carrier	SLC25A10	Mitochondrion	1	10.12	1													
151108473	Q9Y3D6	Mitochondrial fission 1 protein	FIS1	Mitochondrion	1	10.18	1	2	10.19	2										
23881	P28482	Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Cytoskeleton	1	10.13	1										10.20	1		
4164002	O95382	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	MAP3K6	Cytoskeleton				1	10.13	1										
12483934	-	MLL/GMPS fusion protein		Unknown								1	10.15	1						
4505257	P26038	Moesin	MSN	Cytoskeleton				1	10.22	2										
2119276	Q6LC01	MRNA encoding beta-tubulin.	TUBB	Cytoskeleton	3	50.29	17	1	10.13	1	2	10.18	3	3	53.52	10	90.41	33	20.23	6
10944945	Q99102	Mucin-4	MUC4	Extracellular	1	10.19	1				1	10.15	1							
2224917	Q6W4X9	Mucin-6	MUC6	Extracellular									2	10.15	2					
7387892	O95255	Multidrug resistance-associated protein 6	ABCC6	Membrane	1	10.13	1													
190349638	B3VCH6	Multiple-myeloma-related WHSC1/MMSET isoform RE-IIBP	WHSC1	Nucleus				1	10.14	1										
82548237	Q2XP30	Mutant beta-globin	HBB	Cytoplasm								3	10.16	34	10.15	9				
158514342	A8W2J3	Mutl-like 1 protein	MLH1	Nucleus	1	10.14	1													
68509930	P02686	Myelin basic protein	MBP	Membrane	3	210.92	102	3	106.23	77	3	162.90	94	3	213.57	222	210.28	171	140.24	120
4505909	P02689	Myelin P2 protein	PMP2	Membrane													30.15	6		
13591880	P60203	Myelin proteolipid protein	Pip1	Membrane	3	16.82	4					2	10.14	3						
1408050	Q13875	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	MOBP	Cytoplasm				3	10.16	2										
793839	Q16653	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	MOG	Membrane	2	10.13	1													
4885487	Q15773	Myeloid leukemia factor 2	MLF2	Nucleus				3	10.13	1										
78191535	Q308M1	Myeloproliferative leukemia virus oncogene		Unknown								1	10.11	1						
7305053	Q9NZM1	Myoferlin	MYOF	Membrane				1	10.15	1										
12667788	P35579	Myosin-9	MYH9	Cytoskeleton								1	20.18	2						
51100974	O94832	Myosin-Id	MYO1D	Cytoskeleton								1	10.16	1						
5732618	B2RTY4	Myosin-IXa	MYO9A	Membrane								1	16.20	1						
20338989	Q8IUG5	Myosin-XVIIb	MYO18B	Cytoskeleton	1	10.17	1													
219894	P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	Membrane								3	20.22	9	10.23	2				
4503899	P34059	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	GALNS	Lysosome	3	23.51	4	3	13.49	3		2	15.13	2	10.13	1				
4758768	O95299	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	NDUFA10	Mitochondrion														10.17	1	
47778923	Q6BCY4	NADH-cytochrome b5 reductase 2	CYB5R2	Mitochondrion				1	10.14	1										
71012422	Q4GNE2	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L	NADH4L	Mitochondrion															10.13	1
71013702	Q4GEN5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	NADH5	Mitochondrion	1	10.14	1				1	10.14	1							
167783666	B4YCP0	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	ND5	Mitochondrion															10.15	1
4505143	P48163	NADP-dependent malic enzyme	ME1	Cytosol	1	10.14	1													
5031931	Q13765	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	Cytosol								3	10.20	2	10.20	2				
7305303	Q9Y2A7	Nck-associated protein 1	NCKAP1	Membrane				1	10.14	1										
119631362	-	NCK-associated protein 1, isoform CRA_f		Unknown				2	10.12	1										
806562	P20929	Nebulin	NEB	Cytoskeleton				1	12.18	1										
22761723	Q9BT67	NEDD4 family-interacting protein 1	NDFIP1	Golgi apparatus															10.11	2
40788302	O75113	NEDD4-binding protein 1	N4BP1	Nucleus				1	10.13	1										
105990539	P07196	Neurofilament light polypeptide	NEFL	Cytoskeleton	2	10.19	2				3	10.22	2	10.18	1					
128147	P07197	Neurofilament medium polypeptide	NEFM	Cytoskeleton	1	10.16	1												10.17	1
11275980	P46531	Neurogenic locus notch homolog protein 1	NOTCH1	Membrane								1	18.19	2						
11275978	Q04721	Neurogenic locus notch homolog protein 2	NOTCH2	Membrane								1	10.14	1						
55770876	Q99466	Neurogenic locus notch homolog protein 4	NOTCH4	Membrane	1	10.20	3													
5453800	Q92686	Neurogranin	NRGN	Unknown				3	10.23	6	3	13.56	6	20.23	5					
111038128	Q8NEJ9	Neuroguinidin	NGDN	Nucleus	1	10.18	1													
4503911	P17677	Neuromodulin	GAP43	Synapse				1	10.19	1										
10434134	Q8NEY1	Neuron navigator 1	NAV1	Cytoskeleton							1	18.13	1							
7022787	Q8IVL1	Neuron navigator 2	NAV2	Nucleus															10.15	5
13400964	P30926	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-4	CHRNB4	Synapse				1	10.19	1										
51095143	Q28223	Neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	Membrane	1	10.16	1													
21314632	P43007	Neutral amino acid transporter A	SLC1A4	Membrane								1	10.11	1						
76826822	Q9NR71	Neutral ceramidase	ASAH2	Membrane				1	10.19	1										

TABELLA A			NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2			
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi		
21205860	Q8N138	NF-kappa-B inhibitor delta	NFKBID	Nucleus																
41281709	Q8N138	NF-kappa-B inhibitor delta	NFKBID	Nucleus																
61098457	Q5J537	NHL repeat-containing protein 3	NHLRC3	Extracellulare				3	13.50	2				1	10.13	1				
24638433	Q92542	Nicastrin	NCSTN	ER							1	10.15	1							
21619615	Q6XQM6	Nicotinate phosphoribosyltransferase	NAPRT1	Cytoplasm							1	10.27	2							
4760549	Q6KC79	Nipped-B-like protein	NIPBL	Nucleus										1	10.14	1				
24041029	P35228	Nitric oxide synthase, inducible	NOS2	Cytoplasm							2	10.20	2				14.19	2		
122937223	-	NOBOX oogenesis homeobox	Unknown	Unknown							1	10.15	1							
4506549	P10153	Non-secretory ribonuclease	RNASE2	Lysosome														10.15	1	
29568099	Q9UNZ2	NSFL1 cofactor p47	NSFL1C	Golgi apparatus							1	10.26	2							
4506919	P51688	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	SGSH	Lysosome	3	33.54	8	3	23.50	3				2	15.20	4		20.18	4	
27886563	Q14934	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4	NFATC4	Nucleus										1	12.14	1				
6470129	Q14686	Nuclear receptor coactivator 6	NCOA6	Nucleus	1	10.15	1													
5453822	P43354	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	NR4A2	Nucleus										1	10.13	1				
171460958	Q9BSC4	Nucleolar protein 10	NOL10	Nucleus				1	10.13	1										
55956788	P19338	Nucleolin	NCL	Nucleus										2	10.13	1				
31873738	Q5SRE5	Nucleoporin NUP188 homolog	NUP188	Nucleus										1	10.15	1				
4557797	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	Nucleus							2	10.13	1							
21687129	Q8WVJ2	NudC domain-containing protein 2	NUDCD2	Unknown										1	10.18	1				
10863899	Q9Y6R0	Numb-like protein	NUMBL	Unknown													10.14	1		
53793690	Q8NHC8	Olfactory receptor 2T6	OR2T6	Membrane	1	10.17	1													
52627207	Q96R67	Olfactory receptor 4C12	OR4C12	Membrane										1	10.13	1				
52693925	Q8NGJ6	Olfactory receptor 51A4	OR51A4	Membrane							1	10.16	1	1	10.14	1				
52317265	Q9H344	Olfactory receptor 51I2	OR51I2	Membrane							1	10.20	2							
38372813	Q8NH55	Olfactory receptor 52E5	OR52E5	Membrane							1	10.16	3							
52353268	Q8NGI0	Olfactory receptor 52N2	OR52N2	Membrane										1	10.14	1				
50979290	Q8NGF4	Olfactory receptor 5AP2	OR5AP2	Membrane							1	10.12	1							
38372777	Q8NGV6	Olfactory receptor 5H6	OR5H6	Membrane				3	10.20	2										
50897292	Q9GZM6	Olfactory receptor 8D2	OR8D2	Membrane				1	10.15	1										
71153033	Q8NG78	Olfactory receptor 8G5	OR8G5	Membrane							2	10.18	2							
33354281	Q9H2J7	Orphan sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter NTT73	SLC6A15	Synapse				1	10.10	1										
157266326	Q04671	P protein	OCA2	Melanosome										1	10.14	1				
45006031	P50897	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	Lysosome	3	46.91	27	3	60.22	28	3	23.59	8	3	26.90	18	90.31	36	30.16	10
10639043	Q9BXP8	Pappalysin-2	PAPPA2	Extracellulare	1	10.14	1													
20521830	Q96RG2	PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase	PASK	Golgi apparatus							1	10.13	1							
18958237	Q9GZU2	Paternally-expressed gene 3 protein	PEG3	Nucleus										1	10.17	1				
7022473	Q5JVF3	PCI domain-containing protein 2	PCID2	Unknown							1	10.14	1							
38683855	Q96EY7	Pentatricopeptide repeat-containing protein 3, mitochondrial	PTCD3	Mitochondrion.										1	10.12	2				
58082085	Q8IYS1	Peptidase M20 domain-containing protein 2	PM20D2	Unknown										1	10.15	3	10.15	1	10.14	1
6679439	P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	Cytoplasm							2	15.16	4							
10863927	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	Cytoplasm	2	10.21	2				1	10.28	4							
4758950	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	Melanosome										1	10.11	1				
45439316	Q9UNP9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	PPIE	Nucleus														10.16	1	
4503725	P62942	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A	Cytoplasm	1	10.16	1													
4505591	Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1	Cytoplasm							3	16.84	2	2	25.16	7				
32189392	P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	Cytoplasm	1	10.14	1				3	63.64	40	3	36.84	16				
4758638	P30041	Peroxiredoxin-6	PRDX6	Lysosome	1	10.19	1				3	53.64	15	2	15.18	2				
975290	Q7KYX9	PFKM protein	PFKM	Unknown										1	10.13	1				
21739822	O75151	PHD finger protein 2	PHF2	Nucleus										1	10.14	1				
4505621	P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	Cytoplasm	1	10.24	1				1	10.17	2	3	16.89	2				
19702127	Q8TCU6	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein	PREX1	Cytoplasm							1	10.15	1							
2326227	P42356	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	PI4KA	Golgi	1	10.16	1													

TABELLA A					NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione apparato	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
472991	P42336	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	PIK3CA	Unknown										1	10.13	1				
3954946	O00750	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing beta polypeptide	PIK3C2B	ER							1	10.14	1							
6857820	P48426	Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	PIP4K2A	Membrane							1	10.16	1							
23397570	Q0VAA5	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C X domain-containing protein 2	PLCXD2	Cytoplasm	1	10.14	1													
66347388	Q4VXJ0	Phosphodiesterase 7B	PDE7B	Nucleus							1	10.16	1	1	10.15	1				
4505763	P00558	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	Cytoplasm							1	10.17	1							
35438	P07205	Phosphoglycerate kinase 2	PGK2	Cytoplasm							2	10.18	1	1	10.16	1				
1575347	Q8IV08	Phospholipase D3	PLD3	ER	3	36.97	18	3	66.96	30	2	45.28	9	3	33.55	13	48.31	25	40.29	30
825667	P36969	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	Cytoplasm							1	10.18	1	3	10.16	3	20.21	3		
4505781	P46019	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform	PHKA2	Membrane							1	10.18	1							
49258202	-	pim-3 oncogene		Unknown	1	10.11	1													
20139104	Q99569	Plakophilin-4	PKP4	Membrane										3	29.55	5	12.13	3		
22761023	Q9Y646	Plasma glutamate carboxypeptidase	PGCP	Extracellulär																
119582150	-	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide		Unknown							1	10.14	1							
48474644	Q9H4M7	Pleckstrin homology domain-containing family A member 4	PLEKHA4	Cytoplasm							1	10.13	1							
6330407	Q9ULM0	Pleckstrin homology domain-containing family H member 1	PLEKHH1	Unknown										1	10.13	1				
6634023	Q9Y4G2	Pleckstrin homology domain-containing family M member 1	PLEKHM1	Cytoplasm							1	10.18	1							
3327054	Q9Y4D7	Plexin-D1	PLXND1	Membrane							1	10.18	1							
6331213	Q460N5	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	PARP14	Nucleus	1	10.24	1				1	14.19	1							
19923084	Q8TDX9	Polycystic kidney disease protein 1-like 1	PKD1L1	Membrane	1	10.13	1													
2627129	P0CG48	Polyubiquitin-C [Cleaved into: Ubiquitin]	UBC	Cytoplasm										3	10.21	7				
119571166	-	porcupine homolog		Unknown													10.13	1		
20149500	P08397	Porphobilinogen deaminase	HMBS	Mitochondrion							1	10.21	1							
24497462	Q03721	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 4	KCNK4	Membrane										1	10.10	1				
4885407	Q9Y3Q4	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4	HCN4	Membrane							1	10.15	1							
74746677	Q5TYW8	PRAME family member 3	PRAMEF3	Unknown				1	10.15	1				2	10.18	2				
114665857	-	PREDICTED: enolase 3		Cytoplasm	1	10.16	1													
113424187	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.													10.11	1		
113425445	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.	1	10.12	1	1	10.12	1										
169161622	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.	1	10.15	1													
169167288	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.										1	12.18	1				
169167582	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.							1	10.14	1							
169172087	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.	1	10.10	1													
169172431	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
169211022	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.	1	10.15	1													
169214857	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.										1	10.13	1				
169217349	-	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.				1	10.13	1										
114630632	-	PREDICTED: hypothetical protein isoform 3		Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
41201737	-	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein SA		Uncharact.Prot.													10.13	1		
169163422	-	PREDICTED: similar to 60S acidic ribosomal prot		Uncharact.Prot.													10.13	1		
73996135	-	PREDICTED: similar to Costomer zeta-1 subunit		Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
169173186	-	PREDICTED: similar to hCG1643218		Uncharact.Prot.	2	10.14	2													
169216184	-	PREDICTED: similar to hCG1790520		Uncharact.Prot.										1	14.15	1				

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi
169213385	-	PREDICTED: similar to hCG1996180		Uncharact.Prot.														
169216272	-	PREDICTED: similar to hCG201263		Uncharact.Prot.							1	10.18	1	1	10.16	1		
169171899	-	PREDICTED: similar to hCG2014367		Uncharact.Prot.							1	10.14	3	1	10.14	1		
114595419	-	PREDICTED: similar to kappaB DNA binding protai		Nucleus				1	16.13	1	1	10.13	1	1	10.11	1		
169169902	-	PREDICTED: similar to lipoprotein Lp		Uncharact.Prot.	1	10.16	1											
114686282	-	PREDICTED: similar to OTTHUMP0000028797 isofor		Uncharact.Prot.	1	10.13	1											
169191942	-	PREDICTED: similar to PRO3077		Uncharact.Prot.													10.16	1
109103776	-	PREDICTED: similar to Ribose-5-phosphate isomer		Uncharact.Prot.							1	10.22	2					
114668424	-	PREDICTED: similar to surface antigen isoform 5		Uncharact.Prot.							1	10.16	1					
73961079	-	PREDICTED: similar to Tropomyosin alpha 3 chain		Cytoskeleton							1	10.20	1					
73996541	-	PREDICTED: similar to tubulin, alpha 1 isoform 6		Uncharact.Prot.										1	10.19	1		
88943644	-	PREDICTED: similar to ubiquitin		Uncharact.Prot.							1	10.20	1					
11386147	P07602	Proactivator polypeptide [Cleaved into: Saposin A, B, C, D]	pSAP	Lysosome	3	16.82	7	3	26.81	15							20.14	4
74762733	Q9H2U1	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36	DHX36	Nucleus							1	10.13	1					
14017867	Q9HD20	Probable cation-transporting ATPase 13A1	ATP13A1	Membrane							1	10.13	1					
74706598	Q15751	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	HERC1	Cytosol	1	10.13	1											
21753501	Q8N9H8	Probable exonuclease mut-7 homolog	EXD3	Nucleus	1	10.11	1											
15428322	Q9BZJ8	Probable G-protein coupled receptor 61	GPR61	Membrane	1	10.15	1											
7022724	Q7Z333	Probable helicase senataxin	SETX	Cytoplasm													10.16	1
31874607	Q7Z333	Probable helicase senataxin	SETX	Nucleus										1	10.13	1		
31565567	Q7Z6M3	Probable mast cell antigen 32 homolog	MILR1	Membrane	1	10.15	1											
22748627	Q9H3J6	Probable peptide chain release factor C12orf65, mitochondrial	C12orf65	Mitochondrion										1	10.11	1		
62632750	Q9Y2G3	Probable phospholipid-transporting ATPase IF	ATP11B	Membrane	1	10.13	1											
47077805	O75110	Probable phospholipid-transporting ATPase IIA	ATP9A	Membrane	1	10.12	1											
10437586	O94823	Probable phospholipid-transporting ATPase VB	ATP10B	Membrane							1	10.15	1					
16553656	A2RTX5	Probable threonyl-tRNA synthetase 2, cytoplasmic	TARSL2	Cytoplasm	1	10.13	1											
47117620	Q9BWW7	Probable tubulin polyglutamylase TTL2	TTL2	Cytoskeleton	1	10.10	1											
124494254	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	Nucleus							1	10.17	1					
63252891	O15460	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	P4HA2	ER										2	10.17	1		
46854585	P12872	Promotilin	MLN	Extracellular							1	10.14	1					
4506181	P25787	Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2	Cytoplasm							3	10.24	1					
4506185	P25789	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4	Cytoplasm							1	10.18	1					
558526	P28074	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5	Cytoplasm							2	10.19	1					
42716291	P11171	Protein 4.1	EPB41	Cytoskeleton							3	39.53	6				10.16	1
22748975	Q8N808	Protein AMAC1	SLC35G3	Membrane							1	10.13	1					
5262864	Q9Y4X5	Protein ariadne-1 homolog	ARIH1	Cytoplasm				2	10.15	1								
78174317	Q3B7T3	Protein BEAN	BEAN1	Membrane													10.13	1
14794910	Q96RKO	Protein capicua homolog	CIC	Nucleus										1	10.14	1		
7959315	Q8TCG1	Protein CIP2A	KIAA1524	Membrane				1	10.20	1								
21754713	O75629	Protein CREG1	CREG1	Extracellular	3	10.22	4	2	25.19	8								
1208427	P30101	Protein disulfide-isomerase A3	PDI3A	ER	2	10.17	2											
31543380	Q99497	Protein DJ-1	PARK7	Mitochondrion	3	10.20	2				2	10.20	3					
24899204	Q8IVF1	Protein FAM22A	FAM22A	Uncharact.Prot.							2	10.19	2	1	10.18	3		
20521884	Q8NFC6	Protein FAM44A	BOD1L	Nucleus	1	10.16	1											
21740279	Q9H706	Protein FAM59A	FAM59A	Uncharact.Prot.							1	10.16	1					
38348384	Q8NAN2	Protein FAM73A	FAM73A	Membrane				1	10.13	1								
21536485	P54198	Protein HIRA	HIRA	Nucleus				1	10.13	1								
40788315	Q5T8A7	Protein KIAA0649	KIAA0649	Nucleus							1	10.13	1					
21362062	Q8WZA0	Protein LZIC	LZIC	Unknown							1	10.19	2					

