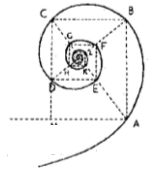




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE



CICLO XXVI

Anno Accademico 2012/2013

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Settore scientifico disciplinare

BIO12

Analisi proteomica del muscolo cardiaco di ratto in corso d'invecchiamento

Dottoranda: Roberta LEONE

Matricola N° R09163

TUTORE : Prof.ssa Cecilia GELFI

DIRETTORE DELLA SCUOLA: Ch.mo Prof. Mario CLERICI

SOMMARIO

L'invecchiamento è un fenomeno universale, caratterizzato da disfunzioni di processi fisiologici e metabolici, che coinvolge tutti gli organismi e gli organi; per il muscolo cardiaco rappresenta il maggiore fattore di rischio per lo sviluppo di patologie. Tra gli elementi distintivi dell'invecchiamento vi è l'eccessiva produzione di radicali liberi (ROS) di origine mitocondriale. A tal proposito, una delle ipotesi più studiate enuncia che i ROS inducono danni al DNA mitocondriale (mtDNA) generando disfunzione cellulare e insufficienza d'organo. I mitocondri, inoltre, sono coinvolti nell'invecchiamento per il delicato bilancio tra i fenomeni mitocondriali di fusione, fissione e autofagia, necessario per il corretto funzionamento cellulare.

Con l'obiettivo di comprendere le basi molecolari dell'invecchiamento del muscolo cardiaco in un modello fisiologico d'invecchiamento, sono stati analizzati i profili proteomici con la tecnica 2D-DIGE (two dimensional Differential In Gel Electrophoresis), di cuori di ratto Sprague Dawley di 6, 22 e 30 mesi. Per indagare il ruolo dei mitocondri abbiamo utilizzato: la tecnica dell'immunoblotting su estratto di muscolo totale, per valutare i cambiamenti nella dinamica mitocondriale in corso d'invecchiamento e, successivamente, l'analisi 2D-DIGE sugli estratti di mitocondri isolati con tecniche classiche (centrifugazioni differenziali e gradiente di densità), per lo studio dei profili proteomici di mitocondri subsarcolemmali (SSM) ed intermiofibrillari (IFM).

Dai risultati della 2D-DIGE su muscolo cardiaco totale, sebbene le proteine variate siano un numero discreto, la loro variazione in corso di invecchiamento è modesta e non coinvolge le principali proteine del muscolo cardiaco; è possibile quindi associare questo modello ad un invecchiamento di successo, come nel caso dei centenari. In particolare le variazioni interessano alcune proteine le myosin binding protein e la troponina I, l'aldeide deidrogenasi (Aldh2) e alcune serpine, che potrebbero diventare possibili biomarcatori del processo d'invecchiamento. La dinamica mitocondriale in corso d'invecchiamento è risultata alterata con una diminuzione della fissione, un aumento della fusione e una diminuita attivazione dell'autofagia, sebbene pare vi sia una attivazione protettiva della via non-canonica dell'autofagia (aumento di LC3). Inoltre è stato osservato che in corso d'invecchiamento si ha un aumento della sirtuina 3, la quale difende l'mtDNA dai ROS mitocondriali, e della CypD, la quale favorisce l'apertura del mitochondrial permeability transition pore (mtPTP), con effetto deleterio per la cellula. I cambiamenti, che risultano essere protettivi per l'invecchiamento, sembrano in linea con un'ipotesi di un invecchiamento di successo, in presenza comunque di una cospicua alterazione della dinamica mitocondriale.

Dai risultati della proteomica mitocondriale differenziale si è riscontrata un'incongruenza con i risultati della proteomica del tessuto, soprattutto per l'andamento delle proteine della catena respiratoria nell'invecchiamento. Per evitare di trarre conclusioni errate si è verificata l'integrità dei mitocondri

precedentemente isolati, basandosi sull'arricchimento di proteine della matrice e delle membrane mitocondriali negli estratti mitocondriali rispetto al muscolo totale. Si è osservato che le proteine della matrice non sono arricchite rispetto al muscolo totale, mentre le proteine delle membrane risultano arricchite fino al 600%; ulteriori conferme sono state ottenute con l'analisi dei sovranatanti (dopo separazione dai mitocondri SS) e con kit commerciali di estrazione dei mitocondri. Questi risultati sono stati suffragati da recenti pubblicazioni (in particolare di Picard et al.), le quali criticano la metodologia classica di isolamento dei mitocondri, in quanto, causa la rottura sia della complessa rete tridimensionale mitocondriale, che dell'interazione dei mitocondri con altri compartimenti cellulari. Questo lavoro ha messo in luce un problema tecnico nell'isolamento dei mitocondri, di conseguenza proponiamo, prima di qualsiasi analisi quantitativa, una valutazione dell'integrità dei mitocondri isolati (considerando sia le proteine delle membrane che degli spazi mitocondriali), per garantire l'affidabilità dei successivi risultati.

Lo studio dei cambiamenti a livello proteomico del muscolo cardiaco, in questo modello fisiologico d'invecchiamento, ci ha permesso di osservare i cambiamenti che avvengono per l'effetto dell'invecchiamento intrinseco del miocardio. Ulteriori avanzamenti saranno possibili testando i biomarcatori candidati per il monitoraggio dell'invecchiamento in modelli di patologie cardiovascolari, per comprendere, se essi possano anticipare la manifestazione oppure se abbiano un ruolo causale nelle patologie cardiache.

ABSTRACT

The aging process is a general event involving all organisms and organs, characterized by physiological and metabolic dysfunctions. In cardiac muscle aging represents the major risk factor for cardiac disease onset. A number of hallmarks characterize the ageing process, nevertheless among those the main is represented by an excessive mitochondrial ROS (radical oxygen species) production. For this reason, it has been hypothesized that ROS lead to mitochondrial DNA (mtDNA) damages, inducing cellular dysfunction and organ failure. Furthermore, mitochondria being responsible for the fine tuning between mitochondrial fusion, fission and autophagy, which are essential processes for cellular functioning, their role in aging become predominant.

To understand molecular bases of cardiac muscle aging in a physiological model, the proteomic profiles of Sprague Dawley rat hearts of 6, 22 and 30 months old were analyzed by 2D-DIGE technology (two dimensional Differential In Gel Electrophoresis). To contribute to clarify the role of mitochondria in aging, fusion, fission and autophagy were investigated by antigen antibody reactions on total muscle extracts. In addition, mitochondria were isolated by classical methodologies including differential centrifugation and density gradient for the study of proteomic profile by 2D-DIGE of subsarcolemmal (SSM) and intermyofibrillar (IFM) mitochondria. Results on total cardiac muscle, indicate a number of changed proteins, particularly of specific protein isoforms, even though changes in abundance are modest. These results suggest that this model could be representative of a successful aging, like it occurs in human centenarians. In particular, variations involve myosin binding proteins and the troponin I, mitochondrial aldehyde dehydrogenase (Aldh2) and a group of serpins, suggesting that these proteins could be possible putative biomarkers of the aging process. Concerning mitochondrial dynamic in aging, it is impaired with a decreased fission, an increased fusion and a decreased autophagy. The latter through the increment of LC3, could indicate a protective activation of the non-canonical autophagic process. Furthermore, it has been observed that in course of aging there is an increment of Sirtuin 3, which protects mtDNA from mitochondrial ROS attacks, and of CypD, which promotes the opening of mitochondrial permeability transition pore (mtPTP), with a harmful effect for the cell. The changes, that resulted be protective from senescence are in line with the hypothesis of a successful aging, even though the changes in mitochondrial dynamics are remarkable.

However, this study reveals an incoherence between mitochondrial and cardiac tissue proteomic results, particularly on respiratory chain proteins. To avoid unreliable conclusions after proteomics we tested the integrity of isolated mitochondria. We observed that matrix proteins were not enriched in mitochondrial extracts, while the mitochondrial membrane proteins were enriched up to 600%. Further validations were obtained with the analysis of the supernatant (after SS

mitochondria enrichment) and by isolation of mitochondria with commercial kits. Our observations are supported by recent papers (Picard et al.), which highlighted the drawbacks of mitochondria isolation by classical methodology demonstrating that the tridimensional mitochondrial network and their interactions with other cellular compartments were destroyed. Also our study underlines technical problems associated with mitochondrial isolation and we suggest, to guarantee results reliability, a careful evaluation of mitochondria integrity (considering both mitochondrial spaces and membranes proteins), before any quantitative differential analysis.

The cardiac muscle proteomic changes in this physiological model of aging indicate that some variations are associated to an intrinsic cardiac aging. Further progresses to validate the reliability of proposed biomarkers of aging will be possible by testing them in animal models affected by cardiovascular disorders.

INDICE

1	LISTA DEI SIMBOLI.....	IX
2	LISTA DELLE FIGURE.....	XI
3	LISTA DELLE TABELLE.....	XIV
4	INTRODUZIONE.....	1
4.1	L'invecchiamento	1
4.1.1	Definizione e tipi di invecchiamento.....	1
4.1.2	Invecchiamento e società	2
4.1.3	Meccanismi molecolari coinvolti nell'invecchiamento.....	2
4.1.4	Gli elementi caratteristici (Hallmarks) dell'invecchiamento	3
4.1.4.1	Instabilità genomica	4
4.1.4.2	Erosione dei telomeri	5
4.1.4.3	Alterazioni epigenetiche.....	5
4.1.4.4	Perdita dell'omeostasi proteica.....	6
4.1.4.5	Deregolazione della percezione dei nutrienti (Nutrient-sensing) ..	6
4.1.4.5.1	La via di segnale di IGF1	6
4.1.4.5.2	La Restrizione calorica e le sirtuine	7
4.1.4.6	Disfunzione mitocondriale.....	9
4.1.4.7	Senescenza cellulare.....	9
4.1.4.8	Esaurimento delle cellule staminali.....	10
4.1.4.9	Alterata comunicazione intercellulare	10
4.1.5	L'invecchiamento è un fenomeno multifattoriale	10
4.2	Il muscolo cardiaco	11
4.2.1	Il sarcomero cardiaco	13
4.3	Invecchiamento del muscolo cardiaco.....	16
4.3.1	Cambiamenti funzionali e morfologici nell'invecchiamento cardiaco..	16
4.3.2	Il ruolo dei mitocondri nell'invecchiamento cardiaco	16
4.3.2.1	Breve excursus sui mitocondri.....	16
4.3.2.2	I mitocondri nell'invecchiamento cardiaco	18
4.3.2.2.1	La teoria mitocondriale dell'invecchiamento	18
4.3.2.2.2	Fusione, fissione e autofagia: il controllo di qualità della cellula	
	19	
4.4	Come studiare i mitocondri.....	22
4.4.1	Proteomica degli organelli subcellulari	22
4.4.1.1	Metodi tradizionali per l'isolamento degli organelli	23
4.4.1.1.1	Centrifugazioni differenziali.....	23
4.4.1.1.2	Centrifugazioni su gradienti di densità.....	24

4.4.1.2	Metodi emergenti	25
4.4.1.2.1	Free-flow electrophoresis.....	25
4.4.1.2.2	Purificazione per immunoaffinità.....	26
4.4.1.2.3	Fluorescent-assisted organelle sorting (FAOS).....	26
4.4.2	Organizzazione dei mitocondri nel cuore	27
4.4.3	Come isolare i mitocondri dal muscolo cardiaco	28
5	SCOPO DEL LAVORO.....	30
6	MATERIALI E METODI	32
6.1	Preparazione dei campioni, fase preanalitica	32
6.1.1	Isolamento dei mitocondri.....	32
6.1.1.1	Omogeneizzatore di Potter	32
6.1.1.2	Centrifugazioni differenziali e Ultracentrifuga	33
6.2	Tecnica 2D-DIGE.....	34
6.2.1	Estrazione proteica	35
6.2.2	Preparazione dei campioni alla marcatura	36
6.2.3	Marcatura dei campioni	36
6.2.4	Prima dimensione	37
6.2.5	Equilibratura delle strip	38
6.2.6	Seconda dimensione	38
6.2.7	Acquisizione delle immagini.....	39
6.2.8	Analisi computerizzata mediante il software DeCyder 2D.....	39
6.2.8.1	Il modulo DIA (Differential In-gel Analysis)	40
6.2.8.2	Il modulo BVA (Biological Variation Analysis)	40
6.2.8.3	Il modulo EDA (Extended Data Analysis)	41
6.2.8.3.1	Breve descrizione delle analisi statistiche	42
6.3	Identificazione Proteica.....	43
6.3.1	Mappe preparative	43
6.3.1.1	Prima dimensione	43
6.3.1.2	Seconda dimensione (SDS-PAGE)	44
6.3.1.3	Colorazione con Lava Purple.....	44
6.3.1.4	Acquisizione e analisi delle immagini	45
6.3.1.5	Spot Picker.....	46
6.3.2	Spettrometria di massa.....	46
6.3.2.1	Digester.....	46
6.3.2.2	Identificazioni con MALDI ToF-ToF.....	48
6.4	Immunoblotting.....	48
6.4.1	Preparazione dei campioni	49
6.4.2	SDS-PAGE	49
6.4.3	Trasferimento su membrana.....	49

6.4.4	Colorazione totale con Sypro Ruby	49
6.4.5	Incubazione della membrana con Anticorpi primari.....	50
6.4.5.1	Elenco degli anticorpi primari.....	50
6.4.6	Rivelazione (reazione Ag-Ab).....	50
6.5	Saggio di attività della citrato sintasi e di integrità della membrana mitocondriale interna (Citrato synthase assay Kit).....	51
6.5.1	Saggio della citrato sintasi	51
6.5.2	Saggio dell'integrità della membrana mitocondriale interna	52
6.6	Estrazione dei mitocondri con Mitochondria Isolation Kit.....	52
6.7	Estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali con Kit Minute.....	53
7	RISULTATI	55
7.1	Disegno sperimentale.....	55
7.2	Muscolo cardiaco in toto.....	56
7.2.1	Risultati 2D-DIGE analisi statistica	56
7.2.1.1	Differential Expression Analysis (One way Anova)	57
7.2.1.2	PCA.....	58
7.2.1.3	Hierarchical cluster analysis	58
7.2.2	Identificazioni proteiche	60
7.2.2.1	Mappa standard cuore di ratto.....	60
7.2.2.2	Macchie variate ed identificate nei confronti.....	60
7.2.2.2.1	Confronto tra Giovane e Vecchio.....	61
7.2.2.2.2	Confronto tra Giovane e Senescente	63
7.2.2.2.3	Confronto tra Vecchio e Senescente	66
7.2.3	Immunoblotting	68
7.2.3.1	Studio della dinamica mitocondriale	68
7.3	Mitocondri	72
7.3.1	Mitocondri isolati su gradiente di Percoll	72
7.3.1.1	Valutazione della purezza dei mitocondri isolati con Immunoblotting	72
7.3.1.2	Valutazione dell'attività della citrato sintasi	73
7.3.1.3	Identificazioni	74
7.3.1.3.1	Mappa standard mitocondriale	74
7.3.1.4	Risultati della proteomica mitocondriale (2D-DIGE).....	76
7.3.1.4.1	Confronto dei mitocondri SSM e IFM tra Giovane e vecchio. 77	
7.3.1.4.2	Confronto dei mitocondri SSM e IFM tra Giovane e senescente.....	81
7.3.1.4.3	Considerazioni sulle proteine della fosforilazione ossidativa. 85	

7.3.1.5	Immunoblotting per la valutazione dell'integrità mitocondriale ...	86
7.3.1.6	Immunoblotting sui sovranatanti per la ricerca di proteine mitocondriali.....	88
7.3.1.7	Impiego di kit commerciali	89
7.3.1.7.1	Kit per l'estrazione dei mitocondri (Kit Mito Iso 1), saggio di integrità delle membrane mitocondriali.....	89
7.3.1.7.2	Kit per l'estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali.....	90
8	<i>DISCUSSIONE.....</i>	92
8.1	Cambiamenti del proteoma del muscolo cardiaco durante l'invecchiamento	92
8.2	Dinamica mitocondriale in corso d'invecchiamento	96
8.3	Analisi del protocollo di isolamento dei mitocondri	98
8.4	Cambiamenti inattesi nel Proteoma mitocondriale	99
8.5	La tecnica di isolamento classica provoca la rottura dei mitocondri.....	100
8.6	I mitocondri sono reti di tubuli interconnessi.....	101
9	<i>CONCLUSIONI</i>	104
10	<i>PROSPETTIVE FUTURE</i>	105
11	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	107
12	<i>APPENDICE</i>	115
13	<i>PRODOTTI SCIENTIFICI DELLA DOTTORANDA</i>	131
14	<i>RINGRAZIAMENTI.....</i>	132

1 LISTA DEI SIMBOLI

2D-DIGE *two dimensional Differential In Gel Electrophoresis*

ACN aceto nitrile

Aco2 Aconitasi

ADP adenosine difosfato

AMPK *5'-AMP-activated protein kinase*

ANOVA analisi della varianza

APS ammonio persolfato

ATP adenosin trifosfato

Bcl2 *B-cell lymphoma protein 2*

Beclin1 *Coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein*

Bnip3 *Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3*

BVA Biological Variation Analysis

mCAT catalasi mitocondriale

TCA ciclo degli acidi tricarbossilici

cMyBP-C *cardiac myosin binding protein-C*

CR restrizione calorica

CypD ciclofillina D

DIA Differential In-gel Analysis

DNA acido desossido ribonucleico

Drp1 *dynammin-related protein 1*

DTT ditiotreitolo

EDA Extended Data Analysis

EGTA *ethylene glycol tetraacetic acid*

FACS *Fluorescence-activated cell sorting*

FADH *flavin adenine dinucleotide*

Fis1 *fission protein 1*

FAOS *Fluorescence-activated organelle sorting*

FFE *free flow electrophoresis*

GAPDH *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GFP *green fluorescent protein*

IDH2 *Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial*

IFM *Intermiofibrillar mitochondria*

LC3 *Light chain 3*

MyHC *myosin heavy chain*

Mfn1 mitofusina 1

Mfn2 mitofusina 2
MitoISO1 *Mitochondria Isolation Kit*
MLC *myosin light chain*
mPTP *mitochondrial permeability transition pore*
mtDNA *mitochondrial DNA*
mTOR *mammalian target of rapamycin*
NAD *Nicotinamide adenine dinucleotide*
NFkB *Nuclear factor NF-kappa-B*
nodo AV nodo atrio ventricolare
nodo SA nodo seno atriale
Ogdh *alpha ketoglutarato deidrogenasi*
OPA1 *optic atrophy 1*
p16-INK4a *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
PGC1alpha *Peroxisome Proliferator - Activated Receptor Gamma Coactivator 1 alpha*
PKA *cAMP dipendent protein kinase*
PMSF *phenylmethanesulfonylfluoride*
PMT fotomoltiplicatore
PCA *Principal components analysis*
POI *protein of interest*
proteine Atg *Autophagy related proteins*
PVDF *Polyvinylidene fluoride*
ROS radical oxigen species
Sdha *succinato deidrogenasi*
SDS *Sodium dodecyl sulfate*
Sirt1 *NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1*
Sirt3 *NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3, mitochondrial*
SHR *Spontaneously hypertensive rats*
SSM *Subsarcolemmal mitochondria*
TEMED *N,N,N',N'- tetramethylethylene-diamine*
TN-C troponina C
TN-I troponina I
TN-T troponina T
Vdac1 *Voltage-dependent anion-selective channel protein 1*
vs versus

Gli acronimi delle proteine, che sono state identificate con la spettrometria di massa, sono presenti nelle tabelle in appendice.