**TABELLA A**

GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
					Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
193211616	Q9BPW8	Protein NipSnap homolog 1	NIPSNAP1	Membrane																
21758574	Q8WVF1	Protein OSCP1	OSCP1	Membrane				1	10.11	1										
21735492	Q9UD71	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	PPP1R1B	Cytoplasm				1	10.16	1	3	10.29	6	3	10.24	2	10.28	4		
30794372	Q86U86	Protein polybromo-1	PBRM1	Nucleus													10.19	1		
4506773	P06702	Protein S100-A9	S100A9	Nucleus				1	10.20	1										
7959295	Q58EX2	Protein sidekick-2	SDK2	Membrane							1	10.13	1							
29421204	Q9HCD6	Protein TANC2	TANC2	Cytoskeleton				1	10.14	1										
27735256	P53992	Protein transport protein Sec24C	SEC24C	Membrane									1	10.12	1					
5262588	Q9NQW1	Protein transport protein Sec31B	SEC31B	Membrane													10.19	1		
20521990	Q8N2C7	Protein unc-80 homolog	UNC80	Membrane													10.15	3		
24041018	Q9UBK9	Protein UXT	UXT	Cytoskeleton								1	10.13	1						
39777597	P21980	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	Mitochondrion							2	20.24	4							
94981556	O43548	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 5	TGM5	Cytoplasm							1	10.14	1							
180637	P22061	Protein-L-isoaspartate	PCMT1	ER							1	20.16	2							
14165397	Q9Y5I0	Protocadherin alpha-13	PCDHA13	Membrane							1	10.15	1							
14270505	Q9Y5G0	Protocadherin gamma-B5	PCDHGB5	Membrane	1	10.15	1													
7657443	Q9BZA7	Protocadherin-11 X-linked	PCDH11X	Membrane										1	10.13	1				
15211933	Q96QE2	Proton myo-inositol cotransporter	SLC2A13	Membrane													10.24	2		
16589056	Q96P88	Putative gonadotropin-releasing hormone II receptor	GNRHR2	Membrane							1	10.11	1							
61104911	Q58FF8	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	HSP90AB2P	Cytoplasm	3	10.21	2													
27734917	Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2	Lysosome	3	30.20	7	3	23.50	6	3	13.58	5	1	20.21	3	10.23	2		
10437280	Q7L7V1	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX32	DHX32	Nucleus							1	10.13	1							
10436240	Q9H853	Putative tubulin-like protein alpha-4B	TUBA4B	Cytoskeleton										1	10.14	1				
27807840	Q54A24	Putative uncharacterized protein	CNTNAP4	Nucleus													10.11	1		
18027334	Q8WZ27	Putative uncharacterized protein	FLJ13197	Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
206725424	A2RQF4	Putative uncharacterized protein	C1orf122	Uncharact.Prot.	1	10.10	1													
57864791	Q3ZM64	Putative uncharacterized protein	LOC389857	Uncharact.Prot.	1	10.14	1													
12053207	Q9H0C7	Putative uncharacterized protein DKFZp434B0535	DKFZp434B0535	Uncharact.Prot.														10.17	1	
21733016	Q8NDQ0	Putative uncharacterized protein DKFZp434I2129	CKLFSF7	Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
6807942	Q9NTB8	Putative uncharacterized protein DKFZp434J032	DKFZp434J032	Uncharact.Prot.							1	10.16	1							
30268347	Q86T70	Putative uncharacterized protein DKFZp451B1115	DKFZp451B1115	Uncharact.Prot.							1	14.13	1							
12052940	Q9H0P5	Putative uncharacterized protein DKFZp566P0524	DKFZp566P0524	Membrane							1	10.24	2							
27886593	Q658W2	Putative uncharacterized protein DKFZp666Q0110	DKFZp666Q0110	Uncharact.Prot.										1	10.12	1				
51491277	Q68CP0	Putative uncharacterized protein DKFZp686B2325	DKFZp686B2325	Uncharact.Prot.										1	10.12	2	10.14	1	10.12	1
51476394	Q68DN3	Putative uncharacterized protein DKFZp781F1414	DKFZp781F1414	Membrane							1	10.18	1							
51476489	Q68D16	Putative uncharacterized protein DKFZp781H1925	DKFZp781H1925	ER							1	10.16	1							
169213543	Q6ZPA2	Putative uncharacterized protein FLJ26174	LOC100131831	Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
62630194	Q4ZG76	Putative uncharacterized protein TANK	TANK	Uncharact.Prot.				1	10.16	1							10.18	3		
8922498	Q9NV59	Pyridoxine-5-phosphate oxidase	PNPO	Cytoplasm	2	10.17	1													
33286418	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	Cytoplasm	3	43.57	13							2	15.16	4				
10835121	P30613	Pyruvate kinase isozymes R/L	PKLR	Cytoplasm							2	10.20	2							
3342737	O75250	R26660_2	C19orf36	Unknown				1	10.14	1										
40789017	Q9Y2K5	R3H domain-containing protein 2	R3HDM2	Nucleus													10.10	1		
4503971	P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1	Cytoplasm	1	10.16	1				3	10.22	2							
6598323	P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	Vesicle							3	33.63	8							
7662234	O75154	Rab11 family-interacting protein 3	RAB11FIP3	Vesicle										1	10.13	1				
7657496	Q9UJ41	Rab5 GDP/GTP exchange factor	RABGEF1	Vesicle							1	10.12	1							
577299	Q14699	Raftlin	RFTN1	Membrane	1	10.15	1	2	10.13	1										



TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
14595132	-	Raihu404X		Unknown																
21732405	Q96D71	RalBP1-associated Eps domain-containing protein 1	REPS1	Unknown							1	10.22	2	2	15.12	2				
4506407	P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	Nucleus							1	10.18	2							
5805295	Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	Cytoplasm							1	10.19	2							
7706095	Q9NYN1	Ras-like protein family member 12	RASL12	Membrane													10.16	1		
9845511	P63000	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1	Cytoskeleton										3	10.14	2	20.16	4		
145386506	O14807	Ras-related protein M-Ras	MRAS	Nucleus													10.15	2		
33695095	P61026	Ras-related protein Rab-10	RAB10	Vesicle				1	10.20	1	3	10.16	2	10.17	1					
4506363	P51153	Ras-related protein Rab-13	RAB13	Vesicle	1	10.18	2													
16758368	P61107	Ras-related protein Rab-14	Rab14	Vesicle										1	10.16	2				
13569962	Q9H0U4	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	Vesicle	1	20.21	3				1	10.14	1							
4506365	P61019	Ras-related protein Rab-2A	RAB2A	Vesicle							2	10.18	1							
13786129	Q9H082	Ras-related protein Rab-33B	RAB33B	Vesicle							1	10.17	3							
41393545	P51148	Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	Vesicle	1	10.16	1													
16933567	P61006	Ras-related protein Rab-8A	RAB8A	Vesicle							1	10.10	1							
7706563	Q92930	Ras-related protein Rab-8B	RAB8B	Vesicle							2	15.15	3							
33946329	P11233	Ras-related protein Ral-A	RALA	Vesicle							1	10.20	1	10.17	2	10.21	2			
35863	P61225	Ras-related protein Rap-2b	RAP2B	Vesicle							1	10.19	1							
17028471	Q8TDY2	RB1-inducible coiled-coil protein 1	RB1CC1	Nucleus	3	10.19	4				2	10.15	1							
15559211	-	RE1-silencing transcription factor		Unknown							1	10.15	1							
32456	P28827	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu	PTPRM	Membrane	1	10.19	1				2	10.20	4	10.18	1					
1666423	Q92729	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U	PTPRU	Membrane							1	10.14	2							
20521059	Q5VT52	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2	RPRD2	Unknown	1	10.12	1													
11693132	Q9HAU5	Regulator of nonsense transcripts 2	UPF2	Nucleus	1	10.16	1													
171916097	Q6XPR3	Repetin	RPTN	Extracellular				1	10.17	1										
21361176	P00352	Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	Cytoplasm							2	19.20	3							
4505671	O43924	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta	PDE6D	Unknown										1	10.13	1				
28301672	Q8IWN7	Retinitis pigmentosa 1-like 1 protein	RP1L1	Cytoskeleton										1	10.16	1				
21740232	Q7Z5J4	Retinoic acid-induced protein 1	RAI1	Nucleus							1	10.19	1							
56676393	P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	ARHGDI2	Cytoplasm							1	10.10	1							
21361458	Q96PE2	Rho guanine nucleotide exchange factor 17	ARHGEF17	Cytoplasm	1	10.13	1													
47077655	Q12774	Rho guanine nucleotide exchange factor 5	ARHGEF5	Nucleus							1	10.13	1							
22027525	Q15052	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	ARHGEF6	Cytoplasm	2	10.15	1													
62739181	Q9BST9	Rhotekin	RTKN	Cytoplasm				1	10.12	1										
5231228	O00584	Ribonuclease T2	RNASET2	Extracellular							2	15.16	2							
13124451	Q99575	Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1	POP1	Nucleus	1	10.10	1													
4506749	P23921	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	RRM1	Unknown										1	10.13	1				
6005864	O43567	RING finger protein 13	RNF13	Nucleus	2	10.12	1													
40788884	Q6PD62	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	CTR9	Nucleus										1	10.15	1				
74754395	O75526	RNA-binding motif protein, X-linked-like-2	RBMXL2	Nucleus							1	10.13	1							
151301053	Q96EV2	RNA-binding protein 33	RBM33	Nucleus							1	10.14	1							
40538732	Q96LT9	RNA-binding protein 40	RNPC3	Nucleus										1	10.13	1				
4826734	P35637	RNA-binding protein FUS	FUS	Nucleus							1	10.34	1				10.39	2	10.20	2
7661532	Q9ULX3	RNA-binding protein NOB1	NOB1	Nucleus							1	10.16	1							
1362859	-	S6162 MDCR15 protein - human		Unknown										1	10.16	1				
2134674	-	S66264 55.11 protein homolog - human		Unknown	1	10.14	2													
19923935	Q96ES7	SAGA-associated factor 29 homolog	CCDC101	Nucleus							1	10.16	1							
119593940	-	SAPS domain family, member 2, isoform CRA_c		Unknown				1	10.19	1										
29164881	Q9BT25	Sarcoma antigen NY-SAR-48	HAUS8	Cytoskeleton							1	10.10	1							
74733386	-	SARG_HUMAN RecName: Full=Specifically androgen-regulated		Unknown										1	10.14	1				
312142	Q86VB7	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein	CD163	Membrane	1	10.15	1													

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi		
1374792	Q13228	Selenium-binding protein 1	SELENBP1	Nucleus							3	30.22	4	3	16.87	3				
37182802	Q9C0C4	Semaphorin-4C	SEMA4C	Membrane							1	10.13	1							
14017955	Q9H3T2	Semaphorin-6C	SEMA6C	Membrane							1	10.13	1							
12697959	Q9BQF6	Serpin-specific protease 7	SEN7	Nucleus	1	10.15	1													
41713225	Q14674	Separin	ESPL1	Nucleus							3	10.14	4							
119220554	Q9NUV7	Serine palmitoyltransferase 3	SPTLC3	Membrane													10.14	1		
42542379	Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1	Nucleus				1	10.15	1										
14165272	Q9BXM7	Serine/threonine-protein kinase PINK1, mitochondrial	PINK1	Mitochondrion	1	10.15	1													
509243	Q15257	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'	PPP2R4	Nucleus							3	10.28	2							
157743284	Q8NB46	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C	ANKRD52	Unknown										1	10.13	1		10.14	4	
4506005	P62140	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB	Cytoplasm							1	10.13	1	1	10.13	1		10.13	1	
55961009	Q5SXN7	Serologically defined colon cancer antigen 3	SDCCAG3	Unknown							1	10.12	1							
4502027	P02768	Serum albumin	ALB	Extracellular	1	10.22	1													
21928452	Q8NH25	Seven transmembrane helix receptor		Membrane	1	10.13	1													
21928585	Q8N164	Seven transmembrane helix receptor		Membrane				1	10.10	1										
33413400	P10768	S-formylglutathione hydrolase	ESD	Vesicle							1	10.25	2							
5689381	Q9UPX8	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	SHANK2	Synapse							1	10.16	1							
63055059	A1X283	SH3 and PX domain-containing protein 2B	SH3PKD2B	Cytoplasm				2	10.18	6										
12052955	O75368	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	SH3BGRL	Nucleus							1	10.19	1							
170014703	P78314	SH3 domain-binding protein 2	SH3BP2	Nucleus										1	10.13	1				
119625391	Q5HYK7	SH3 domain-containing protein 19	SH3D19	Nucleus							1	10.13	1							
93204885	Q9BZQ2	SHC SH2 domain-binding protein 1-like protein	SHCBP1L	Unknown										1	10.14	1				
6808138	Q9HAT2	Sialate O-acetyltransferase	SIAT6	Lysosome	3	216.94	226	3	298.94	285	3	65.60	61	3	50.25	46	120.34	95	100.28	61
25009265	Q96RL6	Sialic acid-binding Ig-like lectin 11	SIGLEC11	Membrane							2	10.17	1							
23618867	Q9H9B4	Sideroflexin-1	SFXN1	Mitochondrion										3	10.16	1				
15823767	P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	ER													10.25	1		
4507217	P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	SRP9	Unknown										1	10.13	1				
51095055	A4D111	Similar to Chain , Heat-Shock Cognate 70kd Protein	LOC401308	Unknown										2	10.19	2				
51094943	A4D1A8	Similar to Piccolo protein	LOC392742	Unknown							1	10.18	1							
5902102	P62314	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	SNRPD1	Nucleus													10.15	1		
4507135	P63162	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	SNRPN	Ribosome													10.12	1		
19111164	P61957	Small ubiquitin-related modifier 2	Sumo2	Nucleus										2	10.13	2				
115545511	Q05AH5	SNTG2 protein	SNTG2	Unknown	1	10.14	1													
15072487	Q14524	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	SCN5A	Membrane				1	10.11	1				1	10.17	1				
4321647	Q9UQD0	Sodium channel protein type 8 subunit alpha	SCN8A	Membrane				1	10.17	1										
71051572	Q4G0N8	Sodium/hydrogen exchanger 10	SLC9A10	Membrane													10.21	1		
14211919	Q96T83	Sodium/hydrogen exchanger 7	SLC9A7	Golgi apparatus	1	10.15	1													
45504369	Q71RS6	Sodium/potassium/calcium exchanger 5	SLC24A5	Membrane							1	10.15	1							
21361181	P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	Membrane										1	10.13	1				
4502271	P50993	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	ATP1A2	Membrane	3	20.24	2							3	19.53	3				
1359715	P13637	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	ATP1A3	Membrane										2	15.18	2				
4502277	P05026	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	ATP1B1	Membrane										2	10.10	1				
22760727	Q9H2H9	Sodium-coupled neutral amino acid transporter	SLC38A1	Membrane	1						1	10.13	1							
22760539	Q8NCC2	Solute carrier family 2	SLC2A6	Membrane										3	10.14	2		10.15	2	

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
3387905	P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	SLC2A1	Membrane							2	30.22	8	1	10.17	2				
13540547	O95528	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 10	SLC2A10	Membrane	1	10.12	1													
94721257	Q9BXS9	Solute carrier family 26 member 6	SLC26A6	Membrane							1	10.14	1							
119585453	-	solute carrier family 38, member 3, isoform CRA_a		Membrane															10.15	1
158258847	Q7Z614	Sorting nexin-20	SNX20	Cytoplasm							1	10.11	1							
23396861	Q14515	SPARC-like protein 1	SPARCL1	Synapse				1	10.13	1										
115298659	P02549	Spectrin alpha chain, erythrocyte	SPTA1	Cytoskeleton							3	311.65	89	3	36.21	4				
6298842	Q01082	Spectrin beta chain, brain 1	SPTBN1	Cytoskeleton	1	20.17	3				3	10.20	1							
17369320	Q9NRC6	Spectrin beta chain, brain 4	SPTBN5	Cytoskeleton							1	12.21	1							
67782319	P11277	Spectrin beta chain, erythrocyte	SPTB	Cytoskeleton							3	206.98	41	3	32.84	4				
119573202	-	spectrin, alpha, erythrocytic 1		Cytoskeleton							1	10.14	1							
126091042	Q08648	Sperm-associated antigen 11B	SPAG11B	Extracellular										1	10.13	1				
25777713	P63208	S-phase kinase-associated protein 1	SKP1	Nucleus							1	10.24	1							
5902076	Q07955	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SRSF1	Nucleus															10.14	1
4506901	P84103	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SRSF3	Nucleus										2	10.16	3			20.17	3
20521844	Q12770	Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein	SCAP	ER										1	12.13	1				
53831991	P08842	Steryl-sulfatase	STS	Lysozyme	1	10.13	1													
24234688	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	Mitochondrion										1	10.13	1				
4507343	P25103	Substance-P receptor	TACR1	Membrane				1	10.14	1										
4507149	P00441	Superoxide dismutase	SOD1	Cytoplasm	3	13.55	2				1	10.19	2							
36535	P00441	Superoxide dismutase	SOD1	Unknown											3	10.18	3			
2443363	Q14543	Suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	Unknown										1	10.18	1				
11415040	Q9Y5Y6	Suppressor of tumorigenicity protein 14	ST14	Membrane							1	18.14	2							
19924099	P17600	Synapsin-1	SYN1	Synapse															10.16	1
42476325	Q05940	Synaptic vesicular amine transporter	SLC18A2	Vesicle															10.16	1
18765733	P60880	Synaptosomal-associated protein 25	SNAP25	Synapse	3	10.21	2													
21753104	Q96C24	Synaptotagmin-like protein 4	SYTL4	Synapse				1	10.13	1										
21362912	Q15079	Syntaxin	SNPH	Synapse										1	10.15	1				
4507297	P61764	Syntaxin-binding protein 1	STXBP1	Synapse	2	10.15	2													
161728632	-	T cell receptor beta variable 24		Unknown							1	10.13	1							
11359908	-	T46340 hypothetical protein DKFZp434B0814.1 - human		Unknown				1	10.18	1										
20520997	Q9Y4G6	Talin-2	TLN2	Cytoskeleton	1	10.24	1												10.22	1
33667044	Q7Z7G0	Target of Nesh-SH3	ABI3BP	Unknown							1	10.15	2							
21327701	Q82804	TATA-binding protein-associated factor 2N	TAF15	Nucleus							1	10.29	1	3	13.50	2			10.19	2
5730081	Q16650	T-box brain protein 1	TBR1	Nucleus										1	10.13	1				
47419907	Q15119	T-box transcription factor TBX3	TBX3	Nucleus	1	10.17	1													
62087782	Q59GK8	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 variant	TIAM1	Cytoplasm							1	10.15	1						10.17	3
5453603	P78371	T-complex protein 1 subunit beta	CCT2	Cytoplasm							1	10.22	1							
38455427	P50991	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	Cytoplasm							1	10.23	2							
24307939	P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	Cytoplasm	1	10.13	1				2	10.18	1							
48762932	P50990	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	Cytoplasm							1	10.16	1							
4502643	P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A	Cytoplasm							1	10.24	2							
8924256	Q8WUU5	T-complex protein 11 homolog	TCP11	Cytoplasm										1	10.12	1				
1842130	Q99857	Tenascin-C		Unknown							2	10.11	2							
16550300	Q5VYS8	Terminal uridylyltransferase 7	ZCCHC6	Unknown										1	10.16	1				
5712304	Q01534	Testis-specific Y-encoded protein 1	TSPY1	Cytoplasm															10.16	1
4507541	Q43657	Tetraspanin-6	TSPAN6	Membrane	1	10.17	1													
21265104	P41732	Tetraspanin-7	TSPAN7	Membrane											3	10.23	5		10.23	1
21693130	Q7Z4L5	Tetratricopeptide repeat protein 21B	TTC21B	Membrane				1	10.14	1										
50592994	P10599	Thioredoxin	TXN	Cytoplasm							1	10.19	2	2	10.15	2				
19923362	P04216	Thy-1 membrane glycoprotein	THY1	Membrane	2	10.17	2													
4507431	Q10587	Thyrotroph embryonic factor	TEF	Nucleus							1	10.14	1							

**TABELLA A**

GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
					Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
1212992	Q8WZ42	Titin	TTN	Cytoplasm																
439839	P42081	T-lymphocyte activation antigen CD86	CD86	Membrane							1	10.13	1							
61966741	Q6NT89	TMF-regulated nuclear protein	TRNP1	Nucleus							1	10.14	1							
28278261	Q86TK2	TNKS1BP1 protein	TNKS1BP1	Unknown							1	10.13	1							
6912724	Q9Y6L7	Tolloid-like protein 2	TLL2	Extracellular																
50058787	-	TPA: diacylglycerol O-acyltransferase 2 like protein		Unknown							1	10.15	3				10.13	1		
33186798	-	TPA: DNA-damage inducible protein 2		Unknown							1	10.23	2							
43918524	-	TPA: TPA inf. olfactory receptor OR11-150		Unknown	1	10.10	1													
55741807	Q9UKE5	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	TNIK	Unknown													10.18	1		
5803187	P37837	Transaldolase	TALDO1	Unknown																
14249718	Q969E4	Transcription elongation factor A protein-like 3	TCEAL3	Nucleus							1	10.20	2							
20070130	P20290	Transcription factor BTF3	BTF3	Nucleus																
1592738	Q15329	Transcription factor E2F5	E2F5	Nucleus							1	10.11	1				10.25	2		
1616942	Q92664	Transcription factor IIIA	GTF3A	Nucleus							1	10.16	1							
35493878	Q01201	Transcription factor RelB	RELB	Nucleus													1	10.15	1	
4507161	P35716	Transcription factor SOX-11	SOX11	Nucleus	1	10.14	1													
6689861	Q9UN79	Transcription factor SOX-13	SOX13	Nucleus				1	10.11	1										
5032007	Q00577	Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA	Nucleus																
4758300	P11308	Transcriptional regulator ERG	ERG	Nucleus							1	10.21	2				3	16.79	2	
21218438	Q8WX19	Transcriptional repressor p66-beta	GATAD2B	Nucleus													1	10.13	2	
157384982	Q04726	Transducin-like enhancer protein 3	TLE3	Nucleus							1	10.15	1							
37433	P02786	Transferrin receptor protein 1	TFRC	Vesicle				1	10.10	1										
10835049	P61586	Transforming protein RhoA	RHOA	Cytoskeleton							1	10.17	1							
21314671	Q8TD43	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4	TRPM4	Membrane				1	10.14	1										
6005942	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	ER	1	10.19	1	1	10.17	1	3	16.90	6							
4507521	P29401	Transketolase	TKT	Cytoplasm	1	20.27	4				1	10.30	2				1	10.15	1	
1170499	P46199	Translation initiation factor IF-2, mitochondrial	MTIF2	Mitochondrion	1	10.19	1													
21389589	Q7Z404	Transmembrane channel-like protein 4	TMC4	Membrane							1	10.14	1							
4505405	Q14956	Transmembrane glycoprotein NMB	GNMB	Melanosome	2	10.14	1	1	10.13	1	3	10.30	4				2	10.12	3	
7023829	Q9NUM4	Transmembrane protein 106B	TMEM106B	Membrane	2	10.19	2	3	16.83	4										
154816184	Q8GT03	Transmembrane protein 55B	TMEM55B	Lysosome							1	10.22	2							
33187717	Q8WW56	Transporter	SLC6A13	Membrane				1	10.13	1										
148746195	Q07283	Trichohyalin	TCHH	Cytoskeleton	1	18.17	1													
862457	P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	Mitochondrion	1	10.16	1													
84029363	Q96RS0	Trimethylguanosine synthase	TGS1	Cytoplasm																
4507645	P60174	Triosephosphate isomerase	TPH1	Cytoplasm							3	26.88	5				3	16.86	3	
3043558	Q9C040	Tripartite motif-containing protein 2	TRIM2	Unknown																
2408232	Q14773	Tripeptidyl-peptidase 1	PPP1	Lysosome	3	109.61	39	3	186.97	75	3	22.85	4				1	10.18	1	
186972143	P29144	Tripeptidyl-peptidase 2	PPP2	Cytoplasm	1	10.17	1				3	32.87	8				60.27	29	40.22	
16550495	Q9BZE2	tRNA pseudouridine synthase 3	PUS3	Nucleus																
4507553	P28289	Tropomodulin-1	TMOD1	Cytoskeleton							2	10.23	2							
63252904	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	Cytoskeleton							3	10.18	1							
4507651	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	Cytoskeleton							1	10.20	1							
4506145	P07477	Trypsin-1	PRSS1	Extracellular													26.19	4		
14389309	Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Cytoskeleton	3	53.58	22	1	10.13	1	2	25.25	7				3	42.92	14	
6678467	P68368	Tubulin alpha-4A chain	Tuba4a	Cytoskeleton													1	10.16	3	
4507729	Q13885	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	Cytoskeleton	3	13.51	2										3	20.19	4	
5174735	P68371	Tubulin beta-2C chain	TUBB2C	Cytoskeleton	2	10.14	2													
50592996	Q13509	Tubulin beta-3 chain	TUBB3	Cytoskeleton							1	10.15	1				1	10.20	2	
21361322	P04350	Tubulin beta-4 chain	TUBB4	Cytoskeleton	3	46.91	10				1	30.21	5				3	30.24	5	
10433717	Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain	TUBB6	Cytoskeleton													1	10.16	2	
5419859	Q9Y4R7	Tubulin monoglycylase TTL3	TTL3	Cytoskeleton																
5902018	Q94811	Tubulin polymerization-promoting protein	TPPP	Cytoskeleton							3	53.64	25				3	20.21	5	
4500539	P36941	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 3	LTBR	Membrane													1	10.13	1	

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2		
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	Score	N.peptidi
40805860	O43399	Tumor protein D54	TPD52L2	Unknown																
24308073	Q9H3S7	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	PTPN23	Vesicle	3	10.17	4							2	10.15	2				
24431950	O43172	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	PRPF4	Nucleus										1	10.13	1				
34535137	Q81YU4	Ubiquitin-like protein	UBQLNL	Cytosol							1	10.13	1							
4507761	P62988	Ubiquitin	RPS27A	Cytosol	1	10.19	2	1	10.15	1	3	31.56	10	3	43.54	11	38.23	78	10.11	1
4827050	P54578	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	USP14	Cytosol							1	20.22	2							
1122278	P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	Lysosome							1	20.17	3				10.19	1		
21361091	P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	Cytosol	1	10.17	1										10.18	2		
4507789	P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3	Cytosol							3	12.92	2							
4507793	P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	Cytosol							1	10.21	2							
31543906	Q7Z7E8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1	UBE2Q1	Cytosol				1	10.15	1										
4507795	Q13404	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	UBE2V1	Cytosol							1	10.23	2							
23510338	P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	Cytosol							2	15.24	3							
986881	P41226	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	UBA7	Cytosol	2	10.17	2													
5032211	P78381	UDP-galactose translocator	SLC35A2	Golgi apparatus							1	10.11	1							
57770468	Q67FW5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein 1	B3GNTL1	Unknown				1	10.17	1										
31377618	Q9HAW9	UDP-glucuronosyltransferase 1-8	UGT1A8	ER							1	10.16	1							
37181957	Q3SY77	UDP-glucuronosyltransferase 3A2	UGT3A2	Membrane				2	10.21	2										
28207933	Q86TW2	Uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 1	ADCK1	Extracellular				1	10.17	1				1	10.10	1				
24899178	Q5VVN6	Uncharacterized protein C10orf18	FAM208B	Uncharact.Prot.							1	10.16	1							
21758899	Q9BV29	Uncharacterized protein C15orf57	C15orf57	Uncharact.Prot.							1	10.11	1							
24308410	Q9BSF4	Uncharacterized protein C19orf52	C19orf52	Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
34785527	Q6PEX7	Uncharacterized protein C1orf223	ATPAF1-AS1	Membrane							1	10.11	1							
25089995	Q8NFU9	Uncharacterized protein C21orf81	C21orf81	Uncharact.Prot.							1	10.11	1							
13376109	Q7Z624	Uncharacterized protein C2orf34	CAMKMT	Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
1843386	P78312	Uncharacterized protein C4orf8	FAM193A	Uncharact.Prot.							1	10.15	1							
89274175	A5D8W1	Uncharacterized protein C7orf63	C7orf63	Uncharact.Prot.	1	10.14	1													
209954825	Q4G0Z9	Uncharacterized protein C8orf45	C8orf45	Uncharact.Prot.				1	10.14	2										
21362074	Q8NCR6	Uncharacterized protein C9orf24	C9orf24	Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
31418193	Q7Z745	Uncharacterized protein FLJ40243	HEATR7B2	Uncharact.Prot.	1	10.13	1													
34533996	Q6ZSR9	Uncharacterized protein FLJ45252	AAK1	Uncharact.Prot.													10.15	1		
6807915	Q2LD37	Uncharacterized protein KIAA1109	KIAA1109	Membrane	1	10.12	1				1	10.14	1							
6330918	Q9ULG3	Uncharacterized protein KIAA1257	KIAA1257	Uncharact.Prot.							1	10.14	2							
154426272	Q96PV7	Uncharacterized protein KIAA1931	FAM193B	Uncharact.Prot.	1	10.14	1							1	10.15	1				
29446	-	unnamed protein product		Cytoplasm							3	34.30	335	3	18.17	80	18.16	21	10.18	3
28606	-	unnamed protein product		Uncharact.Prot.										2	10.13	1				
34526063	-	unnamed protein product		Uncharact.Prot.							2	14.16	3							
34527363	-	unnamed protein product		Uncharact.Prot.							1	10.13	1							
21361837	Q9GZP4	UPF0424 protein C1orf128	PITHD1	Uncharact.Prot.							2	15.27	3	3	10.15	2				
10435053	Q5SQI0	UPF0635 protein C6orf134	ATAT1	Uncharact.Prot.							3	10.18	2				10.16	1		
105554465	Q86W67	UPF0638 protein A	C2orf84	Cytoskeleton							1	10.17	1							
4826964	P54725	UV excision repair protein RAD23 homolog A	RAD23A	Nucleus	2	15.18	3													
63025214	Q3ZAQ7	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein VMA21	VMA21	Lysosome													10.13	1		
5454158	P26640	Valyl-tRNA synthetase	VARS	Unknown										1	10.16	1				
388522	P35916	Vascular endothelial growth factor receptor 3	FLT4	Membrane	1	10.19	1													
1008913	P13611	Versican core protein	VCAN	Extracellular				1	10.10	1										
27806183	P63026	Vesicle-associated membrane protein 2	VAMP2	Vesicle										1	10.18	1				
36575	P04004	Vitronectin	VTN	Extracellular										3	18.86	5	30.22	12		
189232345	B3CJ73	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	MYC	Unknown										2	10.12	1				
4507879	P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	Mitochondrion										1	10.14	1				

TABELLA A				NM-1			NM-2			ORG-A1			ORG-A2			ORG-B1		ORG-B2	
GI number	Uniprot Entry	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.peptidi medio	Score	N.peptidi	
48146045	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	Mitochondrion													10.17	2	
4502523	Q00975	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B	CACNA1B	Synapse	1	10.14	1												
37947	P04275	von Willebrand factor	VWF	Extracellular										1	10.14	1			
18379346	Q9U1P3	VPS10 domain-containing receptor	SORCS3	Membrane										1	10.14	1			
19913428	P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	ATP6V1B2	Lysosome										2	10.19	1			
7706757	Q9Y5K8	V-type proton ATPase subunit D	ATP6V1D	Lysosome										1	10.17	1			
47717102	Q9UI12	V-type proton ATPase subunit H	ATP6V1H	Lysosome				1	10.16	1									
216548382	O94967	WD repeat-containing protein 47	WDR47	Nucleus				1	10.15	1									
6714707	P61964	WD repeat-containing protein 5	WDR5	Nucleus				1	10.13	1									
13376840	Q9GZS3	WD repeat-containing protein 61	WDR61	Unknown	1	10.16	2												
2887497	O43379	WD repeat-containing protein 62	WDR62	Unknown				1	10.11	1									
16549210	Q8IWG1	WD repeat-containing protein 63	WDR63	Unknown										2	17.13	1			
68161842	Q5VTH9	WD repeat-containing protein 78	WDR78	Unknown				1	10.15	2									
91823271	P47989	Xanthine dehydrogenase/oxidase	XDH	Peroxisome	1	10.13	1												
4837737	Q9Y2T7	Y-box-binding protein 2	YBX2	Cytoplasm										1	10.19	2			
126723060	Q9UPT8	Zinc finger CCCH domain-containing protein 4	ZC3H4	Nucleus				1	10.14	1									
5912060	Q8WYQ9	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	ZCCHC14	Nucleus	1	10.16	1												
50401753	Q7Z3T8	Zinc finger FYVE domain-containing protein 16	ZFYVE16	Nucleus													10.19	3	
40788254	Q5VZL5	Zinc finger MYM-type protein 4	ZMYM4	Nucleus	1	10.12	1												
184343	Q03924	Zinc finger protein 117	ZNF117	Nucleus				1	10.17	1							10.15	2	
55769561	P17025	Zinc finger protein 182	ZNF182	Nucleus	2	10.15	3												
36603	Q16670	Zinc finger protein 187	ZNF187	Nucleus				1	10.16	1									
12643896	Q9UL36	Zinc finger protein 236	ZNF236	Nucleus				1	10.14	1									
37574603	Q9Y2P7	Zinc finger protein 256	ZNF256	Nucleus				1	10.15	2									
3043584	O60281	Zinc finger protein 292	ZNF292	Nucleus										2	10.11	1			
6330683	Q9ULJ3	Zinc finger protein 295	ZNF295	Nucleus				1	10.14	1									
25777704	Q8TD17	Zinc finger protein 398	ZNF398	Nucleus				1	10.17	1									
119593004	-	zinc finger protein 446, isoform CRA_b		Nucleus				1	10.13	1									
74762390	Q6ZMY9	Zinc finger protein 517	ZNF517	Nucleus										1	10.13	1			
40788240	O15090	Zinc finger protein 536	ZNF536	Nucleus										1	10.15	1			
88683007	Q7Z3V5	Zinc finger protein 571	ZNF571	Nucleus	1	10.13	1												
1374698	Q14966	Zinc finger protein 638	ZNF638	Nucleus										1	10.14	1			
51491284	Q8N4W9	Zinc finger protein 808	ZNF808	Nucleus	1	10.11	1												
123701326	Q5JPB2	Zinc finger protein 831	ZNF831	Nucleus				1	10.15	1									
71891792	O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	ZZEF1	Nucleus	1	10.13	1												
10863987	Q12836	Zona pellucida sperm-binding protein 4	ZP4	Extracellular													10.13	1	