2 LISTA DELLE FIGURE

Figura 1: I nove elementi caratteristici dell'invecchiamento	4
Figura 2: Via di segnale della restrizione calorica	8
Figura 3: Danni al DNA mitocondriale e invecchiamento.	9
Figura 4: Disegno schematico della conduzione elettrica nel cuore.	12
Figura 5: Disegno schematico di un sarcomero, l'unità contrattile del muscolo.....	14
Figura 6: Disegno schematico del sarcomero cardiaco	15
Figura 7: La fosforilazione ossidativa.	17
Figura 8: Schema del modello di interazione tra il danno al DNA, l'attivazione di p53 e la disfunzione mitocondriale..	19
Figura 9: Schema delle proteine coinvolte nel processo dell'autofagia.	20
Figura 10: Schema delle proteine coinvolte nei processi di fusione e fissione mitocondriale..	21
Figura 11: disegno schematico della <i>free flow electrophoresis</i> (FFE)	25
Figura 12: I mitocondri subsarcolemmali (SSM) ed intermiofibrillari (IFM)	27
Figura 13: Microscopia elettronica di mitocondri isolati	29
Figura 14: Sub frazionamento con gradiente di densità	29
Figura 15: Immagine dell'omogeneizzatore di Potter.	33
Figura 16: Schema del protocollo di centrifugazioni differenziali.	34
Figura 17: Schema riassuntivo del protocollo del <i>MinuteTM Mitochondria Membrane Protein Isolation Kit</i>	54
Figura 18: Mappa rappresentativa 2D-DIGE	57
Figura 19: Muscolo cardiaco: PCA <i>Principal component analysis</i>	59
Figura 20: Muscolo cardiaco: Hierarchical cluster	59
Figura 21: Mappa preparativa di cuore di ratto	60
Figura 22: Mappa rappresentativa 2D-DIGE per il confronto giovane vs vecchio .	62
Figura 23: Istogramma delle classi funzionali delle proteine variate tra giovane e vecchio.....	63
Figura 24: Mappa rappresentativa 2D-DIGE per il confronto giovane vs senescente	64
Figura 25: Istogramma delle classi funzionali delle proteine variate tra giovane e senescente	65
Figura 26: Mappa rappresentativa 2D-DIGE per il confronto vecchio vs senescente	66
Figura 27: Istogramma delle classi funzionali delle proteine variate tra vecchio e senescente..	67
Figura 28: <i>Immunoblotting</i> delle proteine coinvolte nell'autofagia.....	69
Figura 29: <i>Immunoblotting</i> delle proteine coinvolte in fissione e fusione.	70
Figura 30: Immagini dei mitocondri isolati dopo ultracentrifuga.	72
Figura 31: Analisi qualitativa della purezza degli estratti mitocondriali	73
Figura 32: Saggio dell'attività della citrato sintasi.	74

Figura 33: Mappa preparativa di mitocondri SSM e IFM.	75
Figura 34: Rappresentazione delle proteine identificate con la spettrometria di massa	76
Figura 35: PCA per il confronto dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM) tra ratto giovane e vecchio..	78
Figura 36: Hierarchical cluster delle proteine dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM) tra ratto giovane e vecchio.	78
Figura 37: Istogramma delle proteine variate tra mitocondri subsarcolemmali di ratto giovane e vecchio, divise in classi funzionali	79
Figura 38: Disegno schematico delle proteine del ciclo di Krebs, della beta-ossidazione e del trasporto dei lipidi nel mitocondrio nel vecchio rispetto il giovane.	80
Figura 39: : Disegno schematico delle proteine della fosforilazione ossidativa e dell'importo ed esposto delle proteine mitocondriali nel vecchio rispetto il giovane.	80
Figura 40: PCA del confronto tra mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM) di ratto giovane e senescente.....	82
Figura 41: Hierarchical cluster delle proteine dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM) di ratto giovane e senescente.....	82
Figura 42: Istogramma delle proteine variate tra mitocondri subsarcolemmali di ratto giovane e senescente, divise in classi funzionali.	83
Figura 43: Disegno schematico delle proteine del ciclo di Krebs, della beta-ossidazione e del trasporto dei lipidi nel mitocondrio nel senescente rispetto al giovane.	84
Figura 44: : Disegno schematico delle proteine della fosforilazione ossidativa e dell'importo ed esposto delle proteine mitocondriali nel ratto senescente rispetto al giovane.	84
Figura 45: Istogramma delle proteine variate dei confronto mitocondri intermiofibrillari tra ratto giovane e senescente, divise in classi funzionali.	85
Figura 46: Istogramma delle macchie identificate come proteine della catena respiratoria nei confronti eseguiti tra ratti giovane, vecchio e senescente	86
Figura 47: Analisi dell'arricchimento delle proteine mitocondriali.....	87
Figura 48: Grafico a punti, riassuntivo dell'arricchimento delle proteine mitocondriali	88
Figura 49: Schema del protocollo di centrifugazioni differenziali effettuate per l'isolamento dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM).....	88
Figura 50: verifica della presenza di proteine mitocondriali nel sovratanante dopo isolamento dei mitocondri.....	89
Figura 51: Percentuale di rottura delle membrane mitocondriali dopo estrazione con <i>Kit MITOISO1</i>	90
Figura 52: Verifica del <i>kit Minute</i> per l'estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali.....	91

Figura 53: Ingrandimento di una mappa rappresentativa 2D-DIGE.....	93
Figura 54: Schema della via canonica e via non canonica dell'autofagia.....	97
Figura 55: Isolamento mitocondriale, frammentazione mitocondriale ed alterata funzione mitocondriale.....	102

3 LISTA DELLE TABELLE

Tabella 1: protocollo utilizzato per l'isoelettrofocalizzazione.	37
Tabella 2: protocollo utilizzato per l' SDS-PAGE.	39
Tabella 3: protocollo utilizzato per l'isoelettrofocalizzazione mappe preparative ...	44
Tabella 4: Raggruppamento dei gel nei gruppi sperimentali.	56
Tabella 5: Macchie differenzialmente espresse nei confronti: giovane vs vecchio, giovane vs senescente, vecchio vs senescente.	58
Tabella 6: Macchie differenzialmente espresse identificate nei confronti: giovane vs vecchio, giovane vs senescente, vecchio vs senescente.	61
Tabella 7: Macchie differenzialmente espresse nei confronti: giovane SSM vs vecchio SSM, giovane IFM vs vecchio IFM.	77
Tabella 8: Macchie differenzialmente espresse identificate nei confronti: giovane SSM vs senescente SSM, giovane IFM vs senescente IFM.	81
Tabella appendice 1: Elenco delle proteine significativamente variare nei confronti giovane vs vecchio, giovane vs senescente, vecchio vs senescente.	115
Tabella appendice 2: : Elenco delle proteine significativamente variare e identificate dalla mappa standard di cuore di ratto	118
Tabella appendice 3: Elenco delle proteine identificate dalla mappa standard di mitocondri subsarcolemmali e intermiofibrillari.	121
Tabella appendice 4: Elenco delle proteine significativamente variare nel confronto tra mitocondri subsarcolemmali di giovane vs vecchio.	126
Tabella appendice 5: Elenco delle proteine significativamente variare nel confronto tra mitocondri subsarcolemmali di giovane vs senescente.	127
Tabella appendice 6: Elenco delle proteine significativamente variare nel confronto tra mitocondri intermiofibrillari di giovane vs senescente.	130

4 INTRODUZIONE

4.1 *L'invecchiamento*

4.1.1 **Definizione e tipi di invecchiamento**

L'invecchiamento è un fenomeno universale, caratterizzato da disfunzioni di processi fisiologici e metabolici, il quale coinvolge tutti gli organismi e gli organi [1]. Il punto cruciale del processo d'invecchiamento è la minore capacità d'adattamento dell'organismo all'ambiente, che porta ad una crescente probabilità di morire, ovvero alla sindrome della fragilità [2]. Molti individui sperimentano, intorno alla sesta, settima decade di vita, il declino delle funzionalità dell'organismo che si manifesta con la mancanza di forza generale e suscettibilità insolita alle malattie o ad altre infermità. Questi individui sono più soggetti ad ammalarsi delle patologie legate all'età quali: patologie cardiovascolari, neurodegenerative, diabete e cancro [3].

Esistono tuttavia tre tipi di possibile invecchiamento: l'invecchiamento associato a malattia, l'invecchiamento di successo e l'invecchiamento usuale. Nell'invecchiamento associato a patologia vi è una compresenza di patologie associate all'età, quali dislipidemia, diabete, ipertensione, insufficienza cardiaca e renale, artrosi, sordità, ipovedenza, cardiopatia ischemica, malattie cerebrovascolari e demenza. La politerapia, il calo funzionale, la comorbilità, la malnutrizione, la cachessia e i cambiamenti della composizione corporea insieme aumentano, inoltre, i problemi legati alla tollerabilità delle terapie farmacologiche e quindi al rischio di sviluppo di effetti avversi alla terapia farmacologica [4]. Nell'invecchiamento di successo o in assenza di malattia, la persona ha un'età molto avanzata, anche oltre i 110 anni, e possiede prestazioni fisiche e mentali molto simili ad un soggetto in età giovane adulta; questi soggetti vengono comunemente chiamati centenari. Infine vi è l'invecchiamento usuale, che si riferisce alla maggior parte della popolazione anziana, la quale ha una situazione intermedia a quelle sopra descritte [5].

4.1.2 Invecchiamento e società

Nei Paesi sviluppati si sta assistendo ad un aumento della vita media e della sua durata massima, come conseguenza di tre cause principali: il calo della mortalità infantile, una migliore cura ed assistenza medica e una diminuita fecondità. Gli sviluppi della medicina moderna, che hanno contribuito all'accrescere della speranza di vita, sono stati permessi grazie allo sviluppo della situazione socio-economica ed alla diffusione dei programmi sanitari dell'Organizzazione mondiale della Sanità [6].

Oggi, in Italia, la percentuale delle persone con più di 65 anni è pari al 20,3% della popolazione e dalle previsioni ISTAT nel 2043 la percentuale salirà fino al 33%, un italiano su tre [7], tanto è che la popolazione sia destinata ad invecchiare gradualmente, lo si evidenzia paragonando la percentuale degli ultra 65enni nel 1980 che era del 13%, nel 1990 del 15% e nel 2003 del 19% [6].

Conseguenza dell'aumento della classe ad età più avanzata sarà un incremento della spesa sanitaria e sociale per la cura e l'assistenza degli anziani [8]. L'invecchiamento per questi motivi è diventato un tema caro sia alla ricerca socio-economica, che alla ricerca biomedica. La ricerca medica attuale, infatti, si basa sulla comprensione degli elementi che permettano una migliore gestione delle patologie acute o croniche, più frequenti nel soggetto anziano, con un prolungamento della durata di vita senza deficit e in buona salute [9].

4.1.3 Meccanismi molecolari coinvolti nell'invecchiamento

Lo studio dei meccanismi molecolari dell'invecchiamento è stato guidato da due sistemi modello: il primo riguarda la senescenza cellulare, la quale indica che le cellule poste in culture primarie hanno una limitata capacità di replicazione. Si è scoperto, infatti, che la senescenza cellulare è determinata da una serie di cambiamenti che portano all'aumento dell'espressione di inibitori del ciclo cellulare. Il secondo sistema riguarda l'analisi genetica dei mutanti che sopravvivono più a lungo rispetto alla controparte *wild type* che ha normalmente vita breve (ad esempio il *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila*). I meccanismi identificati usando questi sistemi sono stati testati anche in mammiferi inclusi i topi geneticamente ingegnerizzati e anche in modelli di patologie [10]. Di seguito vengono descritti i meccanismi regolatori dell'invecchiamento che sono stati identificati.

4.1.4 Gli elementi caratteristici (Hallmarks) dell'invecchiamento

Lopez-Otin et al. nel loro ultimo lavoro [11] descrivono gli elementi caratteristici dell'invecchiamento (Figura 1). Sono stati proposti nove candidati che generalmente contribuiscono al processo d'invecchiamento. Ogni elemento caratteristico è stato considerato secondo i seguenti criteri:

- si manifesta durante l'invecchiamento normale;
- il suo sperimentale aggravamento accelera il processo d'invecchiamento;
- il suo miglioramento porta a ritardo nel normale processo d'invecchiamento e prolunga la sopravvivenza in salute.

I nove elementi caratteristici dell'invecchiamento possono essere raggruppati in tre categorie: primari, antagonisti e integrativi. Gli elementi primari hanno un effetto inequivocabilmente negativo, come il danno al DNA nucleare e mitocondriale, perdita dei telomeri, cambiamenti epigenetici e una difettiva omeostasi proteica. Gli elementi antagonisti hanno un effetto opposto a seconda dell'intensità: ad un basso livello hanno un effetto benefico, mentre ad un elevato livello sovvertono la loro funzione e producendo un effetto deleterio. Questo è il caso della senescenza cellulare, che protegge l'organismo dal cancro, ma un eccesso promuove l'invecchiamento; lo stesso è per i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che a bassi livelli mediano il segnale e la sopravvivenza cellulare ma, ad un livello elevato ed una esposizione cronica, producono danni a livello cellulare (come per le vie di percezione dei nutrienti e quelle anaboliche). Infine vi sono i tratti caratteristici integrativi, come l'esaurimento della capacità replicativa delle cellule staminali o la comunicazione intercellulare. Queste sistemi si occupano dell'omeostasi e della funzione cellulare. La relazione tra i tratti caratteristici è la seguente: gli elementi primari sono i fattori scatenati dell'invecchiamento che causano un progressivo accumulo dei danni con il tempo, mentre gli elementi antagonisti diventano progressivamente negativi in un processo parzialmente promosso da quelli primari; infine gli elementi integrativi emergono quando l'accumulo causato dagli elementi primari e antagonisti non possono essere più compensati dai sistemi di omeostasi. Segue una breve spiegazione di ogni elemento caratteristico dell'invecchiamento.

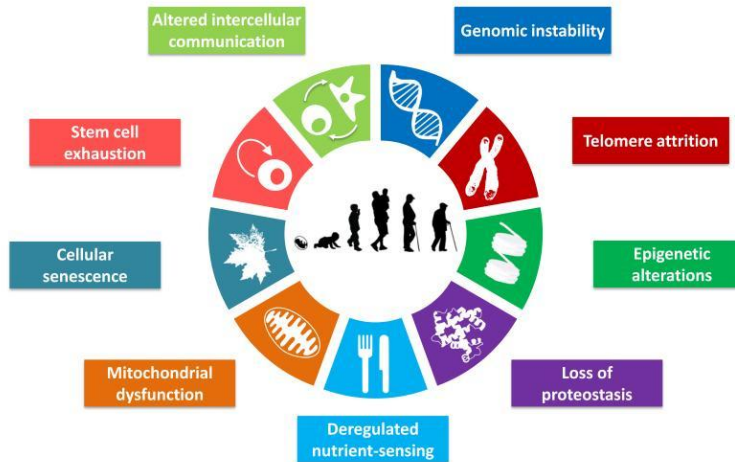


Figura 1: I nove elementi caratteristici dell'invecchiamento. I nove elementi comprendono: instabilità genomica, erosione dei telomeri, alterazioni epigenetiche, perdita dell'omeostasi proteica, deregolazione della percezione dei nutrienti, disfunzione mitocondriale, esaurimento delle cellule staminali e alterata comunicazione intracellulare. L'immagine è stata modificata dal lavoro di López-Otin et al. [11].

4.1.4.1 Instabilità genomica

Uno dei comuni denominatori dell'invecchiamento è l'accumulo di danni genetici durante tutta la vita dell'individuo. L'integrità e la stabilità del DNA è continuamente minacciata sia da agenti esogeni fisici, chimici e biologici che da agenti endogeni inclusi gli errori alla replicazione del DNA, le reazioni idrolitiche spontanee e i radicali liberi dell'ossideno (ROS) [12]. Le lesioni genetiche che ne derivano includono mutazioni puntiformi, traslocazioni, perdita o acquisto di parti di cromosomi, accorciamento dei telomeri e distruzione di geni a causa di integrazioni di virus o trasposoni. L'organismo per fronteggiare questa situazione ha attivato complesse reti di meccanismi per la riparazione del DNA [13]. Anche delezioni e mutazioni nel DNA mitocondriale (mtDNA) possono contribuire all'invecchiamento a causa del microambiente ossidativo del mitocondrio, della mancanza di istoni protettivi e dalla limitata efficienza del sistema di riparazione del mtDNA [14]. Inoltre anche difetti nella lamina nucleare possono causare instabilità genetica [15]. I danni al DNA, accumulati in risposta a molti fattori inclusi lo stress ossidativo e la luce UV, attivano p53, un importante oncosoppressore. La *over*-espressione di p53 porta le culture cellulari ed i topi ad invecchiare. Essendo p53 un

oncosoppressore l'induzione della senescenza cellulare è considerata un meccanismo, in parallelo, per prevenire la formazione di tumori [16].

4.1.4.2 Erosione dei telomeri

I telomeri sono sequenze ripetitive di DNA non codificante che si trovano alle estremità di ogni cromosoma, essi vengono accorciati di una unità ad ogni ciclo cellulare. Per questa loro caratteristica sono considerati l'orologio biologico della cellula. Topi deficienti dell'enzima telomerasi mostrano un prematuro invecchiamento [17, 18]. L'accorciamento dei telomeri spiega la limitata capacità proliferativa di alcuni tipi di colture cellulari, chiamata senescenza replicativa o limite di Hayflick [19]. La proliferazione, superato il limite di Hayflick, porta ad un'ulteriore erosione dei telomeri generando instabilità cromosomica che porta agli eventi di "breakage-fusion-breakage" [20]. La disfunzione dei telomeri porta all'attivazione della p53, il maggiore sensore responsivo allo stress, esso provoca l'arresto della proliferazione con l'avvio di meccanismi molecolari per la riparazione dell'eventuale danno oppure, se il danno risulta non risolvibile, la cellula viene inviata all'apoptosi o alla senescenza [21].

È stato osservato che topi telomerasi-deficienti manifestano un invecchiamento precoce che regredisce quando viene geneticamente riattivata l'espressione della telomerasi [22]. Inoltre gli studi su centenari e la loro progenie hanno evidenziato una correlazione positiva tra un miglior profilo di salute (una diminuzione delle patologie associate all'invecchiamento, migliore funzione cognitiva e miglior profilo lipidico) con una maggiore lunghezza dei telomeri rispetto ai controlli [23].

4.1.4.3 Alterazioni epigenetiche

Le modificazioni epigenetiche coinvolgono alterazioni nel profilo di metilazione del DNA, modificazioni post-traduzionali degli istoni e rimodellamento della cromatina. In particolare tra gli enzimi che causano modificazioni degli istoni vi è la famiglia delle sirtuine, deacetilasi NAD dipendenti e ADP ribosiltrasferasi, le quali sono state studiate a fondo, dal *C. Elegans* all'uomo, come potenziali agenti in grado di contrastare l'invecchiamento [24]. La principale sirtuina è la Sirt1 che migliora la salute durante l'invecchiamento attraverso un meccanismo complesso e interconnesso, che include un ampio raggio di azioni cellulari che spaziano tra migliorare la stabilità genomica a migliorare l'efficienza metabolica [25]. Sirt1

modula inoltre l'omeostasi proteica, la funzione mitocondriale, la via dei nutrienti (*nutrient-sensing pathway*) e l'infiammazione, mostrando un'interconnessione tra tutti gli elementi caratteristici dell'invecchiamento (come ulteriormente descritto nella sezione "*La Restrizione calorica e le sirtuine*").

4.1.4.4 Perdita dell'omeostasi proteica

L'omeostasi proteica è mantenuta dalla corretta stabilizzazione delle proteine ben ripiegate, grazie alle proteine dello stress (*Heat shock proteins*) e da meccanismi di degradazione proteica che permettono usando i sistemi ubiquitina-proteasoma e autofagia-lisosoma, il *turnover* cellulare e quindi la sostituzione delle proteine e degli organelli danneggiati. Inoltre, con la rimozione, si proteggono le cellule dall'effetto tossico provocato dall'accumulo delle componenti danneggiate. La cellula consuma un'importante quota di ATP per mantenere l'omeostasi proteica ed è necessaria per la longevità indotta da restrizione calorica [26]. Nell'invecchiamento questi due sistemi di degradazione proteica sono in continuo declino, supportando l'idea che la perdita dell'omeostasi proteica costituisca un elemento comune nell'età avanzata. L'autofagia viene bloccata normalmente dall'attivazione di mTOR (*Serine/threonine-protein kinase mTOR*) protein chinasi che svolge un ruolo centrale nel metabolismo cellulare, nella crescita e nella sopravvivenza in risposta a ormoni, fattori di crescita, nutrienti, disponibilità energetica e segnali di stress. Somministrando in modo intermittente induttori chimici dell'autofagia quali la rapamicina, inibitore di mTOR, si può aumentare la durata della vita di topi adulti [27].

4.1.4.5 Deregolazione della percezione dei nutrienti (*Nutrient-sensing*)

Vi sono recenti evidenze che supportano fortemente l'idea che il segnale anabolico acceleri l'invecchiamento mentre una diminuzione dei nutrienti porti a estendere la longevità dell'organismo [28]. Le vie principali coinvolte sono, per le vie anaboliche, il segnale mediato dal IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) mentre, per le vie attivate dalla scarsità dei nutrienti, vi sono le sirtuine e AMPK.

4.1.4.5.1 La via di segnale di IGF1

L'asse somatotropica nei mammiferi comprende l'ormone della crescita (GH), prodotto dalla ghiandola pituitaria anteriore e dal suo mediatore IGF1, il quale è

anche attivato dall'insulina e questa via viene chiamata "*insulin and IGF1 signalling*" (IIS). La via IIS è molto conservata e controlla l'invecchiamento; tra i suoi multipli bersagli vi sono la famiglia dei fattori trascrizionali FOXO e il complesso mTOR. Mutazioni o polimorfismi che coinvolgono gli effettori a valle di IIS come AKT, mTOR e FOXO sono legati alla longevità, sia nell'uomo che negli organismi modello [29] infatti, come è stato dimostrato in *C. Elegans* e nei topi, una diminuzione del segnale prodotto da IIS porta ad un aumento della durata della vita. Inoltre mutazioni che riducevano l'attività del recettore dell'IGF1 è stata riportata in soggetti centenari [30].

Paradossalmente i livelli di GH e di IGF1 diminuiscono durante il normale invecchiamento, come in tutti i modelli di invecchiamento precoce [31]. Si ipotizza che un organismo con una costitutiva diminuzione dell'IIS può sopravvivere più a lungo perché mantiene bassa la proliferazione cellulare ed il metabolismo di conseguenza abbassa il rischio di danni cellulari [32].

4.1.4.5.2 La Restrizione calorica e le sirtuine

Nel 1935 è stato riportato da McCay *et al* che riducendo del 20-40% le calorie introdotte nell'animale si otteneva un'estensione della sopravvivenza nei lieviti, nei vermi e nei roditori [33]. Si è osservato inoltre che nelle scimmie, la restrizione calorica previene anche le patologie correlate con l'invecchiamento [34-36]. Le Sirtuine sono delle deacetilasi e ribosiltransferasi NAD⁺ dipendenti molto conservate nell'evoluzione. I mammiferi possiedono sette tipi di sirtuine con diversa tessuto specificità, esse regolano molte vie cellulari, tra le quali il riparo del DNA, il ciclo cellulare e il metabolismo. Le sirtuine modulano l'invecchiamento sia nel lievito che nei mammiferi, fino ad oggi la meglio descritta è Sirt1, che, se attivata, ha effetti pleiotropici in molte patologie [10]. La restrizione calorica (CR) agisce attraverso Sirt1; quest'ultima deacetila il fattore trascrizionale PGC1alpha (*Peroxisome Proliferator - Activated Receptor Gamma Coactivator 1 alpha*), che porta alla biogenesi mitocondriale, e i fattori di trascrizione FoxO, che insieme a PGC1alpha, attivano la trascrizione dei geni antiossidanti e quindi portano ad una riduzione dei ROS. Inoltre l'attivazione di FoxO induce l'attivazione del pathway autofagico (Figura 2).