TABELLA B							NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS		
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi		
P61604	4504523	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	Mitochondrion				1	10.19	1				1	10.13	2					
P31946	4507949	14-3-3 protein beta/alpha	YWHA8	Cytoplasm				2	10.19	1											
P62258	5803225	14-3-3 protein epsilon	YWHA6	Cytoplasm	1	10.21	2	2	20.19	4											
P61983	9507245	14-3-3 protein gamma	Ywhag	Cytoplasm				1	10.14	1											
P63104	4507953	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	Cytoplasm				3	10.30	13											
P09543	180687	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	CNP	Synapse	3	13.65	4	3	10.30	2											
Q9H2F3	11545403	3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7	HSD3B7	ER				1	10.13	2											
Q96DV4	169636418	39S ribosomal protein L38, mitochondrial	MRPL38	Mitochondrion	1	10.13	1														
P62249	4506691	40S ribosomal protein S16	RPS16	Ribosome	1	10.17	1														
P60866	4506697	40S ribosomal protein S20	RPS20	Ribosome	1	10.20	1														
P62754	6677809	40S ribosomal protein S6	Rps6	Ribosome	3	10.16	1														
Q8IZH2	110624792	5'-3' exonuclease 1	XRN1	Cytoplasm				1	10.16	1											
Q8WXA8	47519867	5-hydroxytryptamine receptor 3C	HTR3C	Synapse	1	10.18	1														
P10809	31542947	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	Mitochondrion				1	20.17	2											
P63173	4506645	60S ribosomal protein L38	RPL38	Ribosome							1	20.18	4								
P11021	16507237	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	ER										1	10.15	1					
Q13510	8247915	Acid ceramidase	ASAH1	Lysosome	2	30.23	3	2	15.15	2	2	15.18	3	2	10.12	7					
P68133	4501881	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	Cytoskeleton	3	30.20	4	3	28.90	9				1	10.17	11	2	45.22	9		
P60709	4501885	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	Cytoskeleton	3	13.53	3	1	10.20	2							2	10.20	3		
O14639	20522012	Actin-binding LIM protein 1	ABLIM1	Cytoskeleton	1	10.12	1														
Q562R4	62421077	Actin-like protein	ACT	Cytoskeleton				1	10.17	1											
Q8N9N2	60400556	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 1	ASCC1	Cytoskeleton										1	10.14	1					
P07108	120433590	Acyl-CoA-binding protein	DBI	Unknown				1	10.17	3											
Q43506	60845382	ADAM 20	ADAM20	Membrane				1	10.13	1											
-	119631214	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 mot		Membrane				2	10.18	2											
Q8NFM4	24497587	Adenylate cyclase type 4	ADCY4	Membrane				1	10.16	2											
P00568	4502011	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	Cytoplasm													2	25.15	6		
P62330	4502211	ADP-ribosylation factor 6	ARF6	Golgi apparatus				1	10.11	1											
Q9UJY4	7021541	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2	GGA2	Golgi apparatus				1	10.15	1											
Q81VW1	62088268	ADP-ribosylation factor-like protein 17	ARL17A	Golgi apparatus				1	10.22	1											
-	6165620	AF097535_1 membrane protein CH1		Uncharact.Prot.										1	10.13	1					
-	33319078	AF471267_1 Ig heavy chain variable region, VH3 family		Uncharact.Prot.	1	10.12	1														
-	33319156	AF471306_1 Ig heavy chain variable region, VH3 family		Uncharact.Prot.				1	10.12	1											
P55196	3452574	Afadin	MLLT4	Membrane	2	10.18	2														
O00468	54873613	Aggrin	AGRN	Extracellular	1	10.18	1														
Q9Y2D5	6005709	A-kinase anchor protein 2	AKAP2	Unknown	3	10.22	1														
Q99996	22538387	A-kinase anchor protein 9	AKAP9	Synapse				1	10.15	1											
-	28595	aldolase A protein		Cytoplasm				1	10.15	1											
O00116	4501993	Alkylidihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	AGPS	Peroxisome				2	10.16	1											
P78461	183805	Alpha-1 thalassemia globin gene.		Cytoplasm							1	10.20	1								
P01023	112911	Alpha-2-macroglobulin	A2M	Extracellular				1	10.16	1											
O43707	2804273	Alpha-actinin-4	ACTN4	Nucleus				3	13.51	4											
P02511	4503057	Alpha-crystallin B chain	CRYAB	Cytoplasm	1	10.17	1														
P06733	4503571	Alpha-enolase	ENO1	Cytoplasm				3	23.49	3											
-	219430	alpha-fetoprotein enhancer binding protein		Unknown													1	10.15	1		
P06280	178246	Alpha-galactosidase A	GLA	Lysosome				1	10.14	1				1	10.23	11					
Q16706	974734	Alpha-mannosidase 2	MAN2A1	Golgi apparatus				1	10.18	1											
P17050	4557781	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	NAGA	Lysosome										1	10.19	1					
Q9BVH7	13569938	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5	ST6GALNAC5	Golgi apparatus				1	10.13	1											
Q96196	7243041	Alpha-protein kinase 3	ALPK3	Nucleus	1	10.13	1														
Q15699	154813201	ALX homeobox protein 1	ALX1	Nucleus				1	10.20	1											
Q49A62	71297324	AMT protein	AMT	Cytoplasm	1	10.13	1														
O15123	4557315	Angiotensin-2	ANGPT2	Extracellular							1	10.22	1								
P01019	4557287	Angiotensinogen	AGT	Extracellular	2	10.18	5	2	10.18	6											
P04083	4502101	Annexin A1	ANXA1	Nucleus	1	10.17	2														

**TABELLA B**

Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS		
					Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
O95994	5453541	Anterior gradient protein 2 homolog	AGR2	Extracellular															
P46013	1451819	Antigen KI-67	MKI67	Nucleus				1	10.13	1									
-	32698868	antimicrobial peptide RY2G5		Unknown	1	10.15	1												
P05090	4502163	Apolipoprotein D	APOD	Extracellular	3	26.84	4	3	26.85	8	3	16.83	4	2	15.16	9			
P02649	4557325	Apolipoprotein E	APOE	Extracellular	3	10.19	3												
O14791	21735616	Apolipoprotein L1	APOL1	Extracellular	1	10.13	1												
Q8WWN8	21264337	Art-GAP, Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 3	ARAP3	Cytoskeleton	1	10.16	1												
Q9P2R6	8096340	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein	RERE	Nucleus	1	10.15	1												
Q9BXP5	192807332	Arsenite-resistance protein 2	SRRT	Cytoplasm	3	10.19	3												
O00327	2094739	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1	ARNTL	Nucleus							1	10.15	1						
P15848	825628	Arylsulfatase B	ARSB	Lysosome	3	26.85	3	3	43.52	9	3	33.49	6	2	30.16	26			
P17174	4504067	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	Cytoplasm				1	10.14	1									
P48201	4502301	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial	ATP5G3	Mitochondrion				3	13.52	2	3	26.88	5						
P25705	4757810	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPSA1	Mitochondrion	2	10.15	1	1	20.18	3									
P06576	28940	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPSB	Mitochondrion	2	10.21	2	3	20.20	3									
P36542	50345988	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATPSC1	Mitochondrion	1	10.13	1												
Q9UII2	7705927	ATPase inhibitor, mitochondrial	ATPIF1	Mitochondrion				3	10.14	1									
Q86UQ4	31657092	ATP-binding cassette sub-family A member 13	ABCA13	Membrane	1	10.16	1												
O60706	3127175	ATP-binding cassette transporter sub-family C member 9	ABCC9	Membrane	1	10.18	1												
Q9UNQ0	62526033	ATP-binding cassette, sub-family G, member 2	ABCG2	Membrane													1	10.12	1
P13010	10863945	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	XRCC5	Nucleus	1	20.25	3												
Q86XP3	45446743	ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42	Nucleus				1	10.15	1									
A5YM72	7243169	ATP-grasp domain-containing protein 1	CARNS1	Unknown							1	10.12	1						
Q4LE39	6599196	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	ARID4B	Nucleus				1	10.21	1									
Q03989	47078224	AT-rich interactive domain-containing protein 5A	ARID5A	Nucleus				1	10.12	1									
P98160	11602963	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	Extracellular	3	34.24	5												
Q9UL32	6456033	Bcl-2 related ovarian killer	BOK	Nucleus				1	10.12	1									
Q9NYF8	7661958	Bcl-2-associated transcription factor 1	BCLAF1	Nucleus	3	10.18	2												
P32121	21757343	Beta-arrestin-2	ARRB2	Nucleus	1	10.15	3												
P07686	4504373	Beta-hexosaminidase subunit beta	HEXB	Lysosome	2	10.16	3												
Q86Z14	28376633	Beta-klotho	KLB	Membrane				1	10.13	1									
Q8N3L3	55583953	Beta-taxilin	TXLNB	Cytoplasm				1	10.16	1									
Q14032	4502351	Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase	BAAT	Cytoplasm							3	10.14	2						
Q58A63	62148934	BNIP2 motif-containing molecule at the C-terminal region 1		Cytoplasm				1	18.17	1									
P12645	179506	Bone morphogenetic protein 3	BMP3	Extracellular				1	10.15	1									
P54687	16551604	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic	BCAT1	Cytoplasm				1	10.14	1									
-	13469731	breast cancer antigen NY-BR-1.1		Unknown													1	10.10	1
P38398	6552299	Breast cancer type 1 susceptibility protein	BRCA1	Nucleus				1	10.15	1									
B7ZKU7	219521497	Breast carcinoma amplified sequence 3	BCAS3	Nucleus	1	10.12	1												
Q9NRL2	7920301	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	BAZ1A	Nucleus	1	10.22	3												
Q9BZH6	13324688	Bromodomain and WD repeat-containing protein 2	WDR11	Membrane	1	10.24	1												
-	119602320	BTB		Membrane	1	10.17	1												
Q9P203	31874701	BTB/POZ domain-containing protein 7	BTBD7	Membrane	1	10.13	1												
Q96CX2	19923973	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	KCTD12	Membrane	1	10.16	1												
O94833	18157651	Bullous pemphigoid antigen 1, isoforms 6/9/10		Cytoskeleton	1	10.15	1												
Q49AP7	71296973	C1orf212 protein	C1orf212	Unknown	1	10.10	1												
Q4LE82	68533033	C4A variant protein	C4A	Extracellular	3	23.54	6												
Q96NX5	14196445	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1G	CAMK1G	Cytoplasm				3	10.14	1	1	10.15	2	1	10.15	3			
P62158	825635	Calmodulin	CALM1	Cytoskeleton	2	10.16	1												
P27797	4757900	Calreticulin	CALR	ER				1	10.19	4									
POC2W7	113431005	Cancer/testis antigen 47.13	CT47B1	Unknown	1	10.15	1						1	10.17	1				
Q9UKL3	6912288	CASP8-associated protein 2	CASP8AP2	Nucleus				1	10.13	1									
P55211	14790124	Caspase-9	CASP9	Cytoplasm							1	10.15	5						



TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
P35222	4503131	Catenin beta-1	CTNNB1	Nucleus	3	20.24	4												
O60716	146231940	Catenin delta-1	CTNND1	Nucleus	1	10.13	1												
P07858	4503139	Cathepsin B	CTSB	Lysosome	3	46.32	18	3	170.32	163	3	166.27	119	2	113.22	91	2	70.22	24
O6LAF9	3929733	Cathepsin B	CTSB	Lysosome							3	19.58	14	2	10.25	14	1	10.13	2
P07339	4503143	Cathepsin D	CTSD	Lysosome	3	50.29	11	3	26.87	5	3	40.21	12						
P07711	4503155	Cathepsin L1	CTSL1	Lysosome				3	20.23	6	3	16.83	7	2	15.16	9	2	15.14	3
Q9UBR2	22538442	Cathepsin Z	CTSZ	Lysosome	3	26.84	12	3	30.22	18	3	33.54	19	2	20.19	40	2	20.17	6
A5YK6	31873819	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	CNOT1	Unknown							1	10.13	1						
Q5VV42	7020375	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1	CDKAL1	Membrane							1	10.15	1						
Q9NWG8	7021851	cDNA FLJ10035 fis, clone HEMBA1000919	ATG16L1	Uncharact.Prot.	1	10.13	1												
		cDNA FLJ11426 fis, clone HEMBA1001059,																	
Q9HAL1	10432682	highly similar to Human N-acetylglucosamine 6-sulphatase	GALNS	Lysosome	2	10.22	3	3	20.19	3	1	10.14	1	2	15.19	14			
		cDNA FLJ13143 fis, clone NT2RP3003230, highly similar to Coronin-1C	CORO1C	Uncharact.Prot.	1	10.14	1												
Q9H868	10436199	cDNA FLJ13916 fis, clone Y79AA1000342,		Nucleus				1	10.13	1	1	12.16	1						
Q9H7Y1	10436476	cDNA FLJ14101 fis, clone MAMMA1000859	STEAP3	Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
Q6ZP94	34526321	CDNA FLJ26204 fis, clone ADC07455		Uncharact.Prot.							1	10.11	1						
Q6ZNN8	34528163	CDNA FLJ27420 fis, clone WMC07143		Ribosome	1	10.13	1												
B3KNS9	193786158	cDNA FLJ30326 fis, clone BRACE2007174, highly similar to Zinc finger protein 250	ZNF250	Nucleus	1	10.13	1												
Q8N9Y7	21752231	cDNA FLJ36056 fis, clone TEST12018476, weakly similar to ZINC FINGER PROTEIN 29	ZSCAN29	Nucleus				1	10.13	1									
Q8N7K6	21758244	cDNA FLJ40946 fis, clone UTERU2009435	CASC4	Uncharact.Prot.				1	10.19	1									
Q6ZU60	34532264	cDNA FLJ43978 fis, clone TEST14018555		Uncharact.Prot.	1	10.18	1												
B4DDK8	194375648	cDNA FLJ52119	THBS1	Uncharact.Prot.	1	10.13	1												
B4DYL8	194379628	cDNA FLJ54894, weakly similar to Dentin sialophosphoprotein	KIAA1107	Uncharact.Prot.				1	10.15	1									
B4DRP7	194387892	cDNA FLJ55154	C1orf112	Uncharact.Prot.				1	10.17	1									
B4DVD3	194375065	cDNA FLJ55299, highly similar to RNA exonuclease 1 homolog	REXO1	Nucleus	1	10.11	1												
B4DIP7	194380812	cDNA FLJ57114, highly similar to Niemann-Pick C1 protein	NPC1	Lysosome							1	10.14	1						
		cDNA FLJ59457, highly similar to																	
B4DDI7	194375606	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	FDXR	Mitochondrion				1	10.15	1									
B4DIU2	194381300	cDNA FLJ60046, highly similar to Coronin-1B	CORO1B	Uncharact.Prot.				1	10.14	1									
B4DWI2	194376966	cDNA FLJ60925, highly similar to ATP-binding cassette transporter sub-family C member 11	ABCC11	Membrane				1	10.13	1									
B4DYJ1	194379574	cDNA FLJ60965, highly similar to Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	TACC3	Uncharact.Prot.	1	10.18	1												
Q8N2D7	22761740	cDNA PSEC0233 fis, clone HEMBA1006813		Uncharact.Prot.							1	10.13	1						
B2RBM8	189054502	cDNA, FLJ95596, highly similar to Homo sapiens activity-dependent neuroprotector	ADNP	Nucleus	1	10.20	2												
O00311	4502715	Cell division cycle 7-related protein kinase	CDC7	Nucleus	1	10.13	1												
Q9NX58	49065522	Cell growth-regulating nuclear protein	LYAR	Nucleus	1	10.13	1												
Q6UJF3	34596115	Central open reading frame		Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
Q9NSP4	13129022	Centromere protein M	CENPM	Nucleus				1	10.17	1									
P23435	4757922	Cerebellin-1	CBLN1	Synapse	3	33.53	7	3	66.90	28	3	46.91	41	2	20.18	9	2	30.20	10
Q8IU8K	32698861	Cerebellin-2	CBLN2	Synapse				3	16.88	3	3	13.54	5						
-	4502807	chromogranin B precursor		Unknown				1	10.17	1									
-	119627721	chromosome 1 open reading frame 122, isoform CRA_d		Uncharact.Prot.	1	10.14	1												
-	119601186	chromosome 14 open reading frame 39, isoform CRA_a		Uncharact.Prot.							1	10.17	1						
Q0V9F6	29421206	Cingulin-like protein 1	CGNL1	Cytoskeleton		10.14	1												
Q9HAW4	21735569	Claspin	CLSPN	Nucleus				1	10.17	1									
Q6FIF6	49065366	CLDN12 protein	CLDN12	Membrane				1	10.11	1									
Q16630	871299	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	Nucleus	2	15.20	3												

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
O75122	197304653	CLIP-associating protein 2	CLASP2	Golgi apparatus															
P10909	42740907	Clusterin	CLU	Extracellular	1	10.17	2	1	10.13	1									
Q13057	110227601	coenzyme A synthase isoform a	COASY	Unknown													1	10.14	1
P23528	5031635	Cofilin-1	CFL1	Nucleus				3	13.56	8									
Q9Y281	14719392	Cofilin-2	CFL2	Nucleus										1	10.13	1			
Q9UL16	20139283	Coiled-coil domain-containing protein 19	CCDC19	Mitochondrion				1	10.15	1									
Q9H8E5	10435800	Coiled-coil domain-containing protein 69.	CCDC69	Unknown				1	10.11	1									
-	3288487	COL1A1 and PDGFB fusion transcript		Extracellular	3	56.25	52				1	10.23	6						
-	3288499	COL1A1 and PDGFB fusion transcript		Extracellular	2	15.13	2												
P02452	1418928	Collagen alpha-1	COL1A1	Extracellular	2	30.18	4												
P02462	21466080	Collagen alpha-1	COL4A1	Extracellular	3	30.23	4												
P12109	30032	Collagen alpha-1	COL6A1	Extracellular	1	10.14	1												
P08123	30023	Collagen alpha-2	COL1A2	Extracellular	3	10.17	1				1	10.19	2						
P08572	29551	Collagen alpha-2	COL4A2	Extracellular	3	25.50	3												
P12111	3127926	Collagen alpha-3	COL6A3	Extracellular	3	13.55	2												
Q9BXJ2	13994280	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 7	C1QTNF7	Extracellular	1	10.14	1												
Q07021	4502491	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1QBP	Mitochondrion				1	10.20	1									
Q8WVH0	10436331	Complexin-3	CPLX3	Synapse	1	10.14	1												
Q9UQ52	7657361	Contactin-6	CNTN6	Membrane	1	10.13	1												
P12277	21536286	Creatine kinase B-type	CKB	Cytoplasm				2	30.19	5				1	10.12	11			
P04080	4503117	Cystatin-B	CSTB	Nucleus				3	13.53	3	2	20.20	6						
P01034	4503107	Cystatin-C	CST3	Extracellular	2	10.14	2												
P21291	4758086	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	Nucleus	1	10.15	1										2	28.14	3
P52943	4503049	Cysteine-rich protein 2	CRIP2	Unknown															
P13569	90421313	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	CFTR	Membrane				1	10.20	1				1	10.12	1			
P99999	11128019	cytochrome c	CYCS	Mitochondrion													1	10.14	2
P10635	30451	Cytochrome P450 2D6	CYP2D6	ER	1	10.13	1												
Q02928	158937242	Cytochrome P450 4A11	CYP4A11	ER	1	10.15	1												
Q13409	24307879	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DYNC1I2	Cytoskeleton				1	10.17	1				1	10.19	11			
Q8NDL9	118421091	Cytosolic carboxypeptidase-like protein 5	AGBL5	Nucleus	1	10.12	1												
Q96KP4	15620780	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	Cytoplasm	1	10.19	1												
Q43175	23308577	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	Unknown	1	10.16	1												
Q8NEU8	21707123	DCC-interacting protein 13-beta	APPL2	Nucleus	1	10.19	1												
Q14185	4503355	Dedicator of cytokinesis protein 1	DOCK1	Membrane	1	10.12	1												
O75064	71891699	DENN domain-containing protein 4B	DENND4B	Unknown	1	10.15	1	2	10.14	1									
Q92874	4503347	Deoxyribonuclease-1-like 2	DNASE1L2	Extracellular				1	10.16	1									
O00115	1905907	Deoxyribonuclease-2-alpha	DNASE2	Lysosome	1	10.17	1	2	15.18	2	3	16.84	4	1	10.18	1	2	30.20	5
P15924	1147813	Desmoplakin	DSP	Cytoskeleton				1	10.17	1									
P60981	5802966	Destrin	DSTN	Cytoskeleton				2	10.15	1									
P52824	40806175	Diacylglycerol kinase theta	DGKO	Cytoplasm	3	13.51	2												
Q16555	4503377	Dihydropyrimidinase-related protein 2	DPYSL2	Cytoskeleton	3	50.24	12	3	40.22	8									
Q9UHL4	15080291	Dipeptidyl-peptidase 2	DPP7	Lysosome	3	26.92	8												
Q6PJP8	73620749	DNA cross-link repair 1A protein	DCLRE1A	Nucleus							1	10.15	1						
Q16531	2632123	DNA damage-binding protein 1	DDB1	Nucleus	2	10.19	2												
Q9UHC1	13878584	DNA mismatch repair protein Mlh3	MLH3	Nucleus										1	10.13	1			
P52701	2662381	DNA mismatch repair protein Msh6	MSH6	Nucleus				1	10.14	1									
P09884	106507301	DNA polymerase alpha catalytic subunit	POLA1	Nucleus							1	10.16	1						
O15315	28375587	DNA repair protein RAD51 homolog 2	RAD51B	Nucleus				1	10.13	1									
P49736	1232077	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	Nucleus				1	10.15	1									
Q2KHR2	121946796	DNA-binding protein RFX7	RFX7	Nucleus				1	10.13	1									
Q9NQL9	8745331	Doublesex- and mab-3-related transcription factor 3	DMRT3	Nucleus				1	10.18	2									
Q9UJU6	21361670	Drebrin-like protein	DBNL	Cytoskeleton	3	16.87	2												
Q9NR20	28827774	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 4	DYRK4	Unknown										1	10.09	1			
O00399	5730116	Dynactin subunit 6	DCTN6	Cytoskeleton	1	10.17	1												
Q9UFH2	6102880	Dynein heavy chain 17, axonemal	DNAH17	Cytoskeleton				1	10.16	1									

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
Q9Y4J8	13626507	Dystrobrevin alpha	DTNA	Synapse				1	10.13	1									
Q86Y13	40788325	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	DZIP3	Cytoplasm				1	10.13	1									
O95071	71891755	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	Cytoplasm				1	10.14	1									
P15502	31874660	Elastin	ELN	Extracellular	3	20.23	3										1	10.12	1
O9Y6R3	4877552	Electrogenic Na+ bicarbonate cotransporter	NBC	Membrane				1	10.13	1									
Q9BW60	7023042	Elongation of very long chain fatty acids protein 1	ELOVL1	ER				1	10.11	1									
O9Y6C2	5901944	EMILIN-1	EMILIN1	Extracellular	1	10.17	1												
Q9NR46	55961144	Endophilin-B2	SH3GLB2	Nucleus	3	10.12	2												
Q96DNO	22748703	Endoplasmic reticulum resident protein ERp27	ERP27	ER				1	10.14	1									
Q96AP7	148664205	Endothelial cell-selective adhesion molecule	ESAM	Membrane	3	10.31	4												
Q96BJ8	30913103	Engulfment and cell motility protein 3	ELMO3	Cytoskeleton				1	10.14	1									
-	729422	ENO1B_HUMAN Alpha-enolase, lung specific	Unknown	Unknown				1	10.15	1									
Q4VY17	66347210	EPAB	C20orf119	Nucleus	1	10.18	1												
-	33359686	ephni A4 isoform b	Unknown	Unknown													1	10.13	1
P61916	5453678	Epididymal secretory protein E1	NPC2	Lysosome				3	10.20	2	1	10.12	1						
Q9UGP6	3980313	Epsilon COP	Unknown	Vesicle				1	10.13	1									
B0KYV4	86756027	Ets family transcription factor ELF2C	ELF2	Unknown				1	10.12	1									
Q96S40	15146354	Excision repair protein 1	ERCC1	Nucleus				1	10.11	1									
Q96A65	82546830	Exocyst complex component 4	EXOC4	Vesicle	1	10.14	1												
Q9GZZ8	15187164	Extracellular glycoprotein lactinin	LACRT	Extracellular	1	10.15	1												
P15311	31283	Ezrin	EZR	Cytoskeleton				1	10.23	2									
-	119612775	family with sequence similarity 98, member B, isoform	Unknown	Unknown				1	10.15	1									
Q92945	2055427	Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	Nucleus	3	13.54	2												
P49327	67476453	Fatty acid synthase	FASN	Lysosome				3	46.90	15									
Q86XK2	5912201	F-box only protein 11	FBXO11	Nucleus	1	10.13	1	2	10.13	7									
Q6PLJ6	10503978	F-box only protein 38	FBXO38	Nucleus				1	10.17	1									
Q8N3Y1	37537802	F-box/WD repeat-containing protein 8	FBXW8	Nucleus							1	10.13	1						
O94868	40788358	FCH and double SH3 domains protein 2	FCHSD2	Unknown							1	10.14	1						
P02794	56682959	Ferritin heavy chain	FTH1	Cytoplasm	3	63.55	14	1	20.14	2	1	10.16	1						
P02792	20149498	Ferritin light chain	FTL	Cytoplasm	3	16.89	6	3	30.23	10	3	30.22	11	2	10.21	14	2	15.19	6
P35555	1335064	Fibrillin-1	FBN1	Extracellular	1	10.14	1												
P02671	4503689	Fibrinogen alpha chain	FGA	Extracellular	1	10.15	2												
P02675	70906435	Fibrinogen beta chain	FBG	Extracellular	2	10.15	1												
P02679	70906439	Fibrinogen gamma chain	FGG	Extracellular	1	10.14	2												
Q59FR9	62088360	Fibroblast growth factor 11 variant	FGF11	Unknown	1	10.14	1												
P02751	31397	Fibronectin	FN1	Extracellular	2	10.16	2												
Q5D862	62122917	Filaggrin-2	FLG2	Unknown				1	10.13	1	2	20.25	3						
P21333	28243	Filamin-A	FLNA	Cytoskeleton	1	10.20	1												
Q02790	4503729	FK506-binding protein 4	FKBP4	Nucleus				1	10.21	2									
Q8TEM4	18676544	FLJ00169 protein	FLJ00169	Uncharact. Prot.	1	10.14	1												
Q8NF22	21748606	FLJ00380 protein	FLJ00380	Uncharact. Prot.							1	10.13	1						
Q13642	109132400	Four and a half LIM domains protein 1	FHL1	Cytosol										1	10.12	1			
P09972	312137	Fructose-bisphosphate aldolase C	ALDOC	Cytoskeleton				1	10.17	1									
-	119602592	fuse-binding protein-interacting repressor, isoform	Unknown	Unknown	1	10.14	1												
Q9BQS8	157738667	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1	FYCO1	Unknown							1	10.11	1						
P54803	1730191	Galactocerebrosidase	GALC	Lysosome	2	10.26	2												
P07320	13377002	Gamma-crystallin D	CRYGD	Cytosol				1	10.12	1	1	10.13	1						
P09104	5803011	Gamma-enolase	ENO2	Cytoplasm	1	10.13	1	3	13.49	2									
Q92820	4503987	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	Lysosome	3	67.58	19	3	202.93	118	3	141.61	118	2	90.22	105	1	10.18	1
P17900	31853	Ganglioside GM2 activator	GM2A	Lysosome							1	10.21	1						
P17302	4504001	Gap junction alpha-1 protein	GJA1	Membrane				1	10.13	1									
P48165	55953076	Gap junction alpha-8 protein	GJA8	Membrane				1	10.16	1									
P06396	4504165	Gelsolin	GSN	Cytoskeleton				1	10.14	2									
P07093	24307907	Glia-derived nexin	SERPINE2	Extracellular				1	10.17	1				2	20.18	18	1	10.17	1
P14136	4503979	Glial fibrillary acidic protein	GFAP	Cytoskeleton	3	38.93	8	3	80.26	22	1	10.14	1						
P49448	31815	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	GLUD2	Mitochondrion	2	10.16	1	1	10.20	1									
Q96QG5	15028907	Glutamate receptor 7	GRIK3	Synapse	1	10.14	1												
Q9H0J4	14149793	Glutamine-rich protein 2	QRICH2	Unknown							1	10.12	1						
P22352	2160390	Glutathione peroxidase 3	GPX3	Extracellular				1	10.13	1									

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
P00390	93278663	Glutathione reductase, mitochondrial	GSR	Mitochondrion				1	10.16	1									
P04406	7669492	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Cytoplasm				3	57.01	59	1	10.23	2						
P13807	31542868	Glycogen [starch] synthase, muscle	GYS1	Nucleus				1	10.19	1									
Q08378	30089940	Golgin subfamily A member 3	GOLGA3	Golgi apparatus							1	10.16	1						
Q5KU20	57157123	G-protein coupled receptor	KPG_008	Membrane				1	10.12	1									
Q9UHL9	7705387	GTF2I repeat domain containing 1 isoform 1	GTF2IRD1	Unknown													1	10.11	1
P09471	162461738	Guanine nucleotide-binding protein G	GNAO1	Nucleus				1	10.17	1									
O75343	14916977	Guanylate cyclase soluble subunit beta-2	GUCY1B2	Cytoplasm	1	10.14	1												
-	119632126hCG14576	isoform CRA_a		Uncharact.Prot.							1	10.12	1						
-	119609297hCG1642354			Uncharact.Prot.	1	10.14	1												
D3DRW8	119606427hCG1643971	isoform CRA_a	hCG_1643971	Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
-	119632110hCG1644968			Uncharact.Prot.				1	10.15	1									
-	119625788hCG1648150			Uncharact.Prot.				1	10.12	1									
-	119620541hCG1784313	isoform CRA_d		Uncharact.Prot.													1	10.11	1
-	119607903hCG1784735	isoform CRA_a		Uncharact.Prot.	1	10.15	1												
-	119595839hCG1790590			Uncharact.Prot.	1	10.12	1												
-	119597534hCG1796601			Uncharact.Prot.	1	10.17	2												
-	119574123hCG1801795			Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
-	119619424hCG18053			Uncharact.Prot.				1	10.15	1									
-	119597552hCG1806822			Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
-	119613078hCG1808534			Uncharact.Prot.				2	10.14	1									
-	119581544hCG1808619			Uncharact.Prot.							1	12.17	1						
-	119569811hCG1818116			Uncharact.Prot.							1	10.12	1						
-	119607500hCG1818384			Uncharact.Prot.	1	10.12	1												
-	119606719hCG1820399			Uncharact.Prot.										1	10.11	11			
-	119570614hCG1990246			Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
-	119568272hCG2030186			Uncharact.Prot.							1	10.17	1						
-	119627502hCG2036582	isoform CRA_c		Uncharact.Prot.							1	10.12	1						
-	119603895hCG2038089			Uncharact.Prot.										1	10.11	11			
-	119574494hCG2038204			Membrane							1	10.13	1						
-	119605306hCG2038294			Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
-	119600873hCG2039036			Uncharact.Prot.	3	10.15	2	1	10.15	1									
-	119574212hCG2040157			Uncharact.Prot.				1	10.22	1									
-	119608946hCG2040430			Uncharact.Prot.	1	10.10	1												
-	119600254hCG2040957			Uncharact.Prot.	1	10.13	1												
-	119616647hCG2041439			Uncharact.Prot.	2	10.18	2												
-	119578262hCG2042339			Uncharact.Prot.	1	10.18	2												
-	119593666hCG2044797	isoform CRA_a		Uncharact.Prot.	1	10.18	1												
-	119572363hCG22067			Uncharact.Prot.							2	10.16	2						
Q86TB3	148596992	heart alpha-kinase	ALPK2	Unknown				1	10.14	1									
P34931	4529894	Heat shock 70 kDa protein 1L	HSPA1L	Cytoplasm	1	10.12	1	1	10.15	2									
P04792	4504517	Heat shock protein beta-1	HSPB1	Cytoskeleton	3	20.29	7												
P07900	32488	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	Cytoplasm				3	10.18	2									
P08238	20149594	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	Cytoplasm				1	18.26	1									
P54652	13676857	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2	Cytoplasm				1	10.14	1									
Q96RW7	118572606	Hemicentin-1	HMCN1	Extracellular	1	10.13	1												
P69905	4504345	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	Cytoplasm	3	13.52	1	3	20.23	4									
P02042	4504351	Hemoglobin subunit delta	HBD	Cytoplasm	1	10.13	1	3	10.18	2									
Q59H59	62087380	Hepatocyte growth factor isoform 1 preproprotein variant	Name: HGF	Unknown				1	10.16	1									
P10265	5802819	HERV-K_5q33.3 provirus ancestral Pro protein	HERV-K	Cytoplasm	1	10.13	1												
Q9Y610	4456989	HERV-K_7p22.1 provirus ancestral Pro protein	ERVVK6	Cytoplasm				1	10.14	1									
P49312	1711240	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Hnrnpa1	Nucleus				1	10.16	2									
Q14103	929663	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	Nucleus	2	10.18	1												
P55795	9624998	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	HNRNPH2	Nucleus	1	10.21	1												
P61979	26341878	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Hnrnpk	Nucleus	2	10.13	1												
P14866	32356	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	Nucleus	1	10.16	1												
Q43390	5031755	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRNPR	Nucleus	1	10.16	2												
Q00839	32358	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU	Nucleus	3	12.24	1												
Q1KMD3	52545896	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like	HNRNPUL2	Nucleus	1	10.20	2												