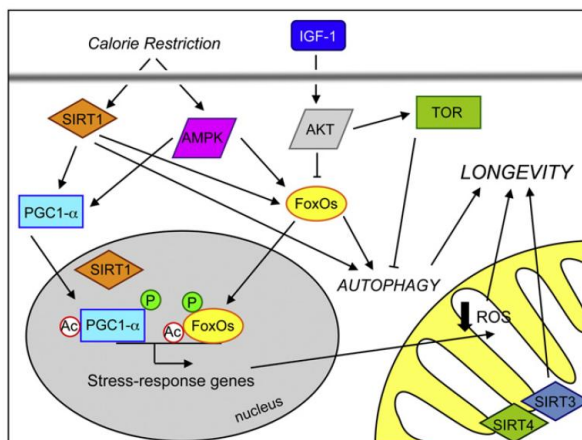


Figura 2: Via di segnalazione della restrizione calorica. La restrizione calorica aumenta la durata della vita attraverso la diminuzione della via di segnalazione di IGF1. La CR porta all'attivazione dei fattori trascrizionali FoxO che, traslocando nel nucleo, trascrivono i geni antiossidanti (ad esempio la SOD2 mitocondriale). FoxO per essere attivato deve essere deacetilato da Sirt1. Sirt1 deacetila e attiva anche PGC1alpha promuovendo la biogenesi mitocondriale; PGC1alpha può essere attivato direttamente da AMPK tramite fosforilazione. Inoltre la restrizione calorica modula il processo autofagico attraverso l'inibizione del signalling IGF1 e l'attivazione di Sirt1 e FoxO. Immagine modificata dal lavoro di Raffaello et al [34].

La CR attiva anche la trascrizione di un'altra sirtuina, SIRT3, localizzata nel mitocondrio, essa preserva l'integrità del DNA mitocondriale dalla produzione di ROS prodotti dalla fosforilazione ossidativa, Sirt3 è stata direttamente associata ad un aumento della longevità, infatti la perdita di SIRT3 risulta in una diminuzione dell'espressione della superossido dismutasi mitocondriale (SOD2) con un conseguente aumento dei radicali liberi dell'ossigeno [34]. Infine la restrizione calorica attiva anche la chinasi AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*), un altro regolatore chiave della biogenesi mitocondriale in risposta alla deprivazione di energia. AMPK agisce come sensore dell'energia intracellulare e si attiva in risposta alla diminuzione della quantità di ATP e all'aumento dell'AMP, portando all'attivazione della via catabolica e all'inibizione di quella anabolica. Il coinvolgimento dell'AMPK nell'invecchiamento arriva dall'osservazione che queste chinasi sono attivate in risposta a vari stimoli associati alla CR (restrizione calorica), inoltre una overespressione dell'AMPK aumenta la durata della vita in *C. Elegans*, aumentando la resistenza allo stress ossidativo.

4.1.4.6 Disfunzione mitocondriale

Lo stress ossidativo, causa ben nota di invecchiamento cellulare, danneggia proteine, lipidi e DNA. I mitocondri giocano un ruolo fondamentale nell'invecchiamento indotto da stress ossidativo, perché sono la maggior fonte di radicali liberi dell'ossigeno nella cellula. Un'evidenza diretta del ruolo critico dei ROS mitocondriali è stato dimostrato con una *over*-espressione della catalasi mitocondriale (mCAT) in topi, ottenendo un aumento del 18% della durata della vita [37] (Il ruolo dei mitocondri nell'invecchiamento sarà discusso più estesamente nei paragrafi successivi).

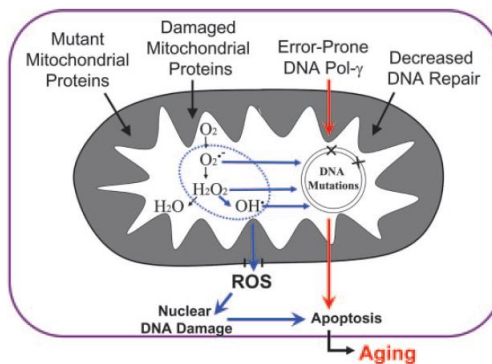


Figura 3: Danni al DNA mitocondriale e invecchiamento. Fattori multipli possono ledere all'integrità mitocondriale che porta alla perdita della funzione cellulare. La via classica è indicata con le frecce blu; la generazione di ROS (anione superossido, perossido d'idrogeno e radicali idrossilici), come un prodotto mitocondriale della fosforilazione ossidativa, risulta in un danno alle macromolecole mitocondriali incluso il mtDNA. Quando questi fattori danneggiano l'apparato mitocondriale per la produzione di energia, oltre una certa soglia, le proteine mitocondriali sono rilasciate e attivano la via delle caspasi portando all'apoptosi, morte cellulare e invecchiamento. (Immagine modificata dal lavoro di Loeab L. A. et al [38]).

4.1.4.7 Senescenza cellulare

La senescenza cellulare può essere definita come un arresto stabile del ciclo cellulare associato a cambiamenti fenotipici stereotipati [39]. Questo *checkpoint* cellulare richiede un efficiente sistema di sostituzione che comporta la rimozione delle cellule senescenti e la mobilitazione di progenitori per ristabilire il numero cellulare. Negli organismi invecchiati, questo sistema di *turnover* diventa inefficiente o può esaurirsi la capacità rigenerativa dei progenitori, con il conseguente accumulo di cellule senescenti che possono aggravare e contribuire

all'invecchiamento. Le cellule senescenti manifestano una drammatica alterazione del loro secretoma, che è particolarmente ricco di citochine pro-infiammatorie e metallo proteasi della matrice. Il gruppo di Wang ha quantificato il numero di cellule senescenti in topi e ha osservato un cambiamento della percentuale di cellule senescenti dal giovane, con l'8%, al vecchio, con il 17% [25].

4.1.4.8 Esaurimento delle cellule staminali

Il declino del potenziale rigenerativo dei tessuti è una delle più ovvie caratteristiche dell'invecchiamento. Ad esempio: nell'invecchiamento vi è il declino dell'ematopoiesi, con una risultante immunosenescenza, ossia la diminuzione delle cellule del sistema immunitario, che causa un aumento dell'incidenza di anemia [40]. Una simile disfunzione accade anche per le cellule staminali adulte residenti nei tessuti. Tutti questi fenomeni sono correlati ad un accumulo dei danni al DNA con conseguente attivazione delle proteine inibitorie del ciclo cellulare come l'over-espressione di p16-INK4a; anche l'accorciamento dei telomeri è una delle importanti cause del declino delle cellule staminali nell'invecchiamento di molti tessuti.

La senescenza cellulare è una risposta compensatoria benefica in risposta al danno, ma diventa deleteria e accelera l'invecchiamento quando i tessuti esauriscono la loro capacità rigenerativa [11].

4.1.4.9 Alterata comunicazione intercellulare

L'invecchiamento coinvolge anche il livello di comunicazione intracellulare, sia quello endocrino, che quello neuroendocrino e quello neuronale. Una delle vie di comunicazione alterate nell'invecchiamento è l'infiammazione, quest'ultima può essere il risultato di molteplici cause come l'accumulo di danni tissutali pro-infiammatori, l'insufficienza del sistema immunitario ad eliminare patogeni e cellule disfunzionali, la propensione delle cellule senescenti a secernere citochine pro-infiammatorie, l'aumentata attivazione del fattore trascrizionale NFκB o una difettiva risposta autofagica [41].

4.1.5 L'invecchiamento è un fenomeno multifattoriale

L'invecchiamento è un fenomeno complesso perché di natura multifattoriale; accanto ai fattori biologici vi sono anche fattori psicologici e sociali che sono

altrettanto modulatori del processo di invecchiamento. Ad esempio la personalità o lo stile di vita possono influenzare la longevità dell'essere umano [42]; in uno studio condotto su pazienti affetti da coronaropatia, è stato scoperto che personalità caratterizzate da ansietà e pessimismo erano associate a conseguenze negative sulla salute legate all'età come la maggior incidenza di tumore, minor capacità di recupero e maggior mortalità [43]. Al contrario si è riscontrato che, i centenari con tratti positivi del carattere quali, apertura mentale, stabilità psicologica ed estroversione, tendono ad avere uno stato di salute mentale migliore, un buon segno d'invecchiamento rispetto a coloro che non possiedono queste caratteristiche [44]. Anche la qualità del supporto sociale, come i legami affettivi con famigliari ed amici, contribuiscono a meglio mantenere le capacità funzionali durante l'invecchiamento [45]. Sebbene non ci sia un supporto diretto, parecchi fattori psicosociali potrebbero influenzare la mortalità e la longevità [42].

4.2 Il muscolo cardiaco

Il cuore è un organo cavo a parete muscolare ed il tessuto muscolare che lo compone, detto miocardio, differisce dal muscolo scheletrico per due caratteristiche principali: presenta una rete di cellule in comunicazione tra di loro (sincizio funzionale) che si contraggono in modo autonomo e non presenta placche motrici. Difatti la contrazione del muscolo cardiaco non è avviata dall'impulso di un nervo motore, ma da cellule muscolari cardiache specializzate e raggruppate in una struttura, il nodo del seno (SA). Tre fasci presenti nell'atrio destro trasmettono l'impulso ad un centro di raccolta, il nodo atrio-ventricolare (AV), situato tra gli atri e i ventricoli. L'impulso è successivamente trasmesso al rimanente miocardio attraverso il fascio di His, che si suddivide a sua volta in due branche ventricolari denominati fasci di Purkinje, che prendono intimo e diffuso contatto con le cellule miocardiche (Figura 4).

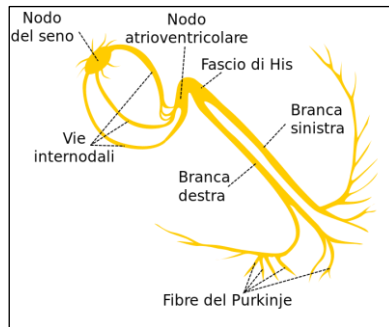


Figura 4: Disegno schematico della conduzione elettrica nel cuore [46].

La muscolatura del cuore si contrae e si rilassa in modo ritmico e alternato nel corso del ciclo cardiaco, permettendo al sangue di scorrere nella circolazione sistemica.

Le cellule del miocardio costituiscono, nel loro insieme, un sincizio funzionale, perchè saldate tra loro da strutture denominate dischi intercalari, costituiti da zone di membrana cellulare adiacenti tra loro al fine di garantire efficaci connessioni meccaniche ed elettriche (sinapsi elettriche). Per potersi contrarre la cellula miocardica deve prima sviluppare un potenziale d'azione (ovvero deve andare incontro ad una serie rapida e stereotipata di eventi, in seguito ai quali il potenziale di membrana da negativo passerà transitoriamente verso valori positivi e vi resterà per qualche tempo finchè non sarà ripristinato lo stato antecedente al potenziale d'azione o stato di riposo).

Le cellule del nodo senoatriale hanno il compito di avviare la contrazione cardiaca (*pacemaker* naturale), non originano il potenziale d'azione come le altre cellule del miocardio e non hanno un potenziale di riposo stabile. Queste cellule si depolarizzano in modo spontaneo fino al raggiungimento di un valore soglia oltre il quale ha origine il potenziale d'azione. Il potenziale d'azione del nodo SA si diffonde al rimanente miocardio attraverso le vie di conduzione elettrica; quando l'impulso giunge a livello dei singoli miociti, esso è trasmesso al loro interno dal sistema T, costituito da invaginazioni tubuliformi della membrana sarcoplasmatica, che avvolgono le miofibrille. Il potenziale d'azione si propaga da un cardiomiocita al successivo attraverso i dischi intercalari e, giunto ai tubuli T, viene da questi trasmesso al reticolo sarcoplasmatico provocando il rilascio di ioni calcio. Il calcio

si lega alla troponina portando allo spostamento della tropomiosina, con conseguente scopertura dei siti di legame tra actina e miosina. Le teste della miosina si possono legare all'actina e, con consumo di ATP, si verifica il movimento di piegatura delle teste di miosina e il conseguente scorrimento dei filamenti di miosina e actina. Questi spostamenti provocano l'accorciamento del sarcomero e quindi la contrazione del miocardio. A contrazione avvenuta, nella fase di ripolarizzazione, il calcio ritorna all'interno del reticolo sarcoplasmatico.

La frequenza di contrazione del cuore, intesa come il numero di battiti al minuto, è regolata dal sistema nervoso autonomo, il quale innerva il cuore con le sue due branche:

- sistema parasimpatico, attraverso le terminazioni del nervo vago a livello degli atri, innerva il nodo SA e il nodo AV controllando la frequenza con effetto inibitorio osservabile già a riposo (azione cronotropa negativa);
- sistema simpatico, innerva atri e ventricoli garantendo un aumento sia della frequenza (azione cronotropa positiva) che della forza di contrazione (azione isotropa).

Tutte le azioni del sistema nervoso autonomo, attraverso la componente simpatica o parasimpatica, si realizzano tramite sinapsi chimiche in cui il neurotrasmettitore è l'acetilcolina, per il sistema parasimpatico, e la noradrenalina, per il sistema simpatico [46].

4.2.1 Il sarcomero cardiaco

I cardiomiociti sono cellule muscolari specializzate e sono composti da miofibre che contengono i miofilamenti. Le miofibre hanno distinte e ripetute microanatomiche unità dette sarcomeri, i quali rappresentano l'unità contrattile dei miociti. I sarcomeri sono definiti come la regione compresa tra due *linee Z*. Il sarcomero è composto da filamenti sottili e spessi, rispettivamente di actina e miosina; quando il sarcomero è in fase rilassata si possono distinguere tre regioni: la *banda A*, dove vi è una sovrapposizione dei filamenti sottili e spessi, la *banda I*, dove vi sono solo i filamenti sottili e la *zona H* dove vi sono solo i filamenti spessi, al centro di quest'ultima è presente una linea scura, la *linea M*, costituita da proteine che interconnettono i filamenti di miosina (Figura 5). La zona C, è

localizzata all'interno della banda A, corrisponde alla zona dove si trova la myosin binding protein C (discussa nel dettaglio nel paragrafo successivo) [47].

L'interazione chimica e fisica tra l'actina e la miosina causa l'allungamento e l'accorciamento del sarcomero e quindi la contrazione dei miociti nel processo di accoppiamento tra eccitazione e contrazione. L'interazione è alla base della teoria dello scorrimento dei filamenti nella contrazione muscolare.

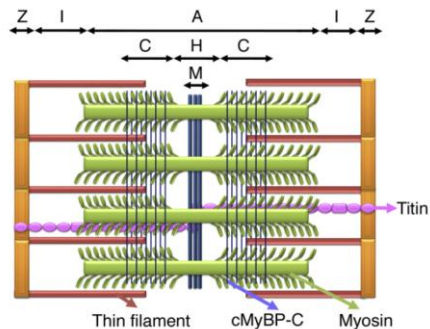


Figura 5: Disegno schematico di un sarcomero, l'unità contrattile del muscolo. Il sarcomero è l'unità compresa tra due linee Z e comprende tre zone: la banda A, la banda I. La banda A è composta a sua volta da due zone C e la regione H (al suo interno vi è la linea M). Immagine modificata dal lavoro di Barefield et al [47].

I filamenti spessi sono costituiti dalle miosine, proteine con un peso approssimativamente di 220000 Dalton (ogni filamento contiene circa 300 molecole di miosina). Le miosine sono composte da due catene pesanti (MHC), da quattro catene leggere, due regolatorie (MLC *regulatory*) e due catalitiche (MLC *essential*) (Figura 6). Ogni miosina contiene due teste che hanno attività ATPasica ovvero in grado d'idrolizzare ATP richiesta per la formazione dei ponti tra actina e miosina durante la contrazione.

I filamenti sottili sono composti da tre tipi di proteine: actina, tropomiosina e troponina (Figura 6). L'actina è una proteina globulare composta da unità ripetute, forma due filamenti ad alpha elica che si avvolgono su se stessi. Intercalate tra i filamenti di actina vi sono delle proteine a forma di asta le tropomiosine. Legate alle tropomiosine ad intervalli regolari vi sono i complessi della troponina, composti da tre subunità: troponina T (TN-T), che si lega alla tropomiosina, troponina C (TN-C), la quale lega il calcio nel processo di accoppiamento tra eccitazione e contrazione ed infine la troponina I (TN-I), la quale inibisce il sito di legame della miosina

all'actina. Quando il calcio lega la TN-C, avviene un cambiamento conformazionale del complesso della troponina tale per cui la TN-I viene spostata dal sito di legame della miosina in modo da rendere accessibile il sito alla miosina. Quando il calcio viene rimosso dalla TN-C, la troponina riassume la sua posizione inattivante, inibendo il legame tra miosina e actina. La troponina I è importante per la pratica clinica perché viene utilizzata come marker diagnostico per l'infarto del miocardio (è infatti rilasciata in circolo quando il miocita muore).

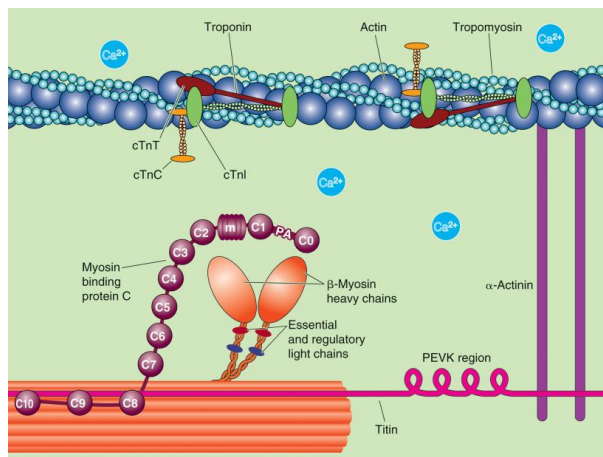


Figura 6: Disegno schematico del sarcomero cardiaco [48]. In questa immagine sono evidenziate le proteine che regolano la contrazione muscolare. La tropomiosina e il complesso della troponina, composto da tre subunità (cTnT, cTnI, cTnC). Mentre la miosina si compone di due subunità catalitiche (beta-myosin heavy chain) due regolatorie (Essential and regulatory light chain) e due catene pesanti. La *myosin binding protein C* lega le miosine.

La proteina cardiaca *myosin binding protein-C* (cMyBP-C) è un importante regolatore della contrattilità cardiaca: la sua fosforilazione per mezzo della PKA (cAMP dependent protein kinase) è un meccanismo che contribuisce all'aumentata gittata cardiaca in risposta alla stimolazione beta-adrenergica. Il suo meccanismo d'azione invece non è ancora chiarito. Lo studio di El-Armouche A. et al. ha determinato che i livelli di fosforilazione di cMyBP-C sono marcatamente diminuiti nell'insufficienza cardiaca umana e sperimentale, indicando che la funzione contrattile compromessa del cuore potrebbe essere in parte attribuibile ai livelli di ridotta fosforilazione della cMyBP-C [49].

4.3 Invecchiamento del muscolo cardiaco

L'invecchiamento cardiaco è uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari, [50] le quali sono la maggior causa di morte tra le persone anziane [10]. L'invecchiamento intrinseco del miocardio è definito come la degenerazione lenta e progressiva dipendente dall'età, che rende il cuore sempre più ipertrofico, vulnerabile allo stress, con una ridotta riserva funzionale e che contribuisce ad aumentare la mortalità e la morbilità negli anziani. Lo studio dell'invecchiamento intrinseco del miocardio non è affatto semplice, in quanto i suoi effetti vengono oscurati da altri fattori di rischio spesso presenti nell'anziano quali diabete o ipertensione. Sia il diabete che l'ipertensione accelerano il processo di invecchiamento cardiovascolare [51]. L'invecchiamento intrinseco del miocardio è stato riscontrato anche nei roditori, con il vantaggio però che queste specie non sono affette da altri fattori di rischio. I roditori diventano per questo motivo un ottimo modello sperimentale, anche perché facilmente modificabili geneticamente [50].

4.3.1 Cambiamenti funzionali e morfologici nell'invecchiamento cardiaco

Durante l'invecchiamento si assiste ad un ingrossamento e ad una diminuzione dei cardiomiociti, con una conseguente perdita di funzione causata dal declino dell'attività rigenerativa (questa passa dall'1% per anno a 20 anni allo 0,4% per anno all'età di 75 anni). Si osserva inoltre una fibrosi interstiziale del miocardio, la quale può causare aritmia (ad esempio la fibrillazione atriale). L'accumulo di lipofusina e amiloide, è un'altra caratteristica del miocardio invecchiato. Infine si osserva la diminuzione del numero delle cellule nel nodo seno-atriale e la presenza di fibrosi al nodo atrio-ventricolare e al fascio di His con possibili alterazioni del sistema di conduzione cardiaco [52].

4.3.2 Il ruolo dei mitocondri nell'invecchiamento cardiaco

4.3.2.1 Breve excursus sui mitocondri

I mitocondri sono gli organelli cellulari deputati alla produzione di energia per la cellula eucariotica. Il numero dei mitocondri è estremamente variabile, ad esempio il cuore, a causa della differente richiesta energetica, contiene un numero tre volte maggiore di mitocondri rispetto al fegato. Basti pensare che il cuore è un muscolo

che necessita di molta energia per potersi contrarre in modo costante per tutta la durata della vita dell'individuo.

I mitocondri sono quindi la fonte principale di ATP, per questo vengono anche denominati centrale energetica della cellula. La produzione di ATP avviene attraverso la catena respiratoria associata alla fosforilazione ossidativa.

La catena respiratoria è composta da quattro complessi, che trasportano elettroni. I complessi I, III e IV sono pompe protoniche transmembrana che permettono il passaggio di protoni (H^+) dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana. Gli elettroni vengono donati da molecole ad alto contenuto energetico (es. NADH, FADH) detti equivalenti riducenti, prodotte dal metabolismo ossidativo (ad esempio durante il ciclo di Krebs). I complessi in stato ossidato accettano gli elettroni provenienti dagli equivalenti riducenti, poi, una volta ridotti, donano gli elettroni al successivo complesso ossidato e pompano protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana. Accettore finale degli elettroni è l'ossigeno, che viene ridotto ad acqua. L'ATP sintasi, posto alla fine della catena respiratoria, fosforila una molecola di ADP ad una di ATP sfruttando l'energia derivante dalla dissipazione del gradiente protonico [53].