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
		protein 2																	
P22626	4504447	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	Nucleus	3	13.51	2												
P07910	14249959	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	Nucleus	3	16.87	3												
P04629	56118210	High affinity nerve growth factor receptor	NTRK1	Membrane	2	10.16	1												
P09429	968888	High mobility group protein B1	HMG1	Nucleus										2	25.19	6			
O15550	2580570	Histone demethylase UTX	KDM6A	Nucleus	1	10.14	1												
P84243	4504279	Histone H3.3	H3F3A	Nucleus	1	10.14	1												
P62805	4504301	Histone H4	HIST1H4A	Nucleus				1	10.15	1									
Q8WY36	21739908	HMG box transcription factor BBX	BBX	Nucleus	1	10.13	1												
Q9H2Z4	11493712	Homeobox protein Nkx-2.4	NKX2-4	Nucleus				1	10.11	1									
Q9H2X6	11907599	Homeodomain-interacting protein kinase 2	HIPK2	Nucleus	2	10.15	2												
Q86YM7	4759198	Homer protein homolog 1	HOMER1	Synapse				1	10.13	1									
Q86YZ3	57864582	Hormerin	HRNR	Cytoskeleton				1	10.15	1	2	10.18	1						
P42858	90903231	Huntingtin	HTT	Vesicle	1	10.12	1				1	10.12	1						
P35914	62198232	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	HMGCL	Unknown										1	10.10	1			
Q4G0G9	70673347	Hypothetical LOC338797	LOC338797	Unknown	1	10.14	1												
-	12052957	hypothetical protein		Uncharact.Prot.										1	10.18	1			
-	32402050	hypothetical protein FLJ11004		Uncharact.Prot.													1	10.11	1
-	119610017	hypothetical protein FLJ35220, isoform CRA_i		Uncharact.Prot.	1	10.12	3												
-	119599630	hypothetical protein FLJ35880		Uncharact.Prot.	1	10.14	1												
-	7705775	hypothetical protein LOC51101		Uncharact.Prot.				1	10.14	1									
-	119604784	hypothetical protein MGC11271, isoform CRA_c		Extracellular							2	10.21	2						
-	32628	ICAM-3		Unknown										1	10.13	1			
P22304	4557659	Iduronate 2-sulfatase	IDS	Lysosome				3	36.90	6	3	46.92	10	2	15.20	10			
-	2905639	Ig heavy chain variable region VH1-DXP1-JH4		Immunoglobulin	1	10.18	1												
-	1864133	Ig heavy chain V-region		Immunoglobulin	1	10.14	1												
-	4995588	immunoglobulin gamma heavy chain variable region		Immunoglobulin	1	10.14	1												
-	12054072	immunoglobulin heavy chain constant region gamma 1		Immunoglobulin				3	13.48	2									
-	16033498	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin										1	10.11	1			
-	112702504	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin							1	10.13	1						
-	112699904	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin							1	10.11	1						
-	112700480	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin	1	10.13	1												
-	112699480	immunoglobulin heavy chain variable region		Immunoglobulin	2	10.14	1												
-	140064301	immunoglobulin heavy chain variable region VH3-30		Immunoglobulin							2	10.15	1						
-	21668566	immunoglobulin heavy chain VHDJ region		Immunoglobulin							1	10.10	1						
-	21669913	immunoglobulin heavy chain VHDJ region		Immunoglobulin				1	10.11	1									
-	21669975	immunoglobulin heavy chain VHDJ region		Immunoglobulin	1	10.14	1												
-	4761377	immunoglobulin lambda light chain variable region		Immunoglobulin				1	10.15	1									
-	27650785	immunoglobulin lambda light chain variable region		Immunoglobulin	1	10.15	1												
-	194719622	immunoglobulin light chain variable region		Immunoglobulin	1	10.13	1												
-	54780380	immunoglobulin mu heavy chain		Immunoglobulin				1	10.14	1									
Q8N608	67460566	Inactive dipeptidyl peptidase 10	DPP10	Unknown										1	10.14	11			
O14920	41352712	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	IKBK	Cytoplasm	1	10.13	1												
P12268	66933016	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	IMPDH2	Cytoplasm	1	10.17	1												
P24593	10834982	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP5	Extracellular	2	15.18	2												
Q96T92	15822832	Insulinoma-associated protein 2	INSM2	Nucleus	1	10.16	1												
Q96LV5	74724241	Integrator complex subunit 4-like protein 1	INTS4L1	Unknown				1	10.16	1									
-	4504753	integrin alpha 7 precursor		Unknown				1	10.14	1									
Q6UXX5	38348336	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5-like protein	ITIHL5	Extracellular	1	10.15	1												
Q14618	32727	Interferon alpha-N		Extracellular							1	10.12	1						
Q12906	1770458	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	Nucleus	2	10.25	3												
P08887	4504673	Interleukin-6 receptor subunit alpha	IL6R	Membrane				1	10.13	1									
Q8WYA0	32526901	Intraflagellar transport protein 81 homolog	IFT81	Unknown				1	10.14	2									
B3FTQ2	119614023	Islet cell autoantigen 1 isoform	ICA1	Unknown		10.10	1												
Q2TAA2	88853865	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	IAH1	Unknown										2	10.11	8			

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
P48735	872121	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	Mitochondrion				1	10.14	1									
-	60729665	JC8008 beta3-glycosyltransferase-like protein - human		Unknown				3	10.15	2	2	10.14	2	2	10.15	7	1	10.12	1
P14923	4504811	Junction plakoglobin	JUP	Membrane				1	10.13	1									
Q5BQ95	60594967	Kallikrein 13 splice variant 7	KLK13	Unknown				1	10.12	1									
-	58257721	KIAA0226 protein		Uncharact.Prot.										2	10.16	8			
-	27529712	KIAA0283		Uncharact.Prot.										1	10.13	11			
-	20521666	KIAA0820 protein		Uncharact.Prot.										1	10.11	11			
-	10047319	KIAA1621 protein		Uncharact.Prot.										1	10.13	11			
-	10047333	KIAA1628 protein		Uncharact.Prot.										1	10.11	1			
Q9BYA8	13359177	KIAA1652 protein	KIAA1652	Uncharact.Prot.													1	10.13	1
Q9BY99	13359195	KIAA1661 protein	KIAA1661	Unknown							1	10.16	1						
Q8IVT5	27469579	Kinase suppressor of Ras 1	KSR1	Membrane	1	10.12	1												
Q12756	1212917	Kinesin-like protein KIF1A	KIF1A	Synapse				1	10.15	1									
Q86VH2	30025501	Kinesin-like protein KIF27	KIF27	Cytoskeleton	1	10.13	1												
Q6NY19	34536367	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 3	KANK3	Unknown	3	10.19	2												
Q5T7N3	27552819	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4	KANK4	Cytoskeleton							1	10.23	1						
P84550	56121703	Ladybird homeobox corepressor 1	SKOR1	Nucleus				1	10.13	1									
Q2VWA4	169212816	Ladybird homeobox corepressor 1-like protein	SKOR2	Nucleus	1	10.14	1												
P02545	34228	Lamin-A/C	LMNA	Nucleus	3	16.94	3												
P42167	73760405	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	TMPO	Nucleus	1	10.19	1												
Q03252	27436951	Lamin-B2	LMNB2	Nucleus	1	10.13	1												
P25391	38788416	Laminin subunit alpha-1	LAMA1	Extracellular										1	10.14	1			
P25391	34226	Laminin subunit alpha-1	LAMA1	Extracellular	1	10.25	1												
P24043	438056	Laminin subunit alpha-2	LAMA2	Extracellular	2	37.34	7				1	10.12	2	1	10.14	2			
Q16363	68533109	Laminin subunit alpha-4	LAMA4	Extracellular	1	10.17	1												
O15230	2281044	Laminin subunit alpha-5	LAMA5	Extracellular	3	20.27	3												
P55268	1103585	Laminin subunit beta-2	LAMB2	Extracellular	3	43.61	18												
P11047	145309326	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	Extracellular	3	63.56	11												
Q659C4	10440225	La-related protein 2	LARP1B	Cytoplasm				1	10.16	1									
O75610	10337603	Left-right determination factor 1	LEFTY1	Extracellular	1	10.13	1												
Q9H3W5	153791507	Leucine-rich repeat neuronal protein 3	LRRN3	Membrane				1	10.19	1									
Q9NZU1	34577057	Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1	FLRT1	Membrane	1	16.13	1												
Q8TCA0	46397369	Leucine-rich repeat-containing protein 20	LRRC20	Unknown	1	10.13	1												
Q96M69	21389483	leucine-rich repeats and guanylate kinase domain co	LRGUK	Unknown													1	10.08	1
P29376	440855	Leukocyte tyrosine kinase receptor	LTK	Membrane	1	10.15	1												
Q14847	5453710	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1	Cytoskeleton	3	13.50	2												
Q43688	4505977	Lipid phosphate phosphohydrolase 2	PPAP2C	Membrane				1	10.11	1									
O75145	32189362	Liprin-alpha-3	PPFIA3	Membrane	1	10.16	1												
P00338	5031857	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	Cytoplasm				1	10.15	1									
P07195	4557032	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	Cytoplasm	3	10.19	2	3	16.85	4				1	10.21	15	1	10.15	1
A4D231	51094683	LOC392160	LOC392160	Unknown	1	10.13	1												
P01130	4504975	Low-density lipoprotein receptor	LDLR	Membrane				2	10.16	1									
Q9NZR2	93102379	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1b	LRP1B	Membrane	1	10.15	1												
P10253	126590	Lysosomal alpha-glucosidase	GAA	Lysosome	2	15.19	3	3	26.85	5	3	29.55	4	2	30.21	26			
O00754	2209015	Lysosomal alpha-mannosidase	MAN2B1	Lysosome							1	20.16	2						
P42785	4826940	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	Lysosome	3	33.59	14	2	10.14	2									
P40925	5174539	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	Cytoplasm				3	10.14	1									
Q9UM22	24475586	Mammalian ependymin-related protein 1	EPDR1	Lysosome	3	90.25	108	3	153.60	221	3	169.59	184	2	115.22	180	2	94.20	40
Q13724	149999606	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	MOGS	ER	1	10.11	1												
Q6ZW88	34528858	MAP6 protein	MAP6	Unknown	1	10.14	1												
Q3KQU3	20521788	MAP7 domain-containing protein 1	MAP7D1	Nucleus	2	10.14	1												
Q8IX19	27462811	Mast cell-expressed membrane protein 1	MCEMP1	Membrane	1	10.10	1												
Q5JRA6	37183299	Melanoma inhibitory activity protein 3	MIA3	Membrane	1	10.16	1												

TABELLA B					NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS		
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
Q9BY79	14149712	Membrane frizzled-related protein	MFRP	Membrane															
Q14833	4504141	Metabotropic glutamate receptor 4	GRM4	Synapse				1	10.10	1									
O00222	51095079	Metabotropic glutamate receptor 8	GRM8	Membrane							1	10.11	2						
P35625	4507513	Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	Unknown										2	10.14	9	1	10.14	2
P42898	4753778	Methylenetetrahydrofolate reductase	MTHFR	Cytoplasm	1	10.13	1												
Q861H1	27652617	MHC class I antigen	HLA-A	Cytoplasm	1	10.13	1												
-	7145102	MHC serum complement factor B	Unknown	Unknown													1	10.18	1
Q14880	4758714	Microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3	ER							1	10.18	1						
Q8NDS5	21732375	Microtubule-associated protein	DKFZp547H1810	Cytoskeleton	3	10.19	1												
P46821	1170875	Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	Cytoskeleton	1	10.14	1												
P11137	1850617	Microtubule-associated protein 2	MAP2	Cytoskeleton	3	20.23	3												
P27816	14250528	Microtubule-associated protein 4	MAP4	Cytoskeleton	1	10.17	1												
Q96JEU	14017973	Microtubule-associated protein 6	MAP6	Cytoskeleton	2	15.26	3												
P10636	8400711	Microtubule-associated protein tau	MAPT	Cytoskeleton	3	26.86	4										1	10.14	2
Q9NU22	24415404	Midasin	MDN1	Nucleus							1	10.17	4						
Q9UBX3	20149598	Mitochondrial dicarboxylate carrier	SLC25A10	Mitochondrion				1	10.12	1									
Q9Y3D6	151108473	Mitochondrial fission 1 protein	FIS1	Mitochondrion	3	20.23	3	1	10.18	1			2	10.19	2	1	10.16	12	2
O60830	5032181	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17-B	TIMM17B	Mitochondrion										2	10.24	7			
O94826	54607135	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	TOMM70A	Mitochondrion	1	10.13	1												
P28482	23881	Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Cytoskeleton	1	10.17	1	1	10.13	1									
Q9NVL2	19526767	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLT	MLTK	Cytoskeleton										1	10.12	11			
O96007	4758732	Molybdenum cofactor synthesis protein 2 large subunit	MOCS2	Cytosol	1	10.13	1												
Q8TE76	10432847	MORC family CW-type zinc finger protein 4	MORC4	Unknown	1	10.11	1												
Q9UJG1	9506543	Motile sperm domain-containing protein 1	MOSPD1	Membrane															
Q6LC01	2119276	MRNA encoding beta-tubulin.	TUBB	Cytoskeleton	3	23.55	7	3	50.29	17	1	10.13	1	1	10.17	1	1	14.19	15
Q8WXI7	74716283	Mucin-16	MUC16	Extracellular															
Q99102	10944945	Mucin-4	MUC4	Extracellular	1	10.19	1												
Q95255	7387892	Multidrug resistance-associated protein 6	ABCC6	Membrane				1	10.13	1									
Q2XP30	82548237	Mutant beta-globin	HBB	Cytoplasm	1	10.25	1												
A8W2J3	158514342	MutL-like 1 protein	MLH1	Nucleus				1	10.14	1									
P02686	68509930	Myelin basic protein	MBP	Membrane	3	174.30	57	3	210.92	102	3	106.23	77	2	75.22	84	2	159.23	117
P02689	4505909	Myelin P2 protein	PMP2	Membrane	1	10.13	1												
P60203	13591880	Myelin proteolipid protein	Plp1	Membrane				3	16.82	4									
Q13875	1408050	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	MOBP	Cytoplasm							3	10.16	2	2	19.16	12	2	10.14	1
Q16653	793839	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	MOG	Membrane				2	10.13	1									
P58340	11967975	Myeloid leukemia factor 1	MLF1	Nucleus	2	10.16	2												
Q15773	4885487	Myeloid leukemia factor 2	MLF2	Nucleus	2	10.13	1												
Q9NZM1	7305053	Myoferlin	MYOF	Membrane							1	10.15	1						
P54296	1709093	Myomesin-2	MYOM2	Cytoskeleton															
Q8LIU5	20338989	Myosin-XVIIIb	MYO18B	Cytoskeleton				1	10.17	1									
Q13496	4557896	Myotubularin	MTM1	Cytoplasm	1	10.13	1												
O95248	3916218	Myotubularin-related protein 5	SBF1	Nucleus	1	10.13	1												
Q96QG7	19923424	myotubularin-related protein 9	MTMR9	Unknown															
-	4505291	myxovirus resistance protein 1	Unknown	Unknown	2	10.19	2												
P34059	4503899	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GALNS	Lysosome	3	13.54	4	3	23.51	4	3	13.49	3	2	20.18	18			
Q4GEN5	71013702	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	NADH5	Mitochondrion				1	10.14	1									
P48163	4505143	NADP-dependent malic enzyme	ME1	Cytosol				1	10.14	1									
Q9BT67	22761723	NEDD4 family-interacting protein 1	NDFIP1	Golgi apparatus	3	10.15	1												
-	119587605	neural cell adhesion molecule 1, isoform CRA a	Unknown	Membrane															
Q8NFP9	21434743	Neurobeachin	NBEA	Golgi apparatus	1	10.14	1												
Q09666	61743954	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	Nucleus	1	10.20	2												
P07196	105990539	Neurofilament light polypeptide	NEFL	Cytoskeleton				2	10.19	2									
P07197	128147	Neurofilament medium polypeptide	NEFM	Cytoskeleton				1	10.16	1									
Q99466	55770876	Neurogenic locus notch homolog protein 4	NOTCH4	Membrane				1	10.20	3									
Q8NEJ9	111038128	Neuroguin	NGDN	Nucleus				1	10.18	1									
Q8IVL1	7022787	Neuron navigator 2	NAV2	Nucleus	2	10.22	1												

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
Q92823	51095143	Neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	Membrane	1	10.17	1	1	10.16	1									
P84074	747652	Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin	HPCA	Cytoskeleton	1	10.13	1												
P56730	4506143	Neurotropsin	PRSS12	Extracellular	1	10.17	1												
Q9NR71	76826822	Neutral ceramidase	ASAH2	Membrane				1	10.19	1									
O5J537	61098457	NHL repeat-containing protein 3	NHLRC3	Extracellular				3	13.50	2	1	10.13	11						
P14543	1155011	Nidogen-1	NID1	Extracellular	3	46.91	11												
Q14112	8928569	Nidogen-2	NID2	Extracellular	3	28.91	4												
Q00604	4557789	Norrin	NDP	Unknown							1	10.13	1						
P51688	4506919	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	SGSH	Lysosome	1	10.18	1	3	33.54	8	3	23.50	3	2	20.19	17			
Q16236	20149576	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	NFE2L2	Nucleus	1	10.14	1												
Q14980	35121	Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	Nucleus	1	10.14	1												
P35658	29653	Nuclear pore complex protein Nup214	NUP214	Nucleus	1	10.15	1												
Q14686	6470129	Nuclear receptor coactivator 6	NCOA6	Nucleus				1	10.15	1									
Q9BSC4	171460958	Nucleolar protein 10	NOL10	Nucleus							1	10.13	1						
P19338	55956788	Nucleolin	NCL	Nucleus	3	16.92	2												
Q16625	4505487	Occludin	OCLN	Membrane	1	10.14	1												
P47884	7144628	Olfactory receptor 1D4	OR1D4	Membrane	2	10.23	2												
Q8NH8C	53793690	Olfactory receptor 2T6	OR2T6	Membrane				1	10.17	1									
Q9H344	52317265	Olfactory receptor 51I2	OR51I2	Membrane	1	10.13	1												
Q8NGH9	52353252	Olfactory receptor 52E4	OR52E4	Membrane	1	10.15	1												
Q8NGV6	38372777	Olfactory receptor 5H6	OR5H6	Membrane							3	10.20	2	1	10.18	11			
Q96RD1	52353943	Olfactory receptor 6C1	OR6C1	Membrane										1	10.13	11			
Q9GZM6	50897292	Olfactory receptor 8D2	OR8D2	Membrane							1	10.15	1						
Q8NGB2	74760242	OR4C5_HUMAN RecName: Full=Olfactory receptor 4C5; AltName	OR4C5	Unknown													1	10.13	1
Q9H2J7	33354281	Orphan sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter NTT73	SLC6A15	Synapse							1	10.10	1						
Q9Y236	4757890	Oxidative stress-induced growth inhibitor 2	OSGIN2	Unknown	1	12.16	0												
P50897	4506031	Palmitoyl-protein thioesterase 1	PPT1	Lysosome	3	46.98	20	3	46.91	27	3	60.22	28	2	25.26	45	2	20.18	5
Q9BXP8	10639043	Pappalysin-2	PAPPA2	Extracellular				1	10.14	1									
O75475	19923653	PC4 and SFRS1-interacting protein	PSIP1	Nucleus	1	10.14	1												
Q9NR12	11496885	PDZ and LIM domain protein 7	PDLIM7	Cytoskeleton	2	10.16	1												
O43692	7705676	Peptidase inhibitor 15	PI15	Extracellular	1	10.13	1												
P17742	6679439	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Ppia	Cytoplasm													1	20.20	3
P62937	10863927	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	Cytoplasm				2	10.21	2									
P62942	4503725	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	FKBP1A	Cytoplasm				1	10.16	1									
Q06830	4505591	Peroxiredoxin-1	PRDX1	Cytoplasm	1	10.13	1										1	10.16	2
P32119	32189392	Peroxiredoxin-2	PRDX2	Cytoplasm				1	10.14	1									
P30041	4758638	Peroxiredoxin-6	PRDX6	Lysosome				1	10.19	1									
Q08426	68989263	Peroxisomal bifunctional enzyme	EHHADH	Peroxisome	1	10.16	1												
A5PKW4	24899186	PH and SEC7 domain-containing protein 1	PSD	Cytoplasm	1	10.14	1												
Q86VZ5	29789379	Phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransferase 1	SGMS1	Golgi apparatus	1	10.10	1												
P30086	4505621	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	Cytoplasm				1	10.24	1									
P42356	2326227	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	PI4KA	Golgi apparatus				1	10.16	1									
Q0VAA5	23397570	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C X domain-containing protein 2	PLCXD2	Cytoplasm				1	10.14	1									
P00558	4505763	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	Cytoplasm	2	10.16	1												
Q8IV08	1575347	Phospholipase D3	PLD3	ER	3	33.65	23	3	36.97	18	3	66.96	30	2	40.26	51	1	20.15	3
P36969	825667	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	Cytoplasm	3	10.18	3												
Q9H4Z3	18034767	Phosphorylated CTD-interacting factor 1	PCIF1	Unknown										1	10.13	1			
-	49258202	pim-3 oncogene		Unknown				1	10.11	1									
Q15149	1477646	Plectin-1	PLEC	Cytoskeleton	3	16.86	2												
Q9Y4D7	3327054	Plexin-D1	PLXND1	Membrane							1	10.12	11						
Q9BPZ3	75677349	poly	PAIP2	Unknown													1	10.16	1
Q9H074	17511255	poly	PAIP1	Unknown													1	10.14	2
Q460N5	6331213	Poly	PARP14	Nucleus				1	10.24	1									
Q9UKK3	27529698	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	PARP4	Nucleus	1	10.15	1												



TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS						
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi			
Q8TDX9	19923084	Polycystic kidney disease protein 1-like 1	PKD1L1	Membrane				1	10.13	1												
O95259	4504831	potassium voltage-gated channel, subfamily H, member	KCNH1	Unknown													1	10.11	1			
-	119577511	POU domain, class 2, transcription factor 2, isoform		Unknown										1	10.11	11						
Q5TYW8	74746677	PRAME family member 3	PRAMEF3	Unknown							1	10.15	1									
O75626	25008939	PRDM1_HUMAN RecName: Full=PR domain zinc finger protein	PRDM1	Unknown													1	10.11	1			
-	114665857	PREDICTED: enolase 3		Cytoplasm				1	10.16	1												
-	169170255	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.													1	10.13	1			
-	113425445	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.				1	10.12	1	1	10.12	1									
-	169217349	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.							1	10.13	1									
-	169161622	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.				1	10.15	1												
-	169211022	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.				1	10.15	1												
-	169172087	PREDICTED: hypothetical protein		Uncharact.Prot.				1	10.10	1												
-	169217663	PREDICTED: hypothetical protein isoform 1		Cytoskeleton				1	10.14	1												
-	89058790	PREDICTED: hypothetical protein isoform 2		Uncharact.Prot.										1	10.15	1						
-	109083408	PREDICTED: SEC23-related protein A		Uncharact.Prot.													1	10.13	1			
-	169213772	PREDICTED: similar to actin alpha 1 skeletal mu		Uncharact.Prot.										1	10.13	1						
-	88942898	PREDICTED: similar to beta-actin		Uncharact.Prot.													2	15.15	0			
-	169165471	PREDICTED: similar to cartilage-associated prot		Uncharact.Prot.				1	10.14	1												
-	73996135	PREDICTED: similar to Coatomer zeta-1 subunit		Uncharact.Prot.				1	10.13	1												
-	169188957	PREDICTED: similar to deleted in malignant brai		Uncharact.Prot.				1	10.13	1												
-	113422292	PREDICTED: similar to glycolipid transfer protein		Uncharact.Prot.				2	10.15	1												
-	169173186	PREDICTED: similar to hCG1643218		Uncharact.Prot.				2	10.14	2												
-	169167464	PREDICTED: similar to hCG1645384		Uncharact.Prot.										1	10.13	1						
-	114595419	PREDICTED: similar to kappaB DNA binding protei		Nucleus				2	10.13	1	1	16.13	1	1	10.09	11						
-	169176427	PREDICTED: similar to KIF27B		Uncharact.Prot.				1	10.13	1												
-	169169902	PREDICTED: similar to lipoprotein Lp		Uncharact.Prot.				1	10.16	1												
-	114686282	PREDICTED: similar to OTTHUMP00000028797 isofor		Uncharact.Prot.				1	10.13	1												
-	169213856	PREDICTED: similar to Peptidase D		Uncharact.Prot.				1	10.15	1												
-	113413249	PREDICTED: similar to RIKEN cDNA C230030N03		Uncharact.Prot.				1	18.14	1												
-	73961079	PREDICTED: similar to Tropomyosin alpha 3 chain		Cytoskeleton				2	10.14	1												
P11464	129661	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 1	PSG1	Extracellular				1	10.14	1												
P07602	11386147	Proactivator polypeptide [Cleaved into: Saposin-A,B,C,D]	PSAP	Lysosome				3	10.27	9	3	16.82	7	3	26.81	15	2	20.14	17	1	10.20	6
Q96159	39725683	Probable asparaginyl-tRNA synthetase, mitochondrial	NARS2	Mitochondrion				1	10.12	1												
Q15751	74706598	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	HERC1	Cytosol				1	10.13	1				1	10.13	12	2	10.12	3			
Q8N9H8	21753501	Probable exonuclease mut-7 homolog	EXD3	Nucleus				1	10.11	1												
O75879	4758894	Probable glutamyl-tRNA	PET112	Mitochondrion				3	10.13	1												
Q9BZJ8	15428322	Probable G-protein coupled receptor 61	GPR61	Membrane				1	10.15	1				1	10.16	11	2	10.13	1			
Q7Z6M3	31565567	Probable mast cell antigen 32 homolog	MILR1	Membrane				1	10.16	1	1	10.15	1									
Q9Y2G3	62632750	Probable phospholipid-transporting ATPase IF	ATP11B	Membrane				1	10.13	1												
O75110	47077805	Probable phospholipid-transporting ATPase IIA	ATP9A	Membrane				1	10.12	1												
A2RTX5	16553656	Probable threonyl-tRNA synthetase 2, cytoplasmic	TARSL2	Cytoplasm				1	10.13	1												
Q9BWW7	47117620	Probable tubulin polyglutamylase TTL2	TTL2	Cytoskeleton				1	10.10	1												
P41222	32171249	Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS	ER				3	10.21	2												
Q8VIF2	24899202	Protein AHNAK2	AHNAK2	Nucleus				1	10.14	1												
Q9Y4X5	5262864	Protein ariadne-1 homolog	ARIH1	Cytoplasm							2	10.15	1									
Q9UPA5	3928704	Protein bassoon	BSN	Synapse				3	12.82	2												
Q3B7T3	78174317	Protein BEAN	BEAN1	Membrane										1	10.15	11						
Q96RK0	14794910	Protein capicua homolog	CIC	Nucleus				3	10.15	3												
Q8TCG1	7959315	Protein CIP2A	KIAA1524	Membrane							1	10.20	1									
O75629	21754713	Protein CREG1	CREG1	Extracellular				2	10.15	1	3	10.22	4	2	25.19	8						
P30101	1208427	Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	ER				2	10.17	2												
Q99497	31543380	Protein DJ-1	PARK7	Mitochondrion				3	10.20	2												

TABELLA B			NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS		
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	
O95990	6005924	Protein FAM107A	FAM107A	Nucleus	3	10.18	2										
Q8NFC6	20521884	Protein FAM44A	BOD1L	Nucleus				1	10.16	1							
Q8NAN2	38348384	Protein FAM73A	FAM73A	Membrane							1	10.13	1				
P54198	21536485	Protein HIRA	HIRA	Nucleus							1	10.13	1				
Q8NG48	7022708	Protein Lines homolog 1	LINS	Unknown	1	10.11	1										
Q8WVF1	21758574	Protein OSCP1	OSCP1	Membrane							1	10.11	1				
Q9UD71	21735492	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B	PPP1R1B	Cytoplasm	3	13.62	5				1	10.16	1				
Q9P258	29789090	Protein RCC2	RCC2	Nucleus	2	10.18	2							2	66.21	20	
P08702	4506773	Protein S100-A9	S100A9	Nucleus							1	10.20	1				
Q9HCD6	29421204	Protein TANC2	TANC2	Cytoskeleton							1	10.14	1				
O95785	4389513	Protein Wiz	WIZ	Nucleus	3	10.15	1										
P21980	39777597	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	Mitochondrion	1	20.18	4										
P22061	180637	Protein-L-isoaspartate	PCMT1	ER	2	10.12	1										
Q8TDW7	148886692	Protocadherin Fat 3	FAT3	Membrane	1	10.12	1										
Q6V0I7	38195903	Protocadherin Fat 4	FAT4	Membrane	1	10.15	1										
Q9Y5G0	14270505	Protocadherin gamma-B5	PCDHGB5	Membrane				1	10.15	1							
Q6V1P9	7019889	Protocadherin-23	DCHS2	Membrane	1	10.16	1										
P56703	13540477	Proto-oncogene protein Wnt-3	WNT3	Extracellular	1	10.14	1										
Q58EX7	55742734	Puratrophin-1	PLEKHG4	Cytoplasm	1	10.13	1										
A6NMB9	116292174	Putative fidgetin-like protein 2	FIGNL2	Unknown	1	10.12	1										
Q3YEC7	14042363	Putative GTP-binding protein Parf	PARF	Nucleus	2	10.17	2										
Q58FF8	61104911	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2	HSP90AB2P	Cytoplasm				3	10.21	2							
Q8NH8P	27734917	Putative phospholipase B-like 2	PLBD2	Lysosome	2	15.19	2	3	30.20	7	3	23.50	6	2	10.13	7	
Q8IXJ9	29570782	Putative Polycorn group protein ASXL1	ASXL1	Nucleus	1	10.13	1										
Q2V820	82791473	Putative uncharacterized protein		Uncharact.Prot.	1	10.15	1										
Q8WZ27	18027334	Putative uncharacterized protein	FLJ13197	Uncharact.Prot.				1	10.13	1							
A2RQF4	206725424	Putative uncharacterized protein		Uncharact.Prot.				1	10.10	1							
Q3ZM64	57864791	Putative uncharacterized protein		Uncharact.Prot.				1	10.14	1							
Q8NDQ0	21733016	Putative uncharacterized protein DKFZp434i2129	CKLFSF7	Uncharact.Prot.				1	10.13	1							
Q68CP0	51491277	Putative uncharacterized protein DKFZp686B2325	DKFZp686B2325	Uncharact.Prot.	1	10.13	1										
Q7Z3M0	31873449	Putative uncharacterized protein DKFZp686M1993	DKFZp686M1993	Uncharact.Prot.	2	10.15	2										
Q68DL4	51476432	Putative uncharacterized protein DKFZp781J211	DKFZp781J211	Uncharact.Prot.							1	10.08	1				
Q4ZG76	62630194	Putative uncharacterized protein TANK	TANK	Uncharact.Prot.							1	10.16	1				
O00764	4505701	Pyridoxal kinase	PDXK	Cytoplasm	3	26.89	5										
Q9NVS9	8922498	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase	PNPO	Cytoplasm				2	10.17	1							
P14618	33286418	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	Cytoplasm				3	43.57	13							
Q75250	3342737	R26660_2	C19orf36	Unknown							1	10.14	1				
Q9Y3T6	4866449	R3H and coiled-coil domain-containing protein 1	R3HCC1	Unknown	1	10.14	1										
Q9Y2K5	40789017	R3H domain-containing protein 2	R3HDM2	Nucleus	1	10.14	1										
P31150	4503971	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GD1I	Cytoplasm				1	10.16	1							
Q14699	577299	Raftlin	RFTN1	Membrane				1	10.15	1	2	10.13	1				
Q5U651	38570105	Ras-interacting protein 1	RASIP1	Golgi apparatus	1	10.15	1										
P51153	4506363	Ras-related protein Rab-13	RAB13	Vesicle							1	10.18	2				
Q9H0U4	13569962	Ras-related protein Rab-1B	RAB1B	Vesicle										1	10.11	1	
P28827	32456	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu	PTPRM	Membrane	1	10.18	1										
A4DOP9	27436938	Reelin	ER		1	10.15	1										
Q5VT52	20521059	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2	RPRD2	Unknown				1	10.12	1							
Q9HAU5	11693132	Regulator of nonsense transcripts 2	UPF2	Nucleus				1	10.16	1							
Q8N122	22094987	Regulatory-associated protein of mTOR	RPTOR	Cytosol	1	10.13	1										
Q6XPR3	171916097	Repetin	RPTN	Extracellular							1	10.17	1				
Q7Z5J4	21740232	Retinoic acid-induced protein 1	RAI1	Nucleus	1	10.14	1										
P52565	36038	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI1	Cytoskeleton	1	10.16	2										
Q96PE2	21361458	Rho guanine nucleotide exchange factor 17	ARHGEF17	Cytoplasm				1	10.13	1							
Q15052	22027525	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	ARHGEF6	Cytoplasm				2	10.15	1							
Q9BST9	62739181	Rhotekin	RTKN	Cytoplasm							1	10.12	1				
O00584	5231228	Ribonuclease T2	RNASET2	Extracellular	1	10.18	1	2	15.16	2							
Q99575	13124451	Ribonucleases P/MRP protein subunit POP1	POP1	Nucleus				1	10.10	1							
P62280	4506681	ribosomal protein S11	RPS11	Unknown										1	10.10	1	