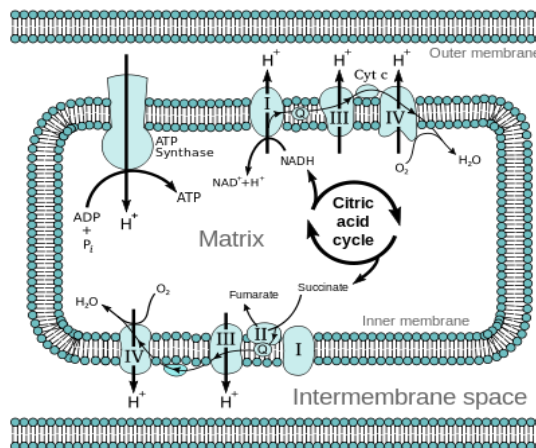


Figura 7: immagine schematica dei complessi I, II, III e IV della catena respiratoria e L'ATP sintasi che permettono la fosforilazione ossidativa [46].

I mitocondri sono considerati la maggiore fonte di produzione cellulare di ROS: si stima che il 2% di ossigeno consumato reagisca con elettroni che sfuggono dalla

catena respiratoria producendo ione superossido, successivamente convertito in perossido d'idrogeno [54]. Un eccesso di ROS causa uno stress ossidativo che porta all'attivazione dei molti sistemi antiossidanti cellulari (es. superossido dismutasi, catalasi, il sistema del glutatione, tioredossina) al fine di evitare il danneggiamento del DNA, delle proteine e dei lipidi [55].

4.3.2.2 I mitocondri nell'invecchiamento cardiaco

4.3.2.2.1 La teoria mitocondriale dell'invecchiamento

Il cuore è un organo vitale ad alta richiesta energetica e dipendente dalla beta-ossidazione degli acidi grassi, la quale avviene nei mitocondri. I mitocondri infatti, costituiscono circa il 30% del peso del muscolo cardiaco e questo lo rende particolarmente vulnerabile ai danni provocati dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS) prodotti dai mitocondri stessi.

A tale proposito, l'ipotesi più studiata, è la teoria "mitocondriale dell'invecchiamento" proposta da Harman nel 1956, la quale enuncia che gradualmente nel tempo, i ROS inducono danni al DNA, alle proteine (tra le quali le proteine della catena respiratoria) e ai lipidi mitocondriali influenzando la funzione mitocondriale. La disfunzione mitocondriale a sua volta porta a danneggiare la funzione cellulare, portando infine all'insufficienza d'organo [56]. Negli ultimi cinque anni vi è stata una rivalutazione dei ROS nella teoria mitocondriale dell'invecchiamento, ovvero: i ROS vengono prodotti per tutta la durata della vita e servono come segnali per stimolare la proliferazione e la sopravvivenza, così nell'invecchiamento vi è un aumento della produzione di ROS nel tentativo di prolungare la sopravvivenza, con il risultato però di aggravare i danni dovuti ai radicali piuttosto che di migliorare la situazione [57].

Ulteriori evidenze mostrano come l'eccesso di ROS, prodotto dalla disfunzione mitocondriale provochi, oltre al danno genotossico, anche erosione dei telomeri con conseguente attivazione di p53. Ad alte concentrazioni di ROS, p53 blocca le difese antiossidanti generando un circolo vizioso di disfunzione mitocondriale che provoca invecchiamento della cellula e quindi del tessuto (Figura 8) [58].

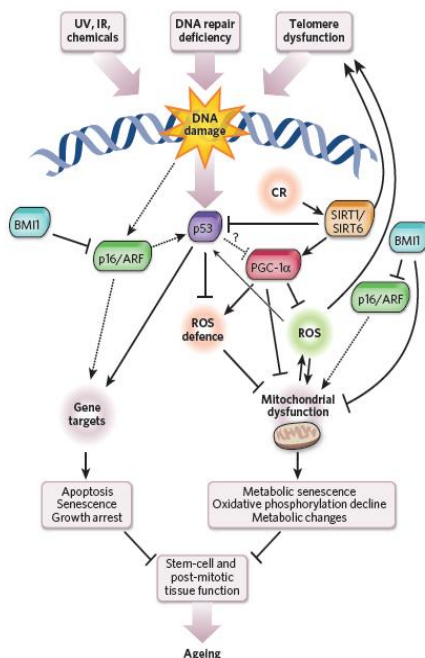


Figura 8: Schema del modello di interazione tra il danno al DNA, l'attivazione di p53 e la disfunzione mitocondriale. La compromissione dei mitocondri può contribuire alla disfunzione d'organo attraverso la diminuzione della produzione di ATP, come i cambiamenti nel metabolismo mitocondriale. Immagine modificata dal lavoro di Sahin et al [58].

Le cellule da miocardio invecchiato hanno una più bassa soglia di attivazione del rilascio di ROS indotti da ROS e una maggior suscettibilità all'apertura del poro di permeabilità transitoria mitocondriale (mPTP) [59]. Il mPTP è un canale voltaggio dipendente, ad alta conduttanza localizzato sulla membrana mitocondriale interna; nello stato completamente aperto permette il passaggio passivo di molecole fino ad una massa molecolare di 1,5 kDa. L'apertura prolungata del mPTP può causare il rigonfiamento dei mitocondri, collasso del potenziale delle membrane mitocondriali, deplezione di ATP, stress ossidativo e indurre l'apoptosi o la morte cellulare [60]. La ciclofillina D impedendo la fosforilazione del mPTP ne impedisce l'inattivazione [61] mentre la ciclosporina A, legandosi alla ciclofillina D, la sequestra e la inattiva diminuendo la suscettibilità del poro all'apertura ed esercitando un effetto cardioprotettivo [62].

4.3.2.2 Fusione, fissione e autofagia: il controllo di qualità della cellula

Accanto alla teoria “mitocondriale dell’invecchiamento” vi sono altre evidenze che coinvolgono la dinamicità mitocondriale nel processo d’invecchiamento, sia negli animali che nell’uomo.

I mitocondri sono organelli dinamici nella cellula vivente, essi sono eterogenei in seguito al bilancio tra i fenomeni di fusione, fissione ed autofagia. È stato proposto che il bilancio di questi processi formi un sistema di controllo di qualità cellulare in grado di rimuovere e sostituire i mitocondri danneggiati; l’equilibrio di questi processi è fondamentale per la prevenzione dell’invecchiamento [63]. L’autofagia è un processo di autodegradazione delle componenti cellulari danneggiate mediante sequestro con autofagosoma e fusione con il lisosoma; essa è mediata da circa 30 proteine Atg (*Autophagy related proteins*) (Figura 9).

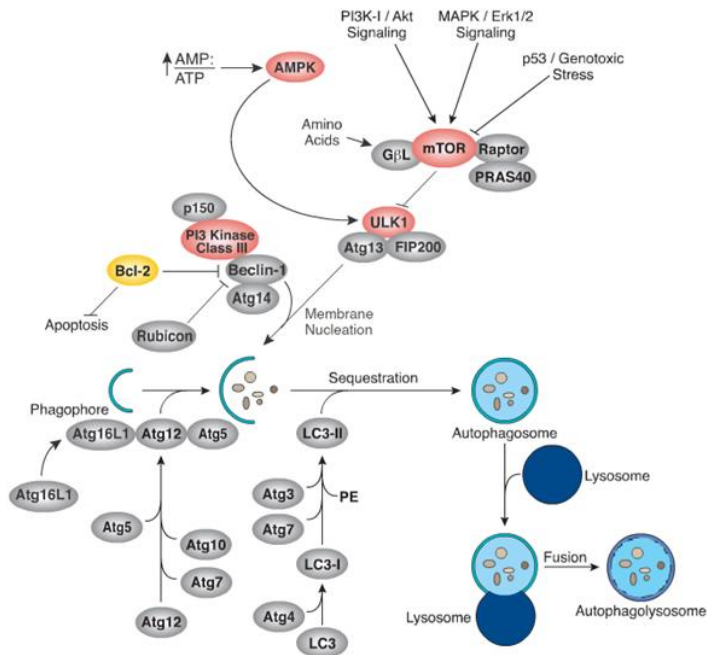


Figura 9: Schema delle proteine coinvolte nel processo dell’autofagia: mTOR, Beclin1 e Bcl2 sono coinvolte nei processi di regolazione ed attivazione dell’autofagia; LC3 è coinvolta direttamente nella parte della formazione dell’autofagosoma (Immagine modificata dal sito www.cellsignaling.com).

L’autofagia può essere attivata tramite la via canonica, ovvero tramite la regolazione di mTor e Beclin1 [64], oppure attraverso la via non-canonica

indipendente da Beclin-1. La via non canonica, a differenza di quella canonica, è ancora poco studiata, ma pare che si sia evoluta per impedire un blocco totale dell'autofagia troppo deleterio per la sopravvivenza cellulare [65]. Entrambe le vie portano all'attivazione del complesso effetore del quale fa parte LC3 (omologo della proteina Atg8 nel lievito); per entrare a far parte della membrana dell'autofagosoma, LC3 deve andare incontro a successive delipidazioni.

Un legame tra l'autofagia e l'apoptosi - la morte cellulare programmata - viene dato da Bcl2 (*B-cell lymphoma protein 2*), che blocca l'autofagia per mezzo del sequestro di Beclin1.

La morfologia dei mitocondri è controllata da particolari proteine, le GTPasi monomeriche, simili a dinamine quali la mitofusina 1 (Mfn1) e la mitofusina 2 (Mfn2) la quale controllano la fusione delle membrane esterne mitocondriali nei mammiferi. Drp1 (*dynamamin-related protein 1*) e Fis1 (*fission protein 1*) hanno un importante ruolo nella fissione, inoltre è stato scoperto recentemente che Bnip3 (*Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3*) inibisce e induce la deoligomerizzazione OPA1 (*optic atrophy 1*), proteina multimerica coinvolta nella fusione mitocondriale [66]. In aggiunta Bnip3, in caso di ipossia o stress ossidativo, può indurre l'autofagia distruggendo l'interazione tra Bcl2 e Beclin1 [67].

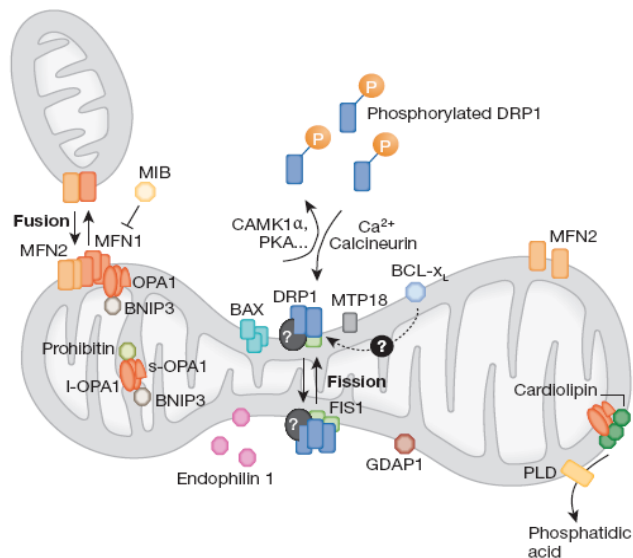


Figura 10: Schema delle proteine coinvolte nei processi di fusione e fissione mitocondriale. Nell'immagine è mostrata la localizzazione e il reclutamento delle proteine coinvolte nei due

processi. In particolare le mitofusine 1 e 2 (MFN1, MFN2), OPA1 e BNIP3 sono coinvolte nella fusione mitocondriale, DRP1 defosforilata e FIS1 sono coinvolte nella fissione mitocondriale. Immagine modificata del lavoro di Campello e Scorrano [66].

Nell'invecchiamento vi è un declino dell'autofagia, la quale porta ad un progressivo accumulo di rifiuti cellulari, compresi gli aggregati proteici citosolici, i mitocondri difettosi (che producono una maggiore quantità di ROS) e la lipofuscina, un materiale lisosomiale indigeribile [68]. Normalmente i mitocondri con mtDNA danneggiato possono mettere in atto una strategia per compensare i danni subiti, fondendosi con mitocondri funzionanti; questo fenomeno di complementazione permette di prevenire possibili deficit dovuti a proteine della catena respiratoria mutate [69]. Nell'invecchiamento si osserva la formazione di "mitocondri giganti" che non hanno la capacità di fondersi con i mitocondri normali, probabilmente a causa della degradazione di OPA1. I "mitocondri giganti" sono caratterizzati da rigonfiamento, perdita delle creste mitocondriali o destrutturazione della membrana interna spesso combinata con l'ingrossamento del mitocondrio [68]. I "mitocondri giganti" si accumulano nella cellula senescente, perché non riescono ad essere eliminati tramite autofagia a causa delle loro dimensioni.

4.4 Come studiare i mitocondri

4.4.1 Proteomica degli organelli subcellulari

Le proteine degli organelli subcellulari determinano la struttura e la funzione delle componenti subcellulari nelle quali risiedono. Per studiare il proteoma degli organelli è necessario applicare delle procedure di sub frazionamento cellulare. In particolare, grandi passi avanti sono stati compiuti dai metodi di separazione degli ioni e delle proteine accoppiati con la spettrometria di massa, i quali hanno identificato e caratterizzato la maggior parte delle proteine residenti negli organelli [70] (Le liste delle proteine mitocondriali identificate sono depositate in *database* pubblici, quali: Mitocarta, MitoP, Mitominer). Per quanto riguarda l'analisi di massa uno dei maggiori problemi riguarda il campionamento incompleto dovuto al range dinamico (fino a dieci ordini di grandezza) del proteoma cellulare, ovvero spesso le proteine più abbondanti vengono rilevate più facilmente rispetto a quelle a più bassa abbondanza delle quali si ha, quindi, una perdita d'identificazione; questo

problema rende difficile confrontare i proteomi subcellulari. Nello sforzo di alleviare il problema dell'incompleto campionamento, la qualità del risultato proteomico dipende pesantemente dal processo di isolamento degli organelli [70].

De Duve e collaboratori furono i pionieri del concetto del frazionamento cellulare, esso implicava una prima distruzione delle cellule e dei tessuti utilizzando metodi fisici come quelli meccanici o metodi chimici come l'impiego di detergenti o con shock iposmotici. Il passaggio della distruzione della cellula ha lo scopo di ottenere un'alta resa proteica mantenendo l'integrità strutturale e funzionale degli organelli intracellulari (l'efficienza della distruzione cellulare è stata spesso monitorata con studi di microscopia e immunochimica).

Esistono due tipi di procedure per effettuare il frazionamento: quelle tradizionali e quelle emergenti. Le procedure classiche di frazionamento sono ben assodate fin dal 1950, facili da adottare e modificare dalla maggior parte dei laboratori con la possibilità di porre le basi per approcci più sofisticati. Purtroppo gli approcci classici sono afflitti dal problema della co-purificazione dei contaminanti, infatti la crescente domanda della bioanalisi, richiede migliori tecniche di arricchimento, bassi livelli di contaminazioni, isolamento di organelli funzionanti, tecniche analitiche altamente sensibili con bassi volumi ed, in prima istanza, l'abilità nel preparare un sub frazionamento di un dato organello [71].

Recentemente gli sviluppi tecnologici hanno permesso di sviluppare approcci emergenti (descritti nei seguenti paragrafi) per il frazionamento in modo da ottenere frazioni di organelli con una maggior purezza. Sussiste tuttavia il problema, per questo tipo di approcci emergenti, del costo proibitivo della strumentazione necessaria.

4.4.1.1 Metodi tradizionali per l'isolamento degli organelli

I metodi tradizionali ottengono il frazionamento cellulare impiegando una serie successiva di centrifugazioni differenziali e su gradienti di densità, in modo da separare le componenti cellulari e gli organelli a partire dall'omogenato cellulare in base, alla loro massa e/o alla loro densità [72].

4.4.1.1.1 Centrifugazioni differenziali

Le centrifugazioni differenziali operano attraverso centrifughe sequenziali dell'omogenato cellulare o tissutale per ottenere il frazionamento di organelli

subcellulari quali nuclei, mitocondri e lisosomi. Questo metodo di separazione è basato sulla differenza nella grandezza e nella densità; gli organelli più grandi e densi infatti sedimenteranno alla più bassa forza centrifuga. Questo metodo è ormai poco utilizzato perché il suo potere risolutivo è basso e le frazioni contengono spesso organelli di diversi tipi che sedimentano alla stessa velocità.

4.4.1.1.2 Centrifugazioni su gradienti di densità

Il più comune metodo di separazione degli organelli impiega centrifughe su gradiente di densità di tipo continuo o discontinuo, usando differenti media, come il saccarosio a differenti densità, viscosità od osmolarità. In generale, l'omogenato cellulare o il soprannatante post nucleare è posto sopra il medium nel tubo e centrifugato. Dopo la centrifuga gli organelli sono focalizzati nel gradiente dove la loro densità è uguale al medium che li circonda (posizione isopicnica). Il tasso di sedimentazione di un organello, in una centrifuga su gradiente di densità, dipende dalla differenza della densità degli organelli relativi al medium e ciò è determinato dal contenuto dell'organello, dal ratio tra lipidi e proteine, dalla sua grandezza e forma. Per esempio, mitocondri con alta densità ed il reticolo endoplasmico hanno un alto contenuto proteico, mentre gli endosomi hanno una bassa densità dovuta alle loro membrane ricche di lipidi. Il saccarosio è il medium più utilizzato per le centrifugazioni su gradiente di densità perché biologicamente inerte, economico e dializzabile. Altri media includono il Ficoll, il Percoll, Nycodenz e Metrizamide [73].

In un gradiente continuo, la densità aumenta linearmente lungo la provetta da centrifuga, mentre il gradiente discontinuo divide il gradiente in zone a densità differenziate successive. Nel gradiente continuo gli organelli si distribuiscono lungo la provetta fino alla loro posizione isopicnica, con il gradiente discontinuo invece, durante la centrifuga, gli organelli si pongono nelle interfacce tra le zone a diversa densità del medium. Il gradiente continuo fornisce una migliore risoluzione nella separazione degli organelli, ma serve molto tempo per preparare il gradiente e richiede un apparato specifico. La centrifugazione su gradiente resta la scelta più popolare tra i ricercatori per il frazionamento cellulare, questo metodo è ben sviluppato e applicato da molti studi di proteomica degli organelli [74].

4.4.1.2 Metodi emergenti

4.4.1.2.1 *Free-flow electrophoresis*

La *free flow electrophoresis* (FFE) è una tecnica di separazione continua che separa gli organelli con differenti mobilità elettroforetiche. Un campo elettrico è applicato perpendicolarmente alla direzione del flusso laminare, causando lo spostamento degli organelli lungo il campo elettrico (Figura 11). Questo spostamento è dipendente dalle proprietà di superficie dell'organello le quali sono associate alla loro mobilità elettroforetica.

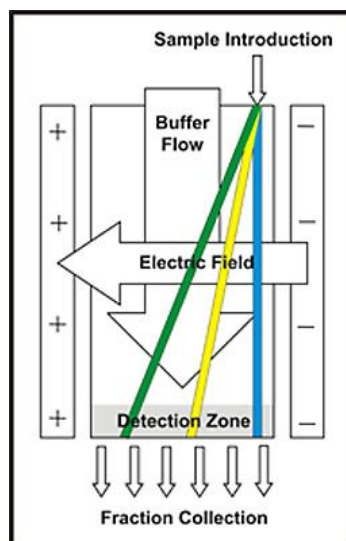


Figura 11: disegno schematico della *free flow electrophoresis* (FFE). Il tampone di corsa e i campioni sono iniettati attraverso una pompa peristaltica per ottenere un flusso laminare. Perpendicolare al flusso, è applicato un alto voltaggio grazie a degli elettrodi. Alla fine della cella di separazione, il campione viene raccolto in differenti tubi di frazionamento [75].

La FFE può essere utilizzata per separare ed identificare differenti sottotipi di organelli a seconda della differente mobilità elettroforetica; questa tecnica è stata utilizzata anche per separare i differenti subtipi di mitocondri dopo separazione su gradiente di densità [76].

Gli organelli purificati mantengono la loro integrità e funzionalità ed inoltre le proteine sono preservate nel loro stato nativo, per questi motivi la tecnica FFE è attrattiva non solo per l'analisi proteomica, ma anche per studi funzionali

complementari. Uno degli svantaggi della FFE si manifesta quando gli organelli o le strutture cellulari hanno un punto isoelettrico simile il che potrebbe risultare in una co-migrazione.

4.4.1.2.2 Purificazione per immunoaffinità

La purificazione degli organelli per immunoaffinità è un potente metodo per ottenere un'elevata purezza ed una resa adeguata. I due metodi principali sono la purificazione per affinità e l'immunoprecipitazione essi si basano sul legame tra l'anticorpo immobilizzato su un supporto solido e il target sull'organello d'interesse. Per l'analisi proteomica, la purificazione per immunoaffinità è un'ottima opzione data la possibilità di poter ripetere purificazioni successive su un singolo campione. In molti lavori, per purificare gli organelli, vengono utilizzati anticorpi specifici coniugati con biglie magnetiche, che dopo opportuni lavaggi per eliminare l'aspecifico, vengono raccolti con un magnete. Questa tecnica è stata utilizzata per la purificazione di: membrana plasmatica, vescicole sinaptiche, cloroplasti, mitocondri e lisosomi.

Vi sono però anche delle limitazioni tra le quali l'elevato costo e i tempi lunghi di purificazione legati al grado di effettiva purificazione che si intende ottenere. Inoltre, una limitazione nel suo ampio utilizzo, è la necessità di anticorpi che leghino in modo specifico antigeni di superficie degli organelli d'interesse. Il recente aumento degli anticorpi disponibili probabilmente cambierà questo campo [77].

4.4.1.2.3 Fluorescent-assisted organelle sorting (FAOS)

Fluorescence-activated organelle sorting (FAOS) utilizza un citometro a flusso per individuare e smistare organelli con specifiche caratteristiche di fluorescenza e grandezza. Sono necessarie poche modifiche al citometro a flusso per renderlo utilizzabile per la FAOS [78]. Questo approccio è stato utilizzato per isolare molti tipi di organelli tra i quali i fagosomi, i mitocondri, le vescicole endocitiche ed i granuli secretori. L'integrità degli organelli è fondamentale per il successo del *sorting* per l'analisi proteomica [79].

La tecnica richiede la marcatura dell'organello con reagenti chimici fluorescenti specifici o l'espressione di proteine organello-specifiche fluorescenti, legate ad esempio GFP (green fluorescent protein). L'ultima tecnica è applicabile solo a colture cellulari o a modelli animali nei quali le proteine fluorescenti possono essere

esprese. Se sono disponibili *marker* di superficie degli organelli è possibile impiegare anticorpi coniugati con fluorofori e quindi utilizzare il FAOS allo stesso modo del FACS per dividere gli organelli. Gli organelli saranno separati a seconda della fluorescenza emessa [79].

4.4.2 Organizzazione dei mitocondri nel cuore

Esistono diversi tipi di popolazioni mitocondriali all'interno del muscolo cardiaco, ognuna con una diversa sub localizzazione cellulare dipendente dalla funzione specifica [80, 81]. In questo progetto sono state studiate le principali popolazioni mitocondriali del muscolo cardiaco: i mitocondri subsarcolammali (SSM) e i mitocondri intermiofibrillari (IFM) (Figura 12).

Studi precedenti di microscopia elettronica hanno mostrato le differenze morfologiche delle due popolazioni: i SSM si trovano al di sotto del sarcolemma e sono più grandi, i IFM invece si trovano a stretto contatto con le fibre muscolari sono più piccoli e più densi [80, 81]. Oltre che strutturali, le due popolazioni, hanno anche differenze biochimiche: infatti i primi, hanno il ruolo principale di risposta agli stimoli fisiologici, mentre i secondi sono fondamentali per la contrazione delle miofibrille cardiache che, data la loro stretta vicinanza, forniscono direttamente l'energia per la contrazione [82].

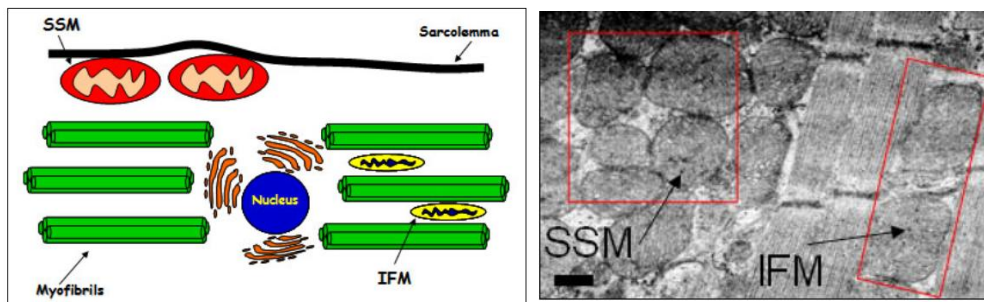


Figura 12: I mitocondri subsarcolammali (SSM) ed intermiofibrillari (IFM). A sinistra un disegno schematico della posizione delle subpopolazioni cellulari nella cellula, a destra un'immagine di microscopia elettronica. Immagine modificata dall'originale di Hollander J. (The West Virginia University).

4.4.3 Come isolare i mitocondri dal muscolo cardiaco

L'uso della centrifuga resta un metodo tradizionale e spesso affidabile per l'arricchimento delle frazioni di organelli, sebbene il metodo sia molto laborioso, richieda molto tempo e non sempre si ottengono frazioni pure [83].

L'abbondanza del materiale fibrillare nel muscolo cardiaco e lo stretto impacchettamento dei mitocondri IFM tra le fibre contrattili, rende questo tipo di mitocondrio difficile da isolare. Esperimenti di microscopia elettronica hanno mostrato che la preparazione con omogeneizzatore di *Potter*, non sia sufficiente a liberare i IFM dall'interno delle miofibrille (Figura 13 pannello A). Per questi motivi, per l'estrazione dei mitocondri IFM, è necessario l'impiego anche di proteasi in grado di digerire il materiale fibrillare del muscolo cardiaco [84].

Brevemente, l'isolamento dei SSM viene ottenuto attraverso la rottura meccanica con omogeneizzatore di *Potter* del tessuto, seguito da centrifugazioni differenziali, mentre i IFM sono isolati a partire dal tessuto privato dei SSM con l'aggiunta di proteasi *Nagarse* e con rottura meccanica del tessuto residuo per il rilascio dei IFM (Figura 13 pannello B), seguiti poi da centrifugazioni differenziali. Nei pannelli C e D della Figura 13 sono mostrate le immagini di microscopia elettronica dei mitocondri SSM e IFM isolati [84].

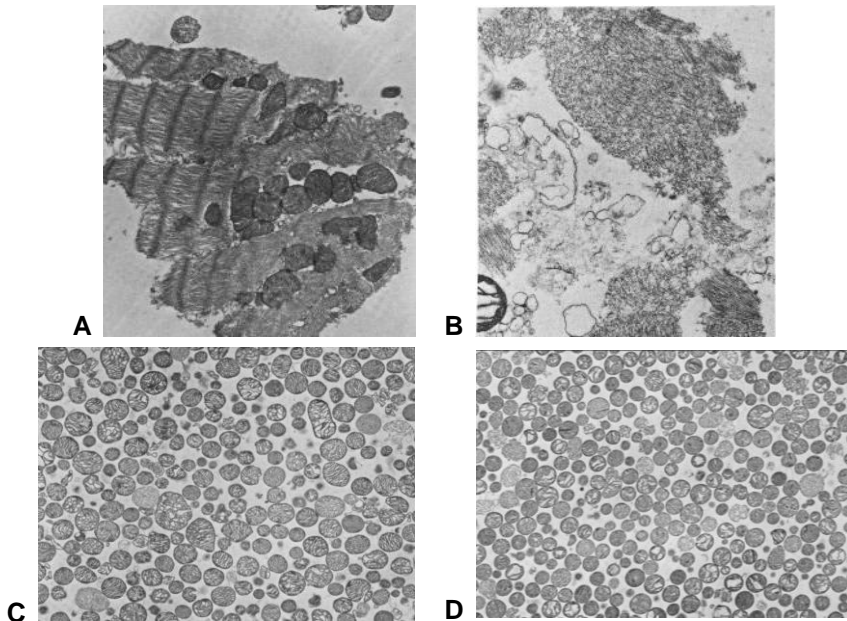


Figura 13: Immagini di microscopia elettronica, il pannello A rappresenta il tessuto cardiaco di ratto dopo l'utilizzo del solo omogeneizzatore di Potter, il pannello B mostra il tessuto dopo l'impiego combinato di proteasi batteriche e omogeneizzatore di Potter, è evidente l'assenza dei mitocondri IFM e la disgregazione delle miofibrille. I pannelli C e D rappresentano rispettivamente i mitocondri SSM ed IFM isolati. Le immagini sono tratte e modificate dal lavoro di Palmer et al [84].

Ulteriori miglioramenti al frazionamento cellulare, mediante l'utilizzo di centrifughe, sono stati introdotti con il lavoro di Ferreira et al. il quale abbina l'impiego delle proteasi, all'uso delle separazione con ultracentrifuga su gradiente di densità. Per migliorare la purezza delle frazioni, il tessuto viene trattato direttamente con proteasi per poi essere rotto meccanicamente con omogeneizzatore di *Potter* e separato con ultracentrifuga su gradiente di densità. In questo modo si ottengono due bande nel tubo di centrifuga, ognuna corrispondente ad una subpopolazione mitocondriale [82].

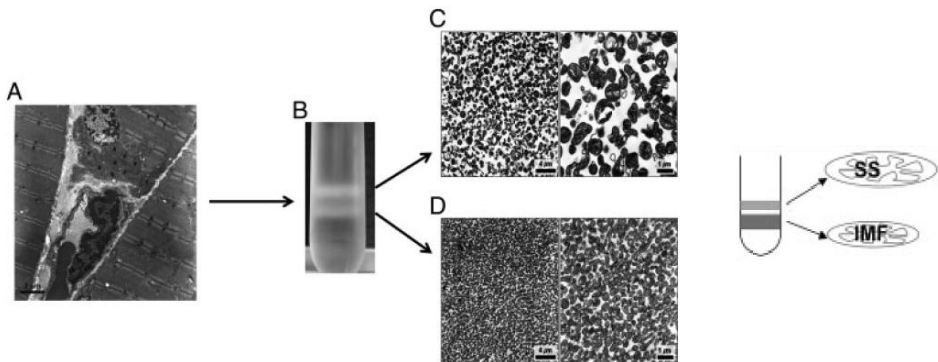


Figura 14: Sub frazionamento con gradiente di densità. Il pannello A mostra una microscopia elettronica di una sezione longitudinale di muscolo scheletrico gastrocnemio; il pannello B mostra il tubo di centrifuga con due bande visibili che corrispondono alle subpopolazioni mitocondriali isolate su gradiente di Percoll dopo l'ultracentrifuga; il pannello C e D mostrano un'immagine di microscopia elettronica dopo isolamento dei mitocondri SSM e IMF rispettivamente. A destra dell'immagine vi è un disegno schematico del tubo di centrifuga con le bande dei mitocondri subracolemmali (SS) e intermiofibrillari (IMF) isolati. Immagine modificata dal lavoro di Ferreira et al [82].

5 SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro consiste nel comprendere le basi molecolari dell'invecchiamento del muscolo cardiaco in un modello fisiologico d'invecchiamento. Il modello animale impiegato è un ratto *Sprague Dawley*, il quale non ha predisposizione allo sviluppo di patologie cardiache; la loro vita media è di 25 mesi [85] e, per avvalorare il nostro studio, abbiamo deciso di studiare, oltre che ratti di 6 e 22 mesi, anche un invecchiamento più avanzato con ratti di 30 mesi.

Per lo studio delle basi molecolari, abbiamo impiegato la tecnica 2D-DIGE (*two dimensional Differential In Gel Electrophoresis*) per individuare cambiamenti a livello del profilo proteomico cardiaco durante l'invecchiamento; è stata eseguita una prima analisi 2D-DIGE sugli estratti proteici da muscolo cardiaco in toto e, successivamente, è stata fatta una valutazione della dinamicità mitocondriale (fusione, fissione e autofagia) con l'analisi di *immunoblotting*, ovvero sono state valutate le espressioni differenziali di alcune specifiche proteine mitocondriali.

Dato il crescente interesse nei cambiamenti mitocondriali durante l'invecchiamento, sono stati isolati i mitocondri dai cuori di ratto in corso d'invecchiamento. La nostra attenzione è volta ad indagare il ruolo dei mitocondri nell'invecchiamento, in particolare in relazione alla loro localizzazione subcellulare. La tecnica impiegata per l'isolamento dei mitocondri è la tecnica classica di omogeneizzazione meccanica del tessuto e subfrazionamento cellulare con centrifughe differenziali e ultracentrifughe su gradiente di densità; essa ha permesso di isolare due subpopolazioni mitocondriali: i mitocondri subsarcolemmali, che si localizzano al di sotto del sarcolemma ed i mitocondri intermiofibrillari, che si trovano a stretto contatto con le miofibrille muscolari. A partire dall'estratto proteico mitocondriale è stata valutata la sua purezza ed è stata costruita una "mappa standard" per identificare le proteine dei mitocondri isolati. Successivamente è stata eseguita una seconda analisi 2D-DIGE sugli estratti proteici da mitocondri isolati per individuare i cambiamenti a livello proteico.

Riassumendo, per questo studio, ci siamo posti tre tipi di quesiti:

- Quali sono i cambiamenti nel proteoma di cuore di ratto durante l'invecchiamento? Vi sono dei possibili biomarcatori che ci indichino come monitorare l'invecchiamento per prevenirlo o come meglio trattarlo, per una sopravvivenza libera da malattia?
- Come si modificano i mitocondri nel muscolo cardiaco durante l'invecchiamento?
- Quali sono i cambiamenti nel proteoma mitocondriale di mitocondri subsarcolemmali ed intermiofibrillari durante l'invecchiamento?

6 MATERIALI E METODI

6.1 *Preparazione dei campioni, fase preanalitica*

I cuori di ratto sono stati prelevati dagli animali sacrificati e immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C . I cuori sono stati polverizzati con mortaio e pestello congelati, in modo da ottenere una polvere omogenea da poter suddividere in aliquote per gli esperimenti successivi.

Sono state prese tutte le precauzioni per evitare lo scongelamento del tessuto polverizzato durante la preparazione del campione; lo scongelamento promuove i processi degradativi dovuti alle protesi contenute nel tessuto, compromettendo quindi la qualità del risultato finale.

6.1.1 **Isolamento dei mitocondri**

In questo lavoro i mitocondri subsarcolemmali (SSM) e i mitocondri intermiofibrillari (IFM) sono stati isolati utilizzando il protocollo descritto da Palmer et al. [84] con l'aggiunta dell'ultracentrifuga alla fine del frazionamento cellulare, introdotta da Ferreira et al. [82], al fine di ottenere una migliore purificazione delle popolazioni mitocondriali. Queste tecniche di isolamento sono dette classiche, perché isolano i mitocondri dal tessuto per ottenere una frazione purificata dell'organello.

6.1.1.1 **Omogeneizzatore di Potter**

La prima fase della procedura di estrazione dei mitocondri consiste nell'omogeneizzare il tessuto con l'impiego dell'omogeneizzatore di Potter. Questo strumento è dotato di serbatoio ed è fornito con due pestelli: il pestello A, più aderente con distanza dal mortaio $0,0010'' \div 0,0030''$ e il pestello B, meno aderente con distanza dal mortaio $0,0030'' \div 0,0055''$ (dati forniti dalla casa produttrice Omogeneizzatori Dounce in vetro) (Figura 15). Il processo di omogeneizzazione viene iniziato con il pestello B, e portato a termine con il pestello A. Le membrane sono lacerate dalle forze frizionali che il pestello in vetro (con un movimento rotatorio manuale) esercita contro le pareti del mortaio in vetro; i mitocondri, avendo una dimensione ridotta, riescono da infilarsi nell'intercapedine, tra il pestello e il mortaio, evitando la rottura.



Figura 15: Immagine dei pestelli A e B e del mortaio di vetro che compongono l'omogeneizzatore di Potter.

Al tessuto polverizzato è stato aggiunto il Buffer A (250 mM saccarosio, 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EGTA, pH 7.4) con l'aggiunta di 1mM PMSF e omogeneizzato manualmente con omogeneizzatore di Potter.

6.1.1.2 Centrifugazioni differenziali e Ultracentrifuga

Per ottenere il frazionamento cellulare ed in particolare la frazione arricchita dei mitocondri subsarcolemmali ed intermiofibrillari, il tessuto omogeneizzato (omogenato) è stato sottoposto a centrifughe differenziali ed ad ultracentrifuga (Figura 16). La prima centrifuga è stata condotta a bassa velocità (1000 xg per 5 minuti a 4°C) in modo che i debris cellulari, le fibre non disgregate ed i nuclei, venissero precipitati nel pellet. Il sovrinatante è stato quindi prelevato e sottoposto alla seconda centrifuga condotta a 16000 xg per 20 minuti a 4°C in modo che i mitocondri SS venissero precipitati nel pellet. Il pellet con i mitocondri SS è stato poi risospeso in Buffer A e sottoposto ad ultracentrifuga (95000 xg per 30 minuti a 4°C) su un gradiente di Percoll 50% v/v. Il primo pellet è stato risospeso in Buffer B (100 mM KCl, 50 mM MOPS, pH 7.4) con l'aggiunta di 2 mM EGTA, 0.2% BSA e Nagarse) ed immediatamente omogeneizzato con omogeneizzatore di Potter. La Nagarse, è una proteasi batterica in grado di digerire le fibrille muscolari, è stata aggiunta alla concentrazione finale di 5 mg/g di tessuto di partenza. La digestione delle miofibrille e l'ulteriore omogeneizzazione permettono il rilascio dei mitocondri intermiofibrillari. Al pellet dopo l'omogeneizzazione sono stati aggiunti due volumi di Buffer B e sottoposto a centrifugazione di 1000 xg per 10 minuti a 4°C per eliminare le parti non digerite e dopodiché il sovrinatante è stato centrifugato a 16000 xg per 20 minuti a 4°C in modo che i mitocondri IF venissero precipitati nel

pellet. Il pellet con i mitocondri IF è stato poi risospeso in Buffer B e sottoposto ad ultracentrifuga (95000 xg per 30 minuti a 4°C) su un gradiente di Percoll 50% v/v.

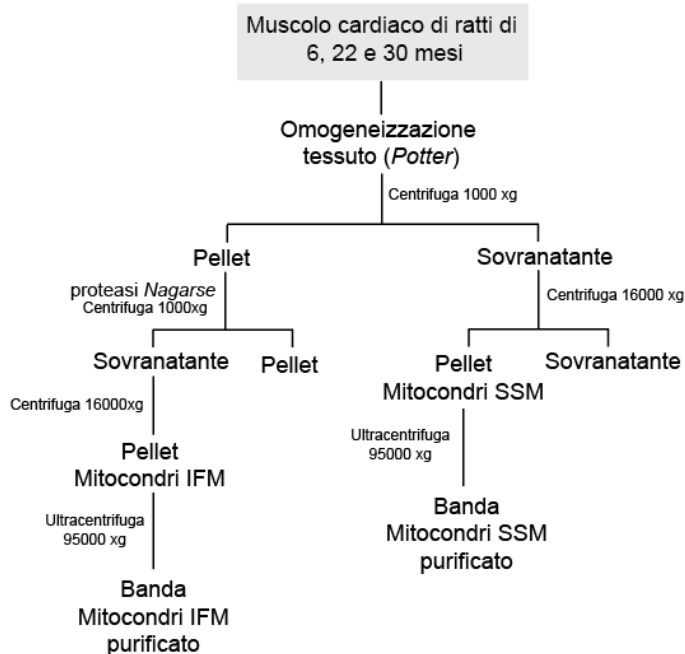


Figura 16: Schema del protocollo di centrifugazioni differenziali effettuate per l'isolamento dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM).

Dopo l'ultracentrifuga le bande ottenute, corrispondenti alle popolazioni mitocondriali, sono state raccolte e sottoposte a due centrifughe a 16000 xg per 20 minuti a 4°C per eliminare il residuo di percoll contenuto nelle frazioni. Per i lavaggi dei pellet sono stati utilizzati il buffer A per i mitocondri SS e buffer B per i mitocondri IF. Prima della seconda centrifuga di "lavaggio", le frazioni sono state divise in due aliquote, una destinata all'analisi con 2D-DIGE ed *immunoblotting* e l'altra per la misura l'attività della citrato sintasi.

6.2 Tecnica 2D-DIGE

La proteomica differenziale utilizza la combinazione di quattro processi principali: l'elettroforesi di proteine su gel bidimensionale, l'analisi d'immagine computerizzata, la spettrometria di massa e la bioinformatica.

La tecnica 2D-DIGE basata sulla separazione bidimensionale delle proteine consente la separazione, all'interno dello stesso gel bidimensionale, di 2 o più campioni proteici pre-marcati [86]. La marcatura viene effettuata usando fluorofori della famiglia delle cianine, denominati Cy2, Cy3 e Cy5, che hanno lunghezze d'onda d'eccitazione e di emissione diverse; esse sono molecole che contengono un gruppo estere N-idrossisuccinilico, che è in grado di formare legami covalenti con il carbonio ϵ del gruppo amminico delle lisine senza modificare le proprietà chimico-fisiche delle proteine stesse.

Il primo vantaggio derivato dall'introduzione dei fluorofori è la possibilità di far migrare due campioni, marcati con due fluorofori differenti, all'interno di uno stesso gel. Il secondo è l'introduzione dello standard interno; quest'ultimo viene preparato miscelando quantità uguali di ogni estratto proteico facente parte del disegno sperimentale, viene poi marcato con un fluoroforo e fatto migrare unitamente a ciascun campione marcato con un fluoroforo differente. Questo permette, nella successiva fase di analisi, di effettuare una normalizzazione delle spots proteiche per eliminare le eventuali variazioni sperimentali ed evidenziare quelle che sono le reali variazioni biologiche.

6.2.1 Estrazione proteica

Lo scopo dell'estrazione proteica è portare alla completa disaggregazione e denaturazione le proteine del campione biologico in esame. I reagenti utilizzati per la solubilizzazione sono Urea e Tiourea, agenti denaturanti responsabili della rottura dei legami idrogeno e il CHAPS, detergente zwitterionico che solubilizza le proteine idrofobiche e minimizza l'aggregazione proteica. Sono stati solubilizzati circa 20 mg di tessuto polverizzato per ogni campione in un volume di tampone di lisi pari a 15 volte il peso del tessuto. La composizione del tampone di lisi è: Tiourea 2M, Urea 7M, Tris HCl 10mM pH 8.5, CHAPS 4%, PMSF 1mM. Per assicurare la completa solubilizzazione delle proteine, i frammenti di tessuto in tampone di lisi sono stati disgregati con sonicatore ad immersione per 15 cicli da 10 secondi. L'estratto è stato centrifugato a 12000 g per 20 minuti per l'eliminazione dell'eventuale materiale non solubilizzato, il sovranatante contenente le proteine solubilizzate è stato prelevato e conservato a -80°C fino all'analisi.

6.2.2 Preparazione dei campioni alla marcatura

Gli estratti proteici sono stati sottoposti a *clean-up* (*2D Clean-Up Kit, GE Healthcare*), una precipitazione selettiva delle proteine che permette di eliminare tutte le sostanze non proteiche (come detergenti, sali, lipidi, fenoli e acidi nucleici) che interferirebbero con la marcatura e con la separazione bidimensionale proteica.

Il pH degli estratti è stato misurato con una cartina tornasole ed aggiustato, mediante l'aggiunta di pochi μL di NaOH, ad un valore di pH compreso tra 8 e 9.