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS					
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi		
Q9UK32	7657526	Ribosomal protein S6 kinase alpha-6	RPS6KA6	Ribosome	1	10.19	1														
Q43567	6005864	RING finger protein 13	RNF13	Nucleus				2	10.12	1											
Q8IUD6	37655167	RING finger protein 135	RNF135	Unknown	1	10.13	1														
Q96CM3	74731354	RNA pseudouridylylase synthase domain-containing protein 4	RPUSD4	Nucleus	1	10.14	1														
Q5T8P6	10436925	RNA-binding protein 26	RBM26	Nucleus	1	10.14	1														
P35637	4826734	RNA-binding protein FUS	FUS	Nucleus	3	16.91	3														
Q6IA98	48146631	RNPC4 protein	RNPC4	Unknown										1	10.12	11					
-	346130	S31667 lq heavy chain V region - human	Unknown	Unknown	1	10.14	1														
-	119593940	SAPS domain family, member 2, isoform CRA_c	Unknown	Unknown				1	10.19	1											
Q86VB7	312142	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	CD163	Membrane				1	10.15	1											
Q12765	30923294	Secernin-1	SCRN1	Vesicle	1	10.12	1														
-	119597383	sema domain, immunoglobulin domain	Unknown	Unknown	1	10.19	1														
Q9NTN9	13633937	Semaphorin-4G	SEMA4G	Membrane	2	10.13	1														
Q9BQF6	12697959	Sentrin-specific protease 7	SEN7	Nucleus				1	10.15	1											
Q9UHD8	6683815	Septin-9	SEPT9	Cytoskeleton	3	10.15	2														
Q13501	4505571	Sequestosome-1	SQSTM1	Nucleus	1	10.15	1														
Q8IYB3	42542379	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1	Nucleus	1	10.20	1				1	10.15	1								
Q9BXM7	14165272	Serine/threonine-protein kinase PINK1, mitochondrial	PINK1	Mitochondrion				1	10.15	1											
Q13523	3043596	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	PRPF4B	Nucleus	2	10.21	2														
Q9H4A3	41688795	Serine/threonine-protein kinase WNK1	WNK1	Cytoplasm	1	10.13	2														
Q9Y2T4	11643585	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B gamma isoform	PPP2R2C	Cytoplasm	1	10.18	1														
Q96P63	17998551	Serpin B12	SERPINB12	Unknown										1	10.14	11		2	10.15	1	
P02768	4502027	Serum albumin	ALB	Extracellular				1	10.22	1											
Q8N164	21928585	Seven transmembrane helix receptor	Unknown	Membrane							1	10.10	1								
Q8NH25	21928452	Seven transmembrane helix receptor	Unknown	Membrane				1	10.13	1											
A1X283	63055059	SH3 and PX domain-containing protein 2B	SH3PXD2B	Cytoplasm				2	10.18	6				1	10.18	16		1	10.19	2	
Q9Y3A5	28416940	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein	SBDS	Unknown															1	10.10	1
Q9HAT2	6808138	Sialate O-acetyltransferase	SIAE	Lysosome	3	118.97	124	3	216.94	226	3	298.94	285	2	178.25	281		1	10.21	2	
Q5RBX7	197099116	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	Cytoplasm	1	10.17	2														
Q05AH5	115545511	SNTG2 protein	Unknown	Unknown				1	10.14	1											
Q9Y6M7	74721539	Sodium bicarbonate cotransporter 3	SLC4A7	Membrane	1	10.15	1														
Q14524	15072487	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	SCN5A	Membrane							1	10.11	1								
Q9UQD0	4321647	Sodium channel protein type 8 subunit alpha	SCN8A	Membrane							1	10.17	1								
Q96T83	14211919	Sodium/hydrogen exchanger 7	SLC9A7	Golgi apparatus				1	10.15	1											
Q92911	2887405	Sodium/iodide cotransporter	SLC5A5	Membrane	1	10.17	1														
P05023	21361181	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	Membrane	2	10.21	2														
P50993	4502271	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	ATP1A2	Membrane				3	20.24	2								2	25.20	8	
Q01959	4507041	Sodium-dependent dopamine transporter	SLC6A3	Synapse	1	20.20	5														
O95528	13540547	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 10	SLC2A10	Membrane				1	10.12	1											
-	119571172	solute carrier family 38, member 5, isoform CRA_c	Unknown	Membrane	2	10.17	1														
Q9BX66	13650131	Sorbin and SH3 domain-containing protein 1	SORBS1	Membrane	3	10.16	2														
Q9Y5W8	3882147	Sorting nexin-13	SNX13	Unknown	1	10.15	1														
Q14515	23396861	SPARC-like protein 1	SPARCL1	Synapse							1	10.13	1								
Q01082	62988842	Spectrin beta chain, brain 1	SPTBN1	Cytoskeleton	3	20.34	4	1	20.17	3											
Q07955	5902076	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	SRSF1	Nucleus	3	16.80	2														
P84103	4506901	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SRSF3	Nucleus	3	13.48	3														
Q13247	20127499	Splicing factor, arginine/serine-rich 6	SRSF6	Nucleus	3	13.49	1														
Q16629	72534660	Splicing factor, arginine/serine-rich 7	SRSF7	Nucleus	1	10.13	1														
P23246	4826998	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	Nucleus	3	10.17	1														
P08842	53831991	Steryl-sulfatase	STS	Lysosome				1	10.13	1											
P25103	4507343	Substance-P receptor	TACR1	Membrane							1	10.14	1								
P00441	4507149	Superoxide dismutase	SOD1	Cytoplasm				3	13.55	2											
Q4LDE5	22761192	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and	SVEP1	Extracellular	1	10.14	1														

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
		pentraxin domain-containing protein 1																	
P17600	19924099	Synapsin-1	SYN1	Synapse	3	23.60	11										2	25.15	4
Q7L0J3	216548223	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	SV2A	Synapse	1	10.13	1												
O5VXT5	105554421	Synaptophysin-like protein 2	SYPL2	Synapse	1	10.13	1												
P60880	18765733	Synaptosomal-associated protein 25	SNAP25	Synapse	1	10.19	2	3	10.21	2									
Q96C24	21753104	Synaptotagmin-like protein 4	SYTL4	Synapse							1	10.13	1						
P61764	4507297	Syntaxin-binding protein 1	STXBP1	Synapse	2	25.18	3	2	10.15	2									
-	161729030	T cell receptor beta variable 30		Unknown	1	10.13	1												
-	11359908	T46340 hypothetical protein DKFp434B0814.1 - human		Unknown							1	10.18	1						
Q9Y4G6	20520997	Talin-2	TLN2	Cytoskeleton				1	10.24	1									
Q82804	21327701	TATA-binding protein-associated factor 2N	TAF15	Nucleus	2	10.16	2												
Q96F92	15079344	TAZ protein	TAZ	Unknown	1	10.17	1												
O15119	47419907	T-box transcription factor TBX3	TBX3	Nucleus				1	10.17	1									
Q59GK8	62087782	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 variant	Name: TIAM1	Cytoplasm	1	10.14	1												
P48643	24307939	T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	Cytoplasm				1	10.13	1									
Q8N4U5	22749517	T-complex protein 11-like protein 2	TCP11L2	Cytoplasm	1	10.11	1												
P22105	9087217	Tenascin-X	TNXB	Extracellular	1	10.16	1												
Q9HBL0	11275669	Tensin-1	TNS1	Membrane	3	10.19	2												
Q43657	4507541	Tetraspanin-6	TSPAN6	Membrane				1	10.17	1									
Q7Z4L5	21693130	Tetratricopeptide repeat protein 21B	TTC21B	Membrane				1	10.14	1									
Q6PF05	16554235	Tetratricopeptide repeat protein 23-like	TTC23L	Unknown	1	10.11	1												
P19447	4557563	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPB subunit	ERCC3	Nucleus	1	10.13	1												
O43396	4759274	Thioredoxin-like protein 1	TXNL1	Unknown										1	10.13	11			
P04216	19923362	Thy-1 membrane glycoprotein	THY1	Membrane				2	10.17	2									
Q9Y2W1	167234419	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	Nucleus	2	10.14	2												
Q07157	116875767	Tight junction protein ZO-1	TJP1	Membrane	3	36.90	7												
O00463	11321603	TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	Unknown										2	10.14	6			
Q9H0E2	6048243	Toll-interacting protein	TOLLIP	Cytoplasm	2	10.20	2												
-	43918524	TPA: TPA_inf: olfactory receptor OR11-150		Unknown				1	10.10	1									
P05412	4758616	Transcription factor AP-1	JUN	Nucleus										2	10.13	6	2	20.19	6
P35716	4507161	Transcription factor SOX-11	SOX11	Nucleus				1	10.14	1									
Q9UN79	6689861	Transcription factor SOX-13	SOX13	Nucleus							1	10.11	1						
Q00577	5032007	Transcriptional activator protein Pur-alpha	PURA	Nucleus	2	10.27	2												
P02786	37433	Transferrin receptor protein 1	TFRC	Vesicle							1	10.10	1						
Q9U115	56549135	Transgelin-3	TAGLN3	Unknown	2	10.19	1												
O75762	3287188	Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1	TRPA1	Membrane	1	10.13	1												
Q8TD43	21314671	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4	TRPM4	Membrane							1	10.14	1						
Q9NQA5	17505200	transient receptor potential cation channel, subfam	TRPV5	Unknown													1	10.14	1
P55072	6005942	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	ER				1	10.19	1	1	10.17	1						
P29401	4507521	Transketolase	TKT	Cytoplasm	1	20.27	4												
P46199	1170499	Translocation initiation factor IF-2, mitochondrial	MTIF2	Mitochondrion	1	10.19	1												
Q14956	4505405	Transmembrane glycoprotein NMB	GNPMB	Melanosome	1	10.26	2	2	10.14	1	1	10.13	1	1	10.14	1			
Q9NUM4	7023829	Transmembrane protein 106B	TMEM106B	Membrane	2	10.19	2	3	16.83	4									
Q6UX40	34101276	Transmembrane protein 107	TMEM107	Membrane										1	10.10	1			
Q96B42	6807704	Transmembrane protein 18	TMEM18	Membrane	1	10.12	1												
Q8WW56	33187717	Transporter	SLC6A13	Membrane				1	10.13	1									
Q07283	148746195	Trichohyalin	TCHH	Cytoskeleton				1	18.17	1									
P40939	862457	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	Mitochondrion				1	10.16	1									
O14773	2408232	Tripeptidyl-peptidase 1	PPP1	Lysosome	3	56.92	21	3	109.61	39	3	186.97	75	2	83.27	75	1	10.15	1
P29144	186972143	Tripeptidyl-peptidase 2	PPP2	Cytoplasm				1	10.17	1									
A6NHL2	13376181	Tubulin alpha chain-like 3	TUBAL3	Cytoskeleton	1	10.11	1												
Q9BQE3	14389309	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	Cytoskeleton	3	40.25	13	3	53.58	22	1	10.13	1	2	15.23	13	1	20.19	6
Q13885	4507729	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	Cytoskeleton				3	13.51	2									
P68371	5174735	Tubulin beta-2C chain	TUBB2C	Cytoskeleton				2	10.14	2									

TABELLA B				NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS			
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
Q13509	50592996	Tubulin beta-3 chain	TUBB3	Cytoskeleton	1	10.13	1												
P04350	21361322	Tubulin beta-4 chain	TUBB4	Cytoskeleton	3	26.89	5	3	46.91	10									
P99024	7106439	Tubulin beta-5 chain	Tubb5	Cytoskeleton	3	10.18	1												
O94811	5902018	Tubulin polymerization-promoting protein	TPPP	Cytoskeleton	3	90.28	33										2	10.13	2
O5QJ74	38946312	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	TBCEL	Cytoskeleton	1	10.11	1												
O9GZM7	14042811	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	TINAGL1	Extracellular	1	10.12	1												
P23510	4507603	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4	TNFSF4	Membrane	1	10.13	1												
P43489	4507579	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4	TNFRSF4	Membrane	1	10.15	1												
O43399	40805860	Tumor protein D54	TPD52L2	Unknown				3	10.25	4									
P16422	218505670	Tumor-associated calcium signal transducer 1	EPCAM	Membrane	1	10.15	1												
Q9H3S7	24308073	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	PTPN23	Vesicle				2	10.17	3									
O60507	4507665	tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1	Unknown													1	10.08	1
Q9UHD9	6563288	Ubiquitin-2	UBQLN2	Cytosol	1	10.14	1												
P62988	4507761	Ubiquitin		Cytosol	3	40.28	23	1	10.19	2	1	10.15	1				2	10.17	2
P09936	21361091	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	Cytosol				1	10.17	1									
Q7Z7E8	31543906	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1	UBE2Q1	Cytosol							1	10.15	1						
P22314	23510338	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	Cytosol	1	10.19	1												
P41226	986881	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	UBA7	Cytosol				2	10.17	2									
Q67FW5	57770468	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein 1	B3GNTL1	Unknown							1	10.17	1						
-	11386201	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 2		Unknown										1	10.13	11			
Q3SY77	37181957	UDP-glucuronosyltransferase 3A2	UGT3A2	Membrane							2	10.21	2						
Q86TW2	28207933	Uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 1	ADCK1	Extracellular				1	10.17	1									
A6NHQ4	194578898	Uncharacterized protein C17orf96	C17orf96	Uncharact.Prot.	1	10.12	1												
Q9BQ61	13128992	Uncharacterized protein C19orf43	C19orf43	Uncharact.Prot.	1	10.13	1												
Q9BUV8	41327694	Uncharacterized protein C20orf24	C20orf24	Uncharact.Prot.	1	10.15	1												
A5D8W1	89274175	Uncharacterized protein C7orf63	C7orf63	Uncharact.Prot.				1	10.14	1									
Q4G0Z9	209954825	Uncharacterized protein C8orf45	C8orf45	Uncharact.Prot.							1	10.14	2						
Q8NAV2	21750536	Uncharacterized protein C8orf58	C8orf58	Uncharact.Prot.	1	10.13	1												
Q8NCR6	21362074	Uncharacterized protein C9orf24	C9orf24	Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
Q7Z745	31418193	Uncharacterized protein FLJ40243	HEATR7B2	Uncharact.Prot.				1	10.13	1									
Q2LD37	6807915	Uncharacterized protein KIAA1109	KIAA1109	Membrane				1	10.12	1									
Q9P266	148806881	Uncharacterized protein KIAA1462	KIAA1462	Uncharact.Prot.	2	10.16	2												
Q96PV7	154426272	Uncharacterized protein KIAA1931	FAM193B	Uncharact.Prot.				1	10.14	1									
Q75MH1	41474123	unknown	RPS26	Uncharact.Prot.															
B2RBN7	189054511	unnamed protein product		Uncharact.Prot.													1	10.12	1
B4DXQ1	194378596	unnamed protein product		Uncharact.Prot.													1	10.17	1
Q6ZP02	34527069	unnamed protein product		Uncharact.Prot.													1	10.08	1
-	10439439	unnamed protein product		Uncharact.Prot.													1	10.14	1
-	38018	unnamed protein product		Uncharact.Prot.										1	10.15	11			
-	28606	unnamed protein product		Uncharact.Prot.										1	10.12	1			
Q9GZP4	21361837	UPF0424 protein C1orf128	PITHD1	Uncharact.Prot.	2	10.22	1										2	86.23	48
Q5SQ10	10435053	UPF0635 protein C6orf134	ATAT1	Uncharact.Prot.	3	13.50	2												
P46939	34812	Utrrophin	UTRN	Membrane	1	18.17	1												
P35916	388522	Vascular endothelial growth factor receptor 3	FLT4	Membrane				1	10.19	1									
P13611	1008913	Versican core protein	VCAN	Extracellular							1	10.10	1						
P08670	21757045	Vimentin	VIM	Cytoskeleton	2	15.22	2												
P04004	36575	Vitronectin	VTN	Extracellular	1	10.16	1												
Q00975	4502523	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B	CACNA1B	Synapse				1	10.14	1									
O95180	53832009	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H	CACNA1H	Membrane	1	10.15	1												
Q9GZS3	13376840	WD repeat-containing protein 61	WDR61	Unknown							1	10.16	2						
Q9Y4E6	73747877	WD repeat-containing protein 7	WDR7	Unknown	1	10.14	1												
P47989	91823271	Xanthine dehydrogenase/oxidase	XDH	Peroxisome				1	10.13	1									
-	11322268	xylosyltransferase I		Unknown										1	10.12	1			

TABELLA B					NM-0			NM-1			NM-2			NM-3			NM-3-TIS		
Uniprot entry	GI number	Nome	Gene	Localizzazione	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 3 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi	Frequenza (su 2 analisi)	Score medio	N.medio peptidi
Q8WYQ9	5912060	Zinc finger CCHC domain-containing protein 14	ZCCHC14	Nucleus							1	10.16	1						
Q5VZL5	40788254	Zinc finger MYM-type protein 4	ZMYM4	Nucleus							1	10.12	1						
P17025	55769561	Zinc finger protein 182	ZNF182	Nucleus							2	10.15	3						
Q86UD4	10434163	Zinc finger protein 329	ZNF329	Nucleus	1	10.12	1												
Q96C55	23397479	Zinc finger protein 524	ZNF524	Nucleus	1	10.13	1												
Q7Z3V5	88683007	Zinc finger protein 571	ZNF571	Nucleus				1	10.13	1									
Q8N4W9	51491284	Zinc finger protein 808	ZNF808	Nucleus				1	10.11	1									
O43149	71891792	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	ZZEF1	Nucleus				1	10.13	1									

## Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto il dott. Luigi Zecca per avermi dato la possibilità di lavorare nel suo laboratorio e per le occasioni i cui i suoi consigli mi hanno fatto crescere.

Ringrazio la prof.ssa Cecilia Gelfi per la sua disponibilità e per la sua attenzione durante questi ultimi mesi.

Ringrazio molto Fabio per l'aiuto concreto, per il reperimento dei tessuti, per avermi insegnato molte delle procedure sperimentali, per il sostegno in ogni occasione e per il rapporto di fiducia che ha voluto costruire con me in questi anni.

Ringrazio Chiara per il contributo nella preparazione della maggior parte dei campioni utilizzati per questa tesi e per la sua gioia in laboratorio.

Ringrazio anche Mireille per il suo contributo durante i primi esperimenti, per le discussioni molto utili durante lo svolgimento di questo lavoro e per la sua compagnia.

Ringrazio Francesca e Alessia per il loro sostegno e la loro compagnia durante il mio lavoro di tesi.

Un fondamentale contributo allo svolgimento di questo lavoro è stato dato dal laboratorio di proteomica del dott. Luigi Mauri presso l'istituto di tecnologie biomediche (ITB) di Milano. Desidero ringraziare il dott. Mauri per la sua collaborazione e Antonella De Palma, Dario Silvestre ed Eleonora Franceschi per il loro ruolo essenziale nello svolgimento degli esperimenti di proteomica.

Desidero ringraziare l'istituto di medicina legale di Milano (Università degli Studi di Milano) per la donazione dei tessuti cerebrali.

Ringrazio inoltre il laboratorio di microscopia Alembic (presso Fondazione San Raffaele del Monte Tabor di Milano), in particolare Maria Carla Panzeri, per le immagini di microscopia elettronica.

Desidero ringraziare Pasqualina D'ursi, Zeldia Lazzati e il dott. Luciano Milanese del gruppo di Bioinformatica dell'istituto di tecnologie biomediche (ITB) di Milano per la loro collaborazione nell'ambito degli studi preliminari di docking molecolare.

Ringrazio infine il prof. Luigi Casella e il prof. Enrico Monzani per la loro collaborazione e per i loro consigli.