Successivamente, gli estratti sono stati dosati per il loro contenuto proteico, con l'impiego del *PlusOne 2D Quant Kit, GE Healthcare*. Questo dosaggio permette di misurare la concentrazione proteica anche in presenza di elevate quantità di urea e tiourea, anfoline, detergenti e riducenti, contenuti nel tampone di lisi. Dopo precipitazione selettiva le proteine vengono messe a contatto con una soluzione alcalina contenente ioni rame che si legano alle proteine presenti; gli ioni rame rimasti liberi in soluzione reagiscono con una seconda soluzione (*Working color reagent*) con lo sviluppo di colore il quale risulta essere inversamente proporzionale alla quantità di proteina contenuta. La concentrazione proteica del campione viene ottenuta per confronto con i valori di assorbanza della curva standard di BSA.

6.2.3 Marcatura dei campioni

Per la marcatura degli estratti proteici vengono impiegati i fluorofori (*CyDye, GE Healthcare*). Prima dell'uso devono essere ricostituiti in dimetilformamide (DMF).

In questo lavoro, per la marcatura, si è adottato il protocollo quantitativo del *Minimal labeling*, il quale richiede: un pH tra 8 e 9 e una concentrazione proteica tra $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Il rapporto tra proteine e fluoro foro è pari a $50 \mu\text{g}$ di estratto proteico per 400 pmol di CyDye. La reazione di marcatura viene condotta per 30 minuti al buio in ghiaccio, dopodiché viene bloccata con un eccesso di Lisina 10 mM .

Per ottenere un'analisi quantitativa viene creato lo standard interno, un pool costituito da una miscela di uguali quantità provenienti da ciascun estratto proteico facente parte dell'esperimento, il quale viene marcato con Cy3, mentre i campioni vengono marcati con Cy5. Dopo la marcatura è stato aggiunto un volume di 2X

sample Buffer (Urea 8 M, DTT 130 mM, CHAPS 4%, anfoline pH 3-10 1%) pari al volume di ogni campione.

6.2.4 Prima dimensione

Per la prima dimensione sono state utilizzate *IPG strip* (*Immobiline Dry Strip Gel*, *GE Healthcare*), sottili strisce di plastica sulle quali è stato polimerizzato un gel di poliacrilamide contenente immobiline (le strip hanno un gradiente di pH 3-10 non lineare e sono lunghe 24 cm). Prima dell'uso le strip devono essere reidratate con il tampone di reidratazione (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2%, DTT 65 mM, anfoline 0.5%, e blu di bromofenolo) al quale vengono aggiunti 40 µg di campione marcato con Cy5 e 40 µg di standard interno marcato con Cy3. Il volume di tampone necessario per la reidratazione delle strip da 24 cm è pari a 450 µL.

L'isoelettrofocalizzazione è condotta sull'*IPGphor* (*GE Healthcare*) a voltaggi molto elevati (fino a 8000 V) e correnti molto basse (fino ad un massimo di 50 µA per IPGstrip). Gli *strip holder* sono appositi contenitori in ceramica che hanno ad ogni estremità un elettrodo, in ognuno di essi viene alloggiata una strip; grazie al contatto del gel con gli elettrodi è possibile condurre un'isoelettrofocalizzazione (IEF). Il protocollo di IEF utilizzato è mostrato in Tabella 1. La corsa dura 27 ore, è suddivisa in 9 step e viene condotta a 20°C. La corsa è stata fermata al raggiungimento di 80000 Volt ora totali.

STEP	VOLT (V)	ORE
1	30	6
2	60	6
3	200	1
4	500	1
5	1000	½
6	2000	½
7	3000	½
8	3000-8000	4
9	8000*	10*

Tabella 1: protocollo utilizzato per l'isoelettrofocalizzazione; *La corsa si ferma quando si raggiungono gli 80000 volt-ora totali.

6.2.5 Equilibratura delle strip

Dopo la separazione in prima dimensione, le strip devono essere equilibrate per favorire il trasferimento delle proteine dal gel della strip al gel della seconda dimensione.

L'equilibratura è divisa in due fasi: la prima pone le strip a contatto con il tampone di equilibratura contenente DTT 65 mM per 15 minuti, la seconda con il tampone di equilibratura contenente Iodoacetamide 135 mM per 8 minuti.

Il tampone di equilibratura è composto da Urea 6 M, glicerolo 20%, 375 mM Tris HCl pH 8.8, SDS 2%. L'Urea, insieme al glicerolo, riduce l'effetto di elettroendosmosi che interferirebbe con il trasferimento in seconda dimensione delle proteine. L'SDS si lega alle proteine in modo proporzionale alla loro massa, in modo che la separazione elettroforetica delle proteine in presenza di SDS avvenga in base alla massa molecolare. L'SDS denatura le proteine e le riveste di cariche negative consentendo la loro migrazione verso l'anodo. Il DTT preserva lo stato di riduzione dei ponti disolfuro e la Iodoacetamide alchila i gruppi tiolici delle proteine, prevenendo la loro riossidazione durante la seconda dimensione.

6.2.6 Seconda dimensione

I gel di seconda dimensione hanno dimensioni pari a 25 cm x 20 cm; la soluzione di Running gel è costituita da 12% Acrilamide/Bisacrilamide a partire da una soluzione stock 40% T, 2.5% C, Tris HCl 375 mM, pH 8.8, acqua ultrapura fino a volume. La miscela viene degasata per 20 minuti per favorire l'eliminazione dell'ossigeno che interferirebbe con la polimerizzazione del gel. Infine sono stati aggiunti iniziatore e catalizzatore della polimerizzazione: rispettivamente APS (ammonio persolfato) e TEMED (N,N,N,N'- tetramethylethylene-diamine) con concentrazioni finali rispettivamente pari a 0.5% e 0.03%. La polimerizzazione dei gel avviene in coppie di vetri a bassa fluorescenza (separati da spaziatori di 1 mm). Dopo l'equilibratura, le strip vengono tamponate con carta da filtro per eliminare la soluzione di equilibratura in eccesso. Con una pipetta Pasteur è stata depositata una soluzione di agarosio allo 0,5% in tampone di corsa sulla sommità del gel, per poter far aderire le strip orizzontalmente al gel di seconda dimensione.

La seconda dimensione viene condotta in tampone di corsa per SDS-PAGE (Tris HCl 25 mM, glicina 0,192 M, SDS 0,1%). Il protocollo utilizzato per la seconda dimensione di 12 gel è mostrato in tabella (Tabella 2).

STEP	CORRENTE	ORE
1°	24 mA	2
2°	60 mA	1
3°	180 mA	Over night*

Tabella 2: protocollo utilizzato per l' SDS-PAGE. La corsa è termina quando il blu di bromofenolo fuoriesce dal gel (*).

6.2.7 Acquisizione delle immagini

L'acquisizione delle immagini consiste nella scansione dei gel con un particolare scanner a doppio raggio laser (*Typhoon 9200 variable mode imager, GE Healthcare*) in grado di eccitare i fluorofori. Le proteine marcate con il Cy3 sono state visualizzate utilizzando il laser verde (532 nm) con filtro di emissione a 580 BP, quelle marcate con Cy5 con laser rosso (633 nm) con filtro di emissione a 670 BP. Lo scanner acquisisce due immagini per ciascun gel, una per lo standard interno marcato con Cy3 e l'altra per il campione marcato con Cy5. Inoltre è stato impostato il parametro PMT (fotomoltiplicatore), a 490 per il Cy3 e a 480 per il Cy5, il quale permette di controllare la saturazione delle macchie proteiche visualizzate sulla mappa (la risoluzione è stata impostata a 100 micron).

6.2.8 Analisi computerizzata mediante il software DeCyder 2D

Il software utilizzato per l'analisi delle immagini dei gel ottenute con lo scanner Typhoon è il *DeCyder 2D Software (versione 7.2)*, che si compone dei seguenti moduli:

- Imager Loader
- DIA (Differential In-gel Analysis)
- BVA (Biological Variation Analysis)
- Batch Processor
- EDA (Extended Data Analysis)

Le immagini dei gel vengono importate nel *DeCyder 2D database* mediante l'utilizzo dell'apposito modulo *Image Loader*.

6.2.8.1 Il modulo DIA (Differential In-gel Analysis)

Il modulo DIA permette di effettuare: il rilevamento delle macchie proteiche (detta *spot detection*), la sottrazione del *background* e la quantizzazione e normalizzazione del volume delle macchie proteiche.

Il modulo DIA quantizza il volume di ogni macchia proteica, il quale corrisponde alla somma dell'intensità dei pixel, che si trovano all'interno dei confini di ciascuna macchia; il modulo ne calcola inoltre l'abbondanza espressa come rapporto tra il volume della macchia marcata con Cy5 e la rispettiva marcata con Cy3 (standard interno). Il software sottrae al volume di ogni macchia il valore di background che consiste nel più basso valore di decimo percentile dei pixel presenti sul confine di ogni macchia. La *spot detection* è effettuata in modo automatico, essa consente che impurità non proteiche oppure eterogeneità del gel non vengano considerate come macchie proteiche. La rimozione avviene applicando particolari filtri raggruppati nella funzione *Exclude Filter* (*Max slope*>1, *Area*<300, *Volume*<22000).

6.2.8.2 Il modulo BVA (Biological Variation Analysis)

Il modulo BVA permette di eseguire: il *Matching* multiplo tra gel, la comparazione e l'analisi statistica delle abbondanze proteiche tra i gruppi sperimentali per la rilevazione di spot significativamente variate.

Viene scelto, automaticamente o dall'operatore, un gel chiamato *Master Gel*, che contenga il maggior numero di macchie proteiche. Tutti i gel dell'esperimento sono poi confrontati con il master gel, in modo che ciascuna macchia di ciascun gel risulti associato alla corrispondente macchia nel *Master Gel* (*Gel Matching*). Se la migrazione della macchia in gel diversi non dovesse risultare identica, è possibile utilizzare la funzione *landmarking* per associare manualmente le macchie e garantire l'accuratezza del *gel-to-gel matching*. L'algoritmo utilizzato per il *Matching* unisce inizialmente le spots grandi e meglio definite (*matching* di primo livello), successivamente, confrontando la posizione e la grandezza di macchie vicine, completa il *matching* su tutto il gel (*matching* di secondo livello). L'operatore

manualmente effettua un controllo per eliminare eventuali errori nel *matching* (*mismatch*).

Il modulo *Batch Processor* implementa le funzioni dei moduli DIA e BVA svolgendo in modo completamente automatizzato la *spot detection*, la quantizzazione ed il *matching* delle macchie.

6.2.8.3 Il modulo EDA (Extended Data Analysis)

Questo modulo è suddiviso in tre parti chiamate *Setup*, *Calculation* e *Results*.

Nella fase di *Setup* vengono importati i dati dal BVA, i gel importati vengono assegnati ad un gruppo sperimentale. Con questi dati viene creato il *Base set* che rappresenta l'insieme dei dati sui quali si baseranno le analisi successive. I parametri applicati per la creazione del *Base set* sono: *% of spot maps where protein is present: > 90*, serve per includere solo le macchie presenti nel 90% dei gel e *Remove unassigned spot maps* per eliminare i gel che non sono stati assegnati ad alcun gruppo sperimentale.

Nella seconda fase quella di *Calculation*, vengono impostate le analisi statistiche che si desiderano eseguire sul *Base set*. Le analisi statistiche sono di tre tipologie: *Differential expression analysis*, *Principal components analysis* e *Hierarchical clustering*.

Abbiamo utilizzato la funzione *Differential expression analysis* che permette di eseguire il test statistico One way Anova seguito dal *Tukey's multiple comparison test* per determinare le macchie differenzialmente espresse tra i gruppi sperimentali usato per l'analisi dei profili proteomici dei cuori di ratto e lo Student's T test per l'analisi dei profili degli estratti mitocondriali. Entrambe le analisi forniscono valori di significatività statistica (*p value*). Per mantenere il tasso di errore complessivo il più basso possibile, è stata applicata la correzione FDR (*false discovery rate*) [87]. Sono state considerate statisticamente variate le differenze che presentavano un *p value* inferiore a 0,01. Per ogni macchia differenzialmente variata tra i gruppi sperimentali, è possibile calcolare l'*Average Ratio* anche conosciuto come *Fold change*. L'*Average Ratio* è calcolato per individuare quanto l'espressione proteica sia cambiata tra due gruppi sperimentali; esso indica il ratio del volume standardizzato tra i due gruppi. L'*Average ratio* è calcolato come segue:

$$\text{Average Ratio} = \frac{ma}{mb}$$

Dove “ma” ed “mb” indicano il valore medio del valore d’espressione del gruppo a o del gruppo b.

La *Principal components analysis (PCA)* è un calcolo utilizzato nell’ambito della statistica multivariata che ha lo scopo di semplificare le complesse variabili caratteristiche di un sistema, proiettandole in un nuovo sistema cartesiano dove vengono ordinate in ordine decrescente di varianza. Nel nostro caso essa permette di visualizzare la distribuzione dei gel e delle macchie proteiche del disegno sperimentale.

Lo *Hierarchical clustering* è un metodo che permette di creare un dendrogramma in cui i gruppi sperimentali vengono raggruppati sulla base della somiglianza dei livelli di espressione proteica globale (*Pearson correlation*).

Infine nella sezione dei *Results* vengono visualizzati i risultati ottenuti dalle sezioni precedenti.

6.2.8.3.1 Breve descrizione delle analisi statistiche

L’analisi in componenti principali o PCA, dall’inglese *principal component analysis*, è una tecnica per la semplificazione dei dati utilizzata nell’ambito della statistica multivariata. Lo scopo primario di questa tecnica è la riduzione di un numero più o meno elevato di variabili (rappresentanti altrettante caratteristiche del fenomeno analizzato) in alcune variabili latenti. Ciò avviene tramite una trasformazione lineare delle variabili che proietta quelle originarie in un nuovo sistema cartesiano nel quale la nuova variabile con la maggiore varianza viene proiettata sul primo asse (PCA1), la variabile nuova, seconda per dimensione della varianza, sul secondo asse (PCA2) e così via. La riduzione della complessità avviene limitandosi ad analizzare le principali (per varianza) tra le nuove variabili [46].

Il clustering gerarchico (*Hierarchical cluster*) funziona costruendo una gerarchia di dati descritta attraverso un albero tassonomico (dendrogramma). La vicinanza tra i cluster è determinata dalla somiglianza delle media delle espressioni delle macchie in un singolo gel utilizzando il metodo *Average linkage* [88].

L’analisi della varianza (ANOVA) è un insieme di tecniche statistiche facenti parte della statistica inferenziale che permettono di confrontare due o più gruppi di dati

confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi; in particolare la One Way Anova è utilizzata per confrontare almeno tre gruppi. L'ipotesi nulla solitamente prevede che i dati di tutti i gruppi abbiano la stessa origine, ovvero la stessa distribuzione stocastica, e che le differenze osservate tra i gruppi siano dovute solo al caso [46].

6.3 Identificazione Proteica

Per l'identificazione proteica abbiamo utilizzato la separazione bidimensionale in gel, la colorazione con colorante Lavapurple, compatibile con la massa, quindi l'escissione delle macchie dal gel, per poi procedere con l'identificazione con spettrometria di massa MALDI delle proteine contenute nei frammenti di gel. Dalle mappe preparative, oltre alle macchie risultate variate dall'analisi 2D-DIGE, sono state prelevate la maggior parte delle macchie visibili con la colorazione Lavapurple per creare una mappa standard. Nel caso delle mappe preparative per gli estratti proteici dai mitocondri isolati, è stata creata prima la mappa standard per verificare la possibilità di identificare le proteine mitocondriali e poi si è passato all'analisi 2D-DIGE.

6.3.1 Mappe preparative

Per allestire le mappe preparative sono stati utilizzati estratti proteici, ottenuti con la procedura impiegata per l'analisi 2D-DIGE (come descritto precedentemente). Per entrambe le mappe preparative, del muscolo cardiaco e dei mitocondri, è stato creato un pool composto da un uguale quantità proteica dei campioni che compongono l'esperimento. Sono stati fatti tre gel preparativi, ognuno con un carico di 280 µg di proteine.

6.3.1.1 Prima dimensione

Per la prima dimensione sono state utilizzate IPG strip (*Immobiline Dry Strip Gel, GE Healthcare*) con gradiente immobilizzato di pH 3-10 non lineare e lunghe 24 cm. Le strip sono state reidratate con il tampone di reidratazione al quale sono stati aggiunti 280 µg di pool. Il protocollo di IEF utilizzato è mostrato in tabella (Tabella 3). La corsa dura 27 ore, è suddivisa in 9 step e viene condotta a 20°C. La corsa è stata fermata al raggiungimento degli 80000 Volt ora totali.

STEP	VOLT (V)	ORE
1	30	6
2	60	6
3	200	1
4	500	1
5	1000	1
6	2000	1
7	3000	1
8	3000-8000	5
9	8000*	10*

Tabella 3: protocollo utilizzato per l'isolettrofocalizzazione; *La corsa si ferma quando si raggiungono gli 80000 volt-ora totali.

Dopo la separazione in prima dimensione, le strip sono state equilibrate con tampone di equilibratura con l'aggiunta di DTT e Iodoacetammide, come descritto sopra.

6.3.1.2 Seconda dimensione (SDS-PAGE)

I vetri "sotto" (ovvero, della coppia di vetri, quello con gli spaziatori) usati per la polimerizzazione dei gel preparativi, devono essere ricoperti da una soluzione di Bind Silane (γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane) che permette al gel di poliaccrilamide di legarsi in modo covalente alla superficie del vetro; il loro fissaggio è fondamentale per la colorazione e per il successivo prelievo automatico delle macchie dal gel per l'identificazione.

Su ogni vetro vengono distribuiti uniformemente 7 ml di soluzione bind silane (80% etanolo, 1% acido acetico, 0,2% bind silane ed acqua bidistillata). Dopo che la soluzione è evaporata si posizionano dei marker, ovvero due talloncini di carta bianca adesiva che serviranno come riferimenti per le fasi successive ed in particolare per la creazione della pick list.

La polimerizzazione dei gel e l' SDS-PAGE vengono eseguite come descritto nel dettaglio precedentemente.

6.3.1.3 Colorazione con Lava Purple

Per poter prelevare dal gel le macchie di interesse, è necessario poterle visualizzare, con l'utilizzo di un colorante che si lega in modo reversibile alle proteine, per non interferire con la successiva identificazione mediante

spettrometria di massa. Il *LavaPurple*[™] è basato su un piccolo composto fluorescente (epicocconone, un prodotto naturale biodegradabile) che si lega reversibilmente ai residui di lisina, arginina e istidina di proteine e peptidi per produrre un prodotto fluorescente di colore rosso intenso.

La colorazione si divide in quattro *fasì*: fissaggio, colorazione, lavaggio e stabilizzazione, ad ogni fase corrisponde un tempo di incubazione e una soluzione nella quale vengono immersi i gel preparativi, qui di seguito elencati:

- Fissaggio: 10g di acido citrico e 150 ml di etanolo e 850 ml di acqua bidistillata, pH 2,3; incubazione *over night*;
- Colorazione: il Lava purple viene diluito di 200 volte in una soluzione contenete 6,2 g di acido borico e 3,85 g di NaOH, 1 litro di acqua bidistillata, pH 10,5; incubazione 1 ora;
- Lavaggio: 150 ml di etanolo e 850 ml di acqua bidistillata; incubazione 30 minuti; il lavaggio serve per eliminare l'eccesso di soluzione di colorazione e diminuire il *background*.
- Stabilizzazione: 10 g di acido citrico, 150 ml di etanolo e 850 ml di acqua bidistillata, pH 2,3; incubazione 30 minuti.

6.3.1.4 Acquisizione e analisi delle immagini

Una volta completata la procedura della colorazione è possibile acquisire le immagini dei gel preparativi; la scansione dei gel è stata eseguita con *Typhoon 9200 variable mode imager (GE Healthcare)* e sono stati impostati i seguenti parametri: la lunghezza d'onda per il laser verde (532 nm) con filtro di emissione a 560 LP e PMT (fotomoltiplicatore) a 520, risoluzione 100 micron.

Per l'analisi delle immagini e la creazione della lista delle macchie da prelevare dai gel preparativi (*pick list*), è stato utilizzato il *Software DeCyder 2D*. Le immagini sono state importate nel *database* mediante il modulo *Image Loader* ed inserite nel corrispondente esperimento 2D-DIGE, in modo da poter utilizzare un unico *master gel*.

Nel modulo DIA viene eseguita la *Spot detection* e vengono riconosciuti i *marker* (i talloncini bianchi) posizionati sul vetro, che diventeranno per il software dei *reference* (R1 e R2) ovvero le origini dalle quali esso calcola le coordinate delle posizioni delle macchie da prelevare.

Nel modulo BVA viene eseguito il *matching* delle macchie con il *master gel* e quindi creata la *pick list* che contiene le coordinate (x,y) delle macchie del gel rispetto ai *reference*. La *pick list* viene utilizzata dallo *spot picker* per il prelievo automatico delle macchie.

6.3.1.5 Spot Picker

L'Ettan Spot Picker è uno strumento che esegue il prelievo automatizzato delle macchie da gel bidimensionali. Il prelievo delle macchie (*picking*) è definito come la rimozione del materiale (*plug*) di interesse dai gel di poliacrilamide e la sua erogazione in una piastra microforata da 96 pozzetti.

L'*input* necessario per eseguire il prelievo delle macchie è dato da un gel e dal corrispondente file di testo contenente le informazioni sulla posizione di ciascuna macchia.

Vengono fatti riconoscere, in modo semi-automatico al *software* associato allo *spot picker* i *marker* posizionati sul gel, mentre il prelievo delle macchie è interamente automatico. I gel devono essere ben fissati al vetro per consentire un prelievo accurato ed efficace. La *pick list* è un file di testo che contiene le coordinate X-Y delle macchie che si intendono prelevare. Le coordinate X-Y date dalla *pick list*, sono convertite, in base alla posizione dei *marker* nel gel, in coordinate reali dallo *spot picker*, fornendo così la posizione esatta del prelievo. Dopo l'escissione dal gel, i *plug* vengono erogati nelle piastre microforate insieme ad un volume d'acqua ultra filtrata. L'efficienza di prelievo è superiore al 99,86%.

6.3.2 Spettrometria di massa

Le macchie di interesse vengono prelevate dal gel e messe a contatto con proteasi specifiche. Il digerito proteico, caratterizzato da un pattern specifico di peptidi, costituisce "l'impronta digitale" della proteina. L'analisi del digerito, mediante il microsequenziamento dei peptidi, consente di identificare la proteina e, inoltre, di verificare la presenza di modificazioni post-traduzionali.

6.3.2.1 Digester

Le piastre microforate, utilizzate per la raccolta dai *plug*, hanno due caratteristiche: la prima è la presenza, sul fondo di ogni pozzetto, di un piccolo foro, per eliminare i liquidi, (il *digester* li aspira dopo aver creato il vuoto); la seconda è il coperchio, il

quale è ricoperto da una membrana tagliata a croce, su ogni pozzetto, in modo da proteggere i *plug*, ma che allo stesso tempo permette l'entrata dell'ago del *digester* per l'introduzione delle soluzioni.

L'acqua contenuta nelle piastre deve essere rimossa, posizionandola sulla cameretta a vuoto. Il *digester* pone 50 μ l, in ogni pozzetto della soluzione di lavaggio 50%, composta da metanolo e 50 mM Ambic (ammonio bicarbonato). L'Ambic serve per mantenere il pH basico, intorno a 8, cioè il pH ideale per l'azione della tripsina. Le piastre, automaticamente vengono posizionate nell'incubatore ed agitate per 20 minuti. L'operazione viene ripetuta per 4 volte. I lavaggi servono per eliminare le piccole molecole interferenti, come SDS, Sali, DTT, *Lava Purple*. Dopo i lavaggi sono posti 50 μ l in ogni pozzetto di aceto nitrile (ACN) puro, l'aceto nitrile disidratato i *plug* eliminando tutta la soluzione di lavaggio che contengono. Di nuovo le piastre sono posizionate nell'incubatore ed agitate per 20 minuti. Per eliminare l'aceto nitrile, le piastre vengono poste sulla cameretta a vuoto, la rimozione deve essere accurata in quanto inibitore dell'attività della tripsina. La tripsina è conservata a -80°C, viene messa in ghiaccio un'ora prima dell'utilizzo. Il *digester* è programmato per porre 30 μ l della soluzione di ambic 10 mM e tripsina (5 μ g/ml) per pozzetto e viene lasciata per un'ora a 4°C per permettere ai *plug* di reidratarsi favorendo l'entrata della tripsina nel gel. Le piastre vengono posizionate nell'incubatore e lasciate *over night* a 37°C temperatura e pH ottimali per l'azione della tripsina.

Il liquido di ogni pozzetto viene trasferito in piastre a bordo alto (non microforate). Per ogni pozzetto delle piastre microforate sono stati aggiunti 30 μ l di ACN in modo da far uscire tutti i peptidi rimasti nei *plug*, il liquido è stato raccolto in corrispondenza della piastra a bordi alti; sono stati aggiunti 30 μ l per pozzetto di acido formico all'1% per reidratare i *plug* e acidificare il campione. È stato ripetuto il passaggio con ACN e la raccolta del liquido. Dalla piastra a bordo alto il contenuto di ogni pozzetto è stato posto in provette numerate, secondo l'ordine della *pick list*. Le provette sono state messe nel concentratore *Speed Vac Concentrator (Savant)* per ridurre il volume del liquido fino a circa 5-10 μ l, così da aumentare la concentrazione dei peptidi nella soluzione. Il concentratore favorisce

l'evaporazione creando il vuoto ed imprime una lieve forza centrifuga per mantenere il liquido in fondo alla provetta.

I peptidi sono stati successivamente identificati dal nostro laboratorio di spettrometria di massa, con lo spettrometro di massa MALDI ToF-ToF.

6.3.2.2 Identificazioni con MALDI ToF-ToF

In proteomica il metodo più comune per l'identificazione delle proteine è il *fingerprinting* tramite massa peptidica (PMF), un processo in cui le masse dei peptidi di una singola proteina vengono ottenute tramite lo spettrometro di Massa. Una fase critica per il successo dell'esperimento di PMF è la digestione della proteina di interesse nei suoi peptidi; nell'approccio alla proteomica, questa viene ottenuta tramite digestione in gel utilizzando i *plug* raccolti con lo *spot picker*. Il PMF è reso possibile dal fatto che le proteine vengono digerite dalla tripsina in siti noti lungo lo scheletro carbonioso. La digestione delle proteine può essere eseguita con enzimi diversi, in base a questi la proteina sarà tagliata in siti differenti (se si utilizza la tripsina, la proteina sarà clivata nei siti contenuti arginina e lisina nella regione C-terminale). I peptidi vengono analizzati tramite MALDI TOF il quale produce una distribuzione dei peptidi in base al tempo di volo (TOF Time of flight) creando uno spettro di massa della miscela dei peptidi. Queste masse MALDI sono confrontate con quelle predette sulla base delle sequenze proteiche presenti in un *database* quest'ultimo è costituito da proteine note clivate in *silico* allo stesso modo in cui è stata clivata la proteina sconosciuta, creando una lista di massa di peptidi corrispondenti alle proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel *database* viene effettuata l'identificazione proteica.

6.4 Immunoblotting

Immunoblotting, noto anche come Western blotting, è una tecnica ben consolidata e ampiamente utilizzata per la rilevazione e l'analisi di proteine. Il metodo si basa sulla costruzione di un complesso proteico antigene-anticorpo, mediante il legame specifico di anticorpi contro proteine immobilizzate su membrana. Il rilevamento dell'anticorpo legato viene eseguito con diversi metodi. Il metodo

dell'*Immunoblotting* è stato descritto nel 1979 e da allora è diventato uno dei metodi più comunemente utilizzati nel campo della ricerca delle scienze della vita.

6.4.1 Preparazione dei campioni

Gli estratti proteici dei campioni in esame vengono preparati come per l'analisi 2D-DIGE, descritta precedentemente in modo dettagliato, senza la necessità dello step di *Clean-up*. Brevemente: il tessuto dopo essere stato polverizzato viene solubilizzato in tampone di lisi, sonicato e centrifugato a 12000 xg per 20 minuti. L'estratto proteico viene dosato con *2D Quant kit*. Per ogni campione viene prelevato un volume pari a 150 µg ed aggiunto un volume uguale di tampone di *loading* (Tris HCl, glicerolo 10%, SDS 2%, DTT 20mg/ml, Blu di bromo fenolo, pH 6.8). Ogni campione viene eseguito in triplicato, per ogni pozzetto vengono caricati 50 µg di proteine.

Vengono anche preparati due tipi di *marker* di pesi molecolari noti: il *Magic Marker (Invitrogen)* visibile solo in chemiluminescenza e il *BlueRay Prestained Protein Marker (10-180 kDa)* visibile ad "occhio nudo".

6.4.2 SDS-PAGE

Per l'elettroforesi monodimensionale è stato impiegato l'apparato *Hoefel™ SE 600 Series Vertical Electrophoresis Systems*.

Sono stati preparati stacking e running gel rispettivamente al 4% e al 10% o 12% o 16% di poliaccrilammide, a seconda del peso molecolare della proteina da testare.

La corsa elettroforetica è stata condotta ad amperaggio limitante, con correnti crescenti: 40 mA fino all'entrata dei campioni nello *stacking gel*, 60 mA fino all'entrata dei campioni nello *running gel*, 100 mA fino alla fuoriuscita del blu di bromo fenolo dal *running gel*.

6.4.3 Trasferimento su membrana

Il trasferimento delle proteine è avvenuto su membrane di PVDF, con porosità di 0,45 micron (*Hybond™-p pvdf* membrane, Amersham), in condizioni di amperaggio costante (300 mA) per 3 ore e 30 minuti a 4°C.

6.4.4 Colorazione totale con Sypro Ruby

Dopo il trasferimento la membrana è stata colorata con il colorante fluorescente *SYPRO Ruby protein blot stain*. La colorazione proteica totale permette la

valutazione dell'efficienza del trasferimento e la successiva normalizzazione, nella fase di analisi, del segnale chemiluminescente dell'anticorpo sul carico proteico effettivo. La procedura consiste nel fissare le proteine sulla membrana con una soluzione di fissaggio composta da 7% acido acetico e 10% metanolo in acqua ultrapura per 15 minuti. Quattro lavaggi da 5 minuti con acqua ultrapura. Colorazione delle proteine legate alla membrana con *Sypro Ruby protein blot stain* per 15 minuti. Quattro lavaggi da 1 minuto con acqua ultrapura.

L'immagine della colorazione totale viene visualizzata con scanner laser Typhoon 9200. Il colorante Sypro ha due lunghezze di eccitazione una a 280 nm e una a 450 nm ed ha un'emissione a 618 nm.

6.4.5 Incubazione della membrana con Anticorpi primari

Le membrane vengono incubate nella soluzione di bloccaggio (5% BSA in TBS-T composto da 20 mM Tris HCl, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6) per 1 ora a temperatura ambiente in lenta agitazione. L'anticorpo primario scelto viene diluito in una soluzione di BSA al 5% e incubato *over night* a 4°C.

Le membrane sono state lavate per tre volte con TBS-T, quindi incubate con l'anticorpo secondario, coniugato con la perossidasi di rafano, viene diluito in una soluzione di BSA al 2,5% e incubato per circa un ora a temperatura ambiente in lenta agitazione.

6.4.5.1 Elenco degli anticorpi primari

Gli anticorpi utilizzati in questo esperimento sono: GAPDH, Istone H3, Catepsina L, Citrato Sintasi, IDH2, Vdac1, Ndufa6, Aco2, Ogdh, Sdha, Atp5b. Sono stati acquistati presso le ditte Cell Signaling e Santa Cruz. Sono stati utilizzati ad una concentrazione di 1:1000, gli anticorpi secondari relativi, come indicato dal *datasheet*, sono stati utilizzati ad una concentrazione di 1:10000.

6.4.6 Rivelazione (reazione Ag-Ab)

Le membrane sono state sviluppate in chemiluminescenza grazie alla reazione dell'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano (*hourseradish*) con il substrato *ECL prime (GE-Amersham)*. Le bande sono state visualizzate tramite lo strumento *ImageQuant mini LAS 4000 (Ge healthcare)* e la quantizzazione è stata

eseguita tramite il software *ImageQuant TL (Ge healthcare)*, seguita da analisi statistica (Student's T test; p value <0.05).

6.5 Saggio di attività della citrato sintasi e di integrità della membrana mitocondriale interna (Citrato synthase assay Kit)

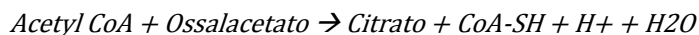
La Citrato sintasi è l'enzima iniziale del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). L'enzima catalizza la reazione tra acetil coenzima A (acetil CoA) e l'ossalacetato per formare acido citrico. Questo enzima è un marcatore esclusivo della matrice mitocondriale.

6.5.1 Saggio della citrato sintasi

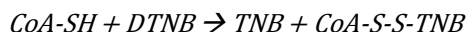
L'attività della citrato sintasi è stata misurata con il *Citrato Synthase Assay Kit* (*Sigma* cod: CS0720) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Nel protocollo è consigliato l'utilizzo di tessuto fresco, non congelato.

L'attività può essere misurata in preparati di mitocondri isolati o in estratti cellulari totali. Per il saggio dell'attività totale della citrato sintasi in mitocondri isolati, il pellet mitocondriale è stato sospeso in CelLytic M tampone di lisi, mentre il tessuto polverizzato è stato sospeso in CelLytic MT, in entrambe i casi, al tampone di lisi è stato aggiunto 1mM di PMSF, inibitore di proteasi.

La citrato sintasi catalizza la reazione tra il coenzima A (CoA) e l'ossalacetato (OAA) per formare l'acido citrico. L'idrolisi del tioestere di acetil CoA provoca la formazione di CoA con un gruppo tiolo (-SH CoA). Il tiolo reagisce con l'DTNB nella miscela di reazione per formare acido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Il TNB produce un colore giallo quantizzabile, con spettrofotometro a raggi UV, leggendo l'assorbanza ad una lunghezza d'onda pari a 412 nm.



Reazione colorimetrica:



Il saggio dell'attività della citrato sintasi è stato eseguito in doppio per ogni campione. Parte dei campioni preparati per il dosaggio dell'attività della citrato

sintasi, sono stati impiegati per il dosaggio proteico totale utilizzando il *PlusOne 2D Quant Kit*. La quantità della proteina totale negli estratti proteici è necessaria per la normalizzazione dell'attività della citrato sintasi. I calcoli dell'attività sono stati eseguiti come da manuale, il risultato viene espresso in unità specifiche (umole/mg/min).

6.5.2 Saggio dell'integrità della membrana mitocondriale interna

Il *Citrate Synthase Assay Kit* può essere impiegato anche per la misura indiretta dell'integrità della membrana mitocondriale interna, in quanto l'attività della citrato sintasi non è facilmente misurabile in mitocondri intatti a causa dell'impermeabilità della membrana interna ai substrati della reazione.

Il preparato dei mitocondri isolati è stato diviso in due aliquote: una parte viene sospesa con *CellLytic M*, che rappresenta l'attività totale della citrato sintasi presenti nei mitocondri (poiché in questo caso i mitocondri vengono tutti rotti e la miscela di reazione è disponibile per l'enzima.) La seconda parte viene sospesa con *Bicin Buffer*, che rappresenta l'attività risultante dai mitocondri rotti presenti in soluzione. Il *Bicin Buffer* preserva l'integrità dei mitocondri nella preparazione.

È stata determinata l'attività della citrato sintasi di ciascun campione. Il rapporto tra l'attività della citrato sintasi nella preparazione di mitocondri con *Bicine Buffer* contro l'attività della stessa nella preparazione di mitocondri trattati con *CellLytic M Cell Lysis Reagent* (rottura dei mitocondri) esprime la percentuale di rottura mitocondri.

$$\% \text{ di rottura dei mitocondri} = \frac{\text{attività in Bicin Buffer} * 100}{\text{Attività in CellLytic M}}$$

6.6 Estrazione dei mitocondri con Mitochondria Isolation Kit

I mitocondri sono stati isolati con *Mitochondria Isolation Kit* (*Sigma* cod: *MitoISO1*) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Nel protocollo è consigliato l'utilizzo sia di tessuto fresco, che di tessuto congelato.

Il protocollo di estrazione si basa sull'omogeneizzazione del tessuto con omogeneizzatore di Potter e su centrifughe differenziali, a velocità bassa 600 xg e a velocità alta 11000 xg. Il risultato è una frazione mitocondriale grezza che può essere utilizzata per ulteriori esperimenti. Il *Kit* permette di isolare mitocondri sia da

tessuti molli che “duri” come il muscolo scheletrico e il muscolo cardiaco. L'estrazione avviene in presenza di BSA delipidata che permette la rimozione degli acidi grassi liberi presenti nel tessuto i quali potrebbero provocare danni alle proteine della catena respiratoria (ref 10 *kit MitoISO1*). La presenza di EGTA, un chelante degli ioni calcio, impedisce il rigonfiamento dei mitocondri. Per facilitare l'omogeneizzazione dei tessuti “duri” è necessario pretrattarli con una proteasi, la tripsina, per digerire le miofibrille presenti nei muscoli. Questo *kit* richiede per la procedura di isolamento tessuto fresco.

Per l'estrazione dei mitocondri dai cuori di ratto congelati, i tessuti sono stati omogeneizzati con omogeneizzatore di Potter in presenza dell'*Extraction Buffer A*. Le centrifughe sono state eseguite a 600 xg ed a 11000 xg, il pellet mitocondriale è stato risospeso in *Bicin Buffer* per la misura dell'attività della citrato sintasi e la valutazione dell'integrità della membrana mitocondriale interna. Tutte le operazioni di isolamento sono state eseguite a 4°C e le soluzioni impiegate sono state raffreddate a 4°C prima dell'utilizzo.

6.7 Estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali con Kit Minute

Le proteine delle membrane mitocondriali sono state isolate con *Minute™ Mitochondria Membrane Protein Isolation Kit* (Invent Biotechnologies cod: MP007) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Questo *kit* permette l'utilizzo di tessuto congelato e non necessita dell'utilizzo di omogeneizzatore di Potter. Il tessuto viene macinato, con un'apposita barretta di plastic, a sulla cartuccia filtrante delle provette di estrazione anch'esse fornite dal *kit*. La soluzione, sottoposta a diverse centrifughe, è stata filtrata più volte attraverso le cartucce. L'ultima centrifuga a velocità maggiore, 16000 xg, permette di raccogliere nel pellet sul fondo della provetta le proteine delle membrane mitocondriali. Tutti i sovranatanti sono stati conservati per la verifica dell'efficienza del *kit*.

Per la verifica dell'efficienza del *kit* sono stati allestiti degli *immunoblotting*, ai pellet raccolti (1°, 2° e 3° pellet, Figura 17) è stato aggiunto il *lysis buffer* per solubilizzare il contenuto proteico mentre per i sovranatanti (1° e 2° sovranatante, Figura 17) le proteine presenti sono state precipitate con il *clean-up kit*, e solubilizzate in un

volume più piccolo di *lysis buffer* (altrimenti il loro contenuto proteico sarebbe stato troppo diluito per l'analisi con *immunoblotting*).

Per la verifica sono stati impiegati 27,2 mg di cuore di ratto senescente. L'esperimento è stato condotto in singolo, non sono state eseguite repliche sperimentali.

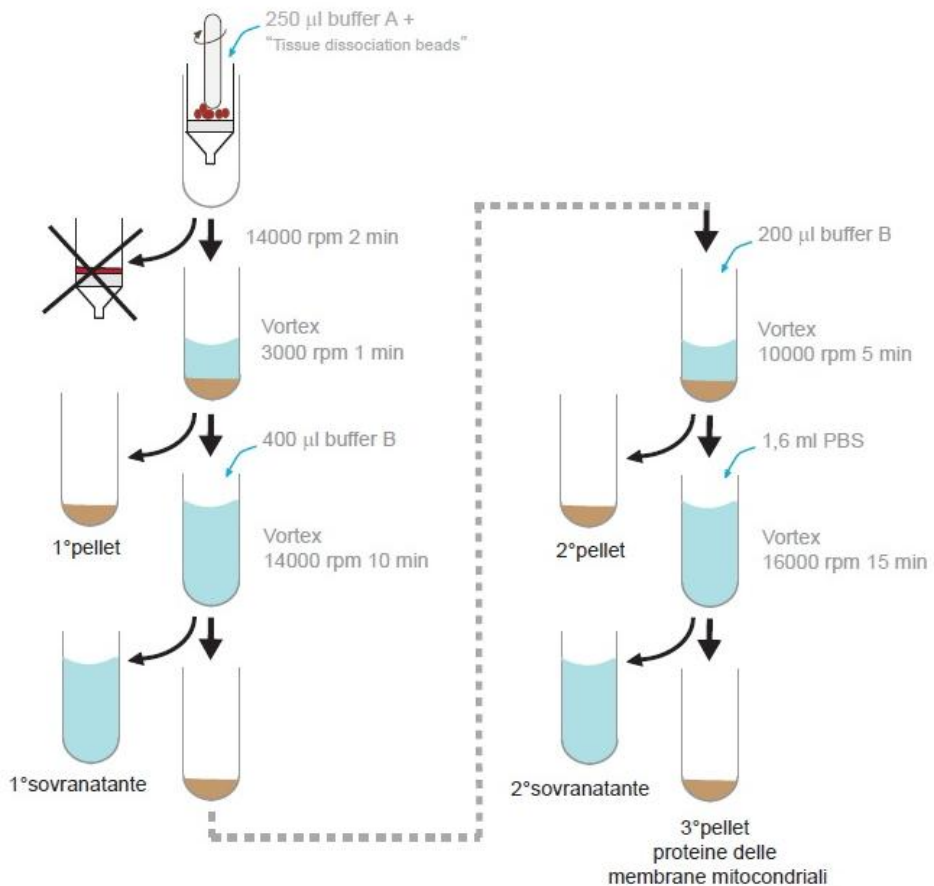


Figura 17: Schema riassuntivo del protocollo del *Minute™ Mitochondria Membrane Protein Isolation Kit* per mettere in evidenza quali frazioni sono state analizzate per verificare l'efficienza del kit. Le frazioni analizzate sono: 1° pellet, 1° sovrinatante, 2° pellet, 2° sovrinatante, 3° pellet Proteine delle membrane mitocondriali.

7 RISULTATI

7.1 *Disegno sperimentale*

In questo lavoro sono stati impiegati cuori di ratti di 6, 22 e 30 mesi, tre animali per gruppo. I gruppi sperimentali sono stati nominati Giovane, per i cuori di ratto di 6 mesi, Vecchio, per i cuori di ratto di 22 mesi e Senescente, per i cuori di ratto di 30 mesi.

Al fine di studiare l'invecchiamento nel muscolo cardiaco è stata eseguita un'analisi proteomica differenziale con la tecnica 2D-DIGE (*two dimensional difference gel electrophoresis*) tra i gruppi sperimentali. In particolare sono stati eseguiti i seguenti confronti:

- giovane vs vecchio;
- giovane vs senescente;
- vecchio vs senescente;

Per l'identificazione delle proteine differenzialmente espresse, sono state allestite mappe preparative per poter prelevare le macchie d'interesse ed analizzarle tramite spettrometria di massa MALDI Tof-Tof. È stata creata una "mappa standard" per l'identificazione delle proteine statisticamente variate nei profili proteomici nei confronti sopra citati. Inoltre, per indagare il ruolo dei mitocondri e la loro dinamicità in corso di invecchiamento, sono stati eseguiti *immunoblotting* su proteine chiave del processo di fusione, fissione mitocondriale e autofagia.

Per approfondire il ruolo dei mitocondri nel processo d'invecchiamento e per abbattere il range dinamico intrinseco del muscolo cardiaco, si è deciso di effettuare una proteomica mitocondriale, ovvero un'estrazione classica dei mitocondri subsracolemmali (SSM) e degli intermiofibrillari (IFM), seguita da un'analisi proteomica differenziale con la tecnica 2D-DIGE con l'allestimento di mappe preparative mitocondriali per l'identificazione delle macchie differenzialmente espresse. In particolare, nell'analisi proteomica, sono stati eseguiti i seguenti confronti:

- SSM di giovane vs SSM di vecchio;
- SSM di giovane vs SSM di senescente;
- IFM di giovane vs IFM di vecchio;

- IFM di giovane vs IFM di senescente.

Per verificare l'arricchimento (purezza) del preparato mitocondriale e l'integrità dei mitocondri isolati, sono stati fatti degli *Immunoblotting* e misurata l'attività della citrato sintasi negli estratti proteici dal muscolo cardiaco in toto e negli estratti proteici dei mitocondri isolati.

Infine sono stati impiegati due *kit* commerciali; il primo per l'estrazione dei mitocondri con la valutazione della percentuale di rottura mitocondriale ed il secondo per l'estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali.

7.2 Muscolo cardiaco in toto

7.2.1 Risultati 2D-DIGE analisi statistica

Per effettuare un'analisi differenziale quantitativa è necessario che le immagini ottenute dei gel siano elaborate utilizzando un *software* dedicato, in questo caso il *DeCyder 2D software*. Il primo passaggio di questa analisi consiste nella *spot detection*, la quale si effettua tramite il modulo DIA (*Differential in-gel analysis*), che permette la rilevazione delle macchie presenti nella mappa bidimensionale e la loro abbondanza. In media, per gel, il numero delle macchie incluse sono state 1400.

Il secondo passaggio prevede l'utilizzo del modulo BVA che permette: una valutazione più fine delle macchie rilevate, la scelta del *master gel* (il gel rappresentativo di tutte le macchie proteiche di tutti i gel dell'esperimento), l'assegnazione dei *gel* ai gruppi sperimentali e il *gel matching*.

Colore	Gruppo sperimentale
	Giovane
	Vecchio
	Senescente

Tabella 4: Raggruppamento dei gel nei gruppi sperimentali. Nel modulo BVA del *software DeCyder 2D* ogni gel è stato assegnato al proprio gruppo sperimentale. Ogni gruppo è contraddistinto da un colore: blu per il giovane, verde per il vecchio e rosso per il senescente.

Le abbondanze delle macchie fornite dal *software* sono state elaborate con il modulo EDA per l'analisi statistica. Il *base set* analizzato dal modulo EDA comprende 508 macchie presenti almeno nel 90% dei gel dell'esperimento.

7.2.1.1 *Differential Expression Analysis (One way Anova)*

I risultati della *Differential Expression Analysis* sono elencati nella Tabella appendice 1 e riassunti nella Tabella 5. Le macchie differenzialmente espresse con One way Anova < 0.01 sono 112 e sono considerate macchie d'interesse (o *protein of interest* abbreviato in POI). Il *Tukey test* permette di individuare quale delle POI sono differenzialmente espresse in ogni confronto. La Figura 18 mostra la posizione delle 112 POI nella mappa bidimensionale.

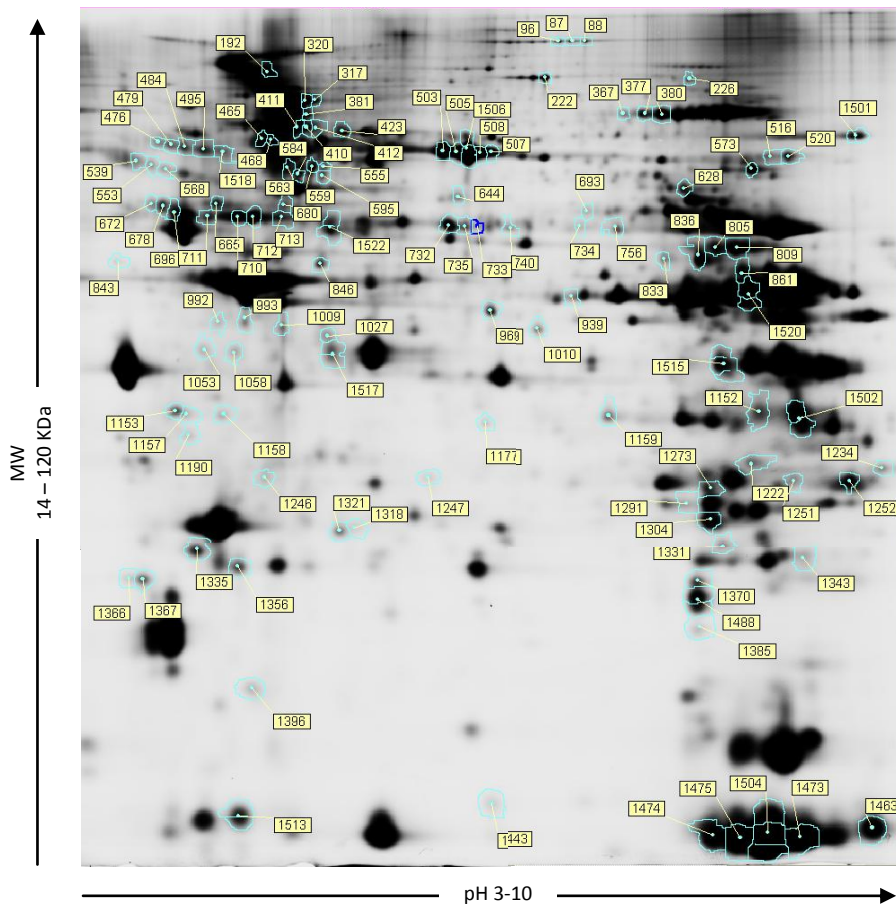


Figura 18: Mappa rappresentativa 2D-DIGE. Le macchie identificate come POI sono indicate sulla mappa con il numero del *master gel*.

Il numero maggiore di cambiamenti sono presenti nei confronti tra giovane e senescente e tra vecchio e senescente, mentre un numero inferiore di macchie sono variate nel confronto tra giovane e vecchio. In tutti i confronti il maggior numero delle macchie proteiche è *down-regolato*.

	<i>Giovane vs Vecchio</i>	<i>Giovane vs Senescente</i>	<i>Vecchio vs Senescente</i>
<i>N°macchie totali</i>	43	86	80
<i>N° macchie up-regolate</i>	17	38	30
<i>N°macchie down-regolate</i>	26	48	50

Tabella 5: La tabella riassume il numero delle macchie differenzialmente espresse nei confronti: giovane vs vecchio, giovane vs senescente, vecchio vs senescente.

7.2.1.2 PCA

Con lo scopo di determinare la significatività del disegno sperimentale e l'eventuale presenza di gels “*outliers*” è stata condotta la PCA (*Principal Component Analysis*) e la *herarchical cluster analysis* utilizzando il modulo EDA del software *DeCyder*.

Nel grafico di PCA ogni gel è rappresentato da un cerchio ed il colore indica l'appartenenza al gruppo sperimentale. Come mostrato in Figura 19 le repliche sperimentali sono molto vicine e questo indica una buona qualità dell'esperimento. La PCA1 separa i gruppi del giovane e del vecchio dal gruppo del ratto senescente, indicando che il gruppo del senescente si differenzia maggiormente dagli altri due gruppi.

7.2.1.3 Hierarchical cluster analysis

La Figura 20 mostra il risultato dell'analisi *Hierachical cluster*. Come già descritto dall'analisi PCA, le repliche sperimentali sono ben raggruppate nei *cluster* e le maggiori differenze sono a carico del senescente, rispetto agli altri gruppi sperimentali, come mostra la prima divisione del dendrogramma.

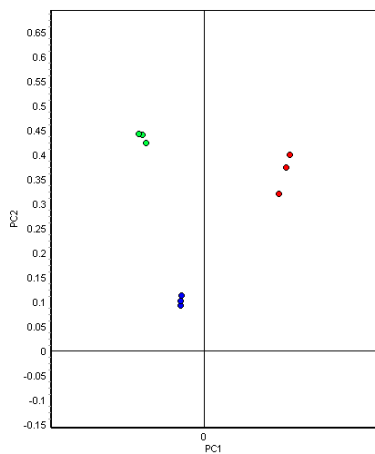


Figura 19: PCA *Principal component analysis*, ogni cerchio colorato rappresenta un gel, vi sono tre repliche sperimentali per ogni gruppo. I cerchi in blu rappresentano i gel dei cuori di ratto giovane, in verde i gel dei cuori di ratto vecchio ed in rosso i gel dei cuori di ratto senescente.

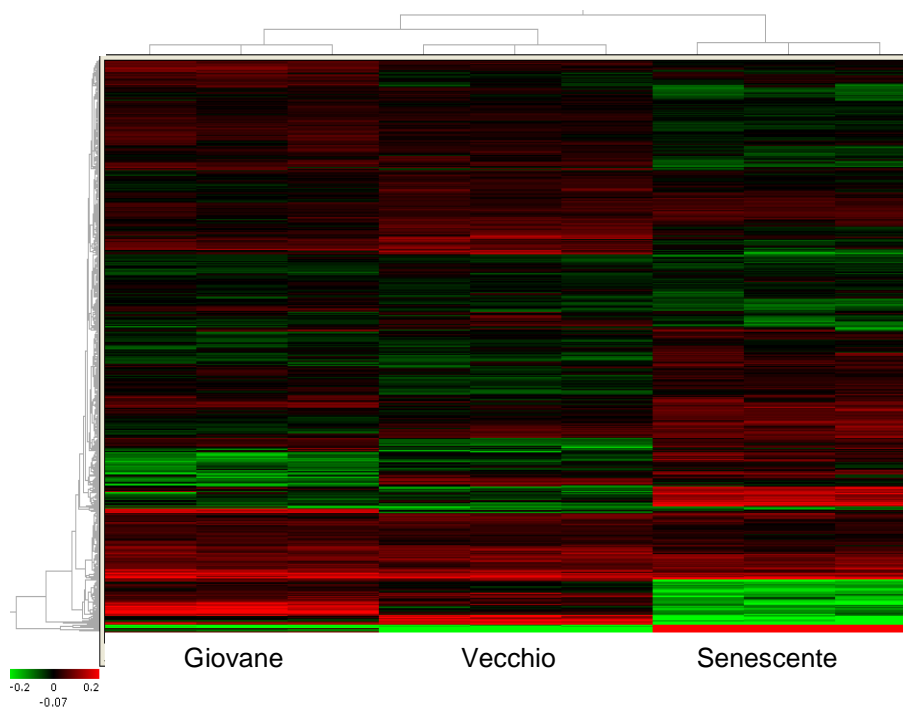


Figura 20: Hierarchical cluster delle proteine contenute nel *base set*, i gel vengono raggruppati in base alla similitudine degli andamenti delle macchie proteiche presenti in ogni gel. La principale

divisione del dendrogramma suddivide il giovane e il vecchio dal senescente. Il colore rosso indica le macchie *up-regolate*, il colore verde le macchie *down-regolate*.

7.2.2 Identificazioni proteiche

7.2.2.1 Mappa standard cuore di ratto

Per l'identificazione delle macchie differenzialmente espresse sono stati allestiti gel preparativi. Dai gel preparativi oltre alle POI, macchie proteiche d'interesse, sono state prelevate la maggior parte delle macchie visibili. Per ottenere una "mappa standard" è stata impiegata parte di tutti gli estratti proteici dei gruppi sperimentali. Nella Tabella appendice 2 sono elencate le macchie POI significativamente variate nei tre confronti ed identificate.

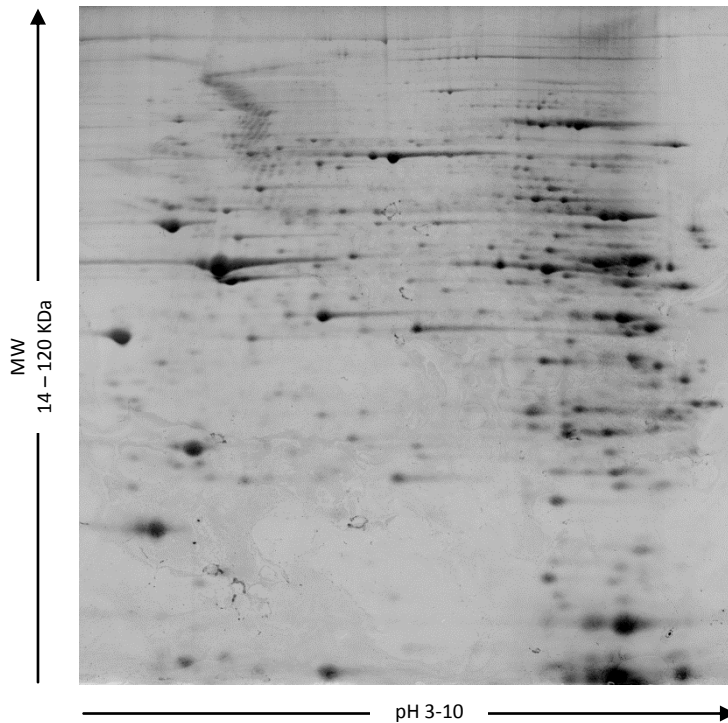


Figura 21: Mappa preparativa di cuore di ratto. Per visualizzare le macchie proteiche è stato impiegato il colorante fluorescente *Lava Purple*.

7.2.2.2 Macchie variate ed identificate nei confronti

Sono state identificate 83 macchie proteiche delle 112 POI, delle quali 11 sono frammenti delle catene pesanti delle miosine (Tabella 6). Abbiamo escluso, dal

conteggio delle proteine variate, i frammenti delle catene pesanti anche se statisticamente variati. Questi frammenti appartengono alle catene pesanti della miosina la quale ha un peso molecolare pari a 220 kDa. Proteine che hanno un peso molecolare così elevato non riescono ad essere separate all'interno di un gel bidimensionale al 12% di acrilamide, che ha un potere risolutivo tra i 14 e i 120 kDa. I frammenti in quanto tali, hanno diversi pesi molecolari, per questo motivo si trovano a diverse altezze nella mappa bidimensionale. Per studiare le variazioni delle miosine a catena pesante, sarebbe necessario eseguire un ulteriore esperimento con un gel appositamente studiato, con ad esempio una più bassa densità di acrilamide [89], non effettuato in questo studio.

	<i>Giovane vs Vecchio</i>	<i>Giovane vs Senescente</i>	<i>Vecchio vs Senescente</i>
<i>N° macchie totali</i>	33	55	52
<i>N° macchie up-regolate</i>	12	21	16
<i>N° macchie down-regolate</i>	21	34	36
<i>N° frammenti di miosine</i>	3	9	6

Tabella 6: La tabella riassume il numero delle macchie differenzialmente espresse nei confronti: giovane vs vecchio, giovane vs senescente, vecchio vs senescente. Non sono stati considerati nel numero di macchie identificate, i frammenti delle catene pesanti delle miosine, il loro numero è indicato nell'ultima riga della tabella.

Le proteine identificate sono state suddivise nelle seguenti classi funzionali: proteine contrattili e citoscheletriche, glicolisi, ciclo di Krebs, respirazione ossidativa, metabolismo degli acidi grassi, trasporto e legame del ferro, emostasi e coagulazione, proteine dello stress, trasferimento energetico ed altre.

In ogni confronto, descritti in dettaglio di seguito, il numero delle proteine identificate variate per ogni classe funzionale è stato visualizzato con l'uso di istogrammi a colonne.

7.2.2.2.1 Confronto tra Giovane e Vecchio

In Figura 22 è mostrata una mappa 2D-DIGE con indicate le 33 macchie differenzialmente espresse nel confronto tra giovane e vecchio. La lista delle proteine variate è presente nella Tabella appendice 1.

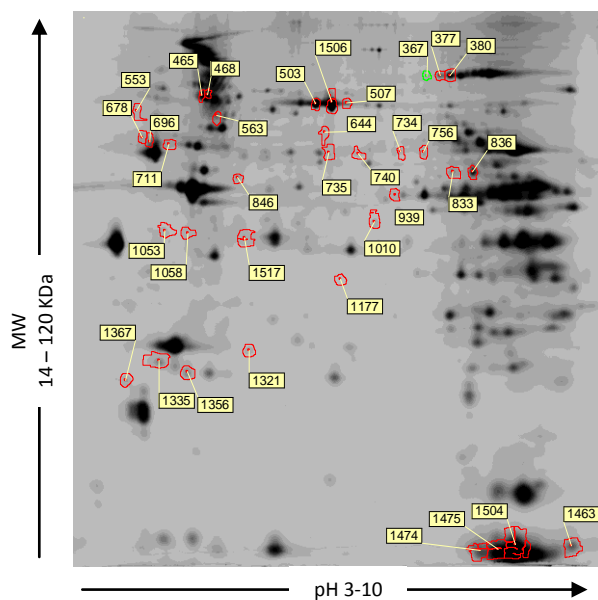


Figura 22: Mappa rappresentativa 2D-DIGE. Le macchie differenzialmente espresse nel confronto giovane vs vecchio sono indicate sulla mappa con il rispettivo numero del *master gel*.

Le proteine differenzialmente espresse sono state suddivise in classi funzionali e rappresentate con un istogramma a barre, vedi Figura 23. Nel complesso il vecchio ha una diminuzione dell'espressione proteica rispetto al giovane, in particolare diminuisce l'espressione delle proteine contrattili e citoscheletriche, della glicolisi, dell'emostasi e della coagulazione, le proteine dello stress ed infine quelle della classe "altre". Le entità delle variazioni, in termini di Av. Ratio, sono nell'intervallo tra 1.2 e 1.5, fatta eccezione per alcune proteine. Tra le proteine nella classe "altre", vi sono alcune con importanti entità di variazione come le serpine; esse hanno inoltre mostrato una continua diminuzione in corso di invecchiamento, come descritto nei successivi confronti.

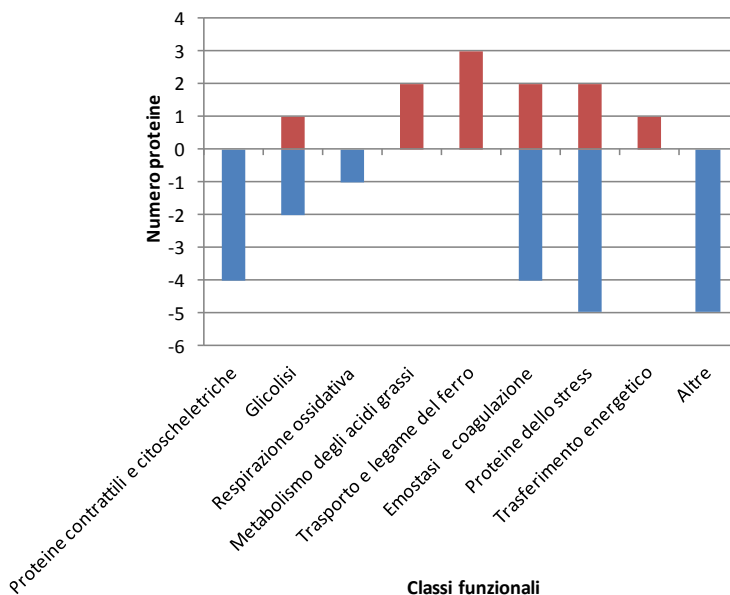


Figura 23: L'istogramma rappresenta le classi funzionali delle proteine variate tra giovane e vecchio. Le barre rosse indicano il numero delle proteine up-regolate nel vecchio rispetto al giovane. Le barre blu indicano il numero delle proteine *down*-regolate nel vecchio rispetto al giovane.

7.2.2.2.2 Confronto tra Giovane e Senescente

In Figura 24 è mostrata una mappa 2D-DIGE con indicate le 55 macchie differenzialmente espresse nel confronto tra giovane e senescente. La lista delle proteine variate è presente nella Tabella appendice 1.

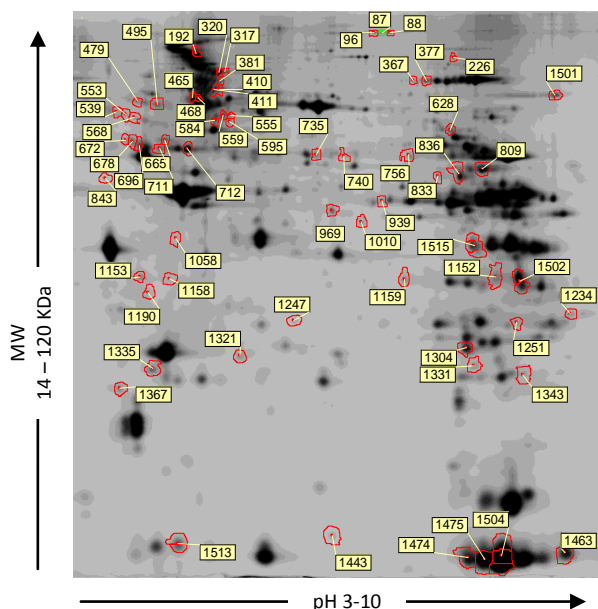


Figura 24: Mappa rappresentativa 2D-DIGE. Le macchie differenzialmente espresse nel confronto giovane vs senescente sono indicate sulla mappa con il rispettivo numero del *master gel*.

Le proteine differenzialmente espresse sono state suddivise in classi funzionali e rappresentate con un istogramma a barre, vedi Figura 25.

Nel complesso il senescente ha la maggior parte delle proteine variate diminuite rispetto al giovane. In particolare le classi funzionali coinvolte sono quelle: delle proteine contrattili e citoscheletriche, della glicolisi, della fosforilazione ossidativa, del metabolismo degli acidi grassi, dell'emostasi e della coagulazione e della classe "altre". Il numero delle proteine differenzialmente espresse è maggiore rispetto al confronto precedente, come anche le entità delle variazioni.

Nella classe delle proteine contrattili e citoscheletriche si ha un aumento delle proteine dei filamenti intermedi, delle miosine a catena leggera, della troponina I e della proteina *Cysteine and glycine-rich protein 3* (Csrp3) nota anche come *Muscle LIM protein* (MLP). Mentre si ha una importante diminuzione delle proteine che legano le miosine: tre isoforme della *myosin binding protein-C* (Mybpc3) e tre isoforme della *Myosin-binding protein H* (Mybph).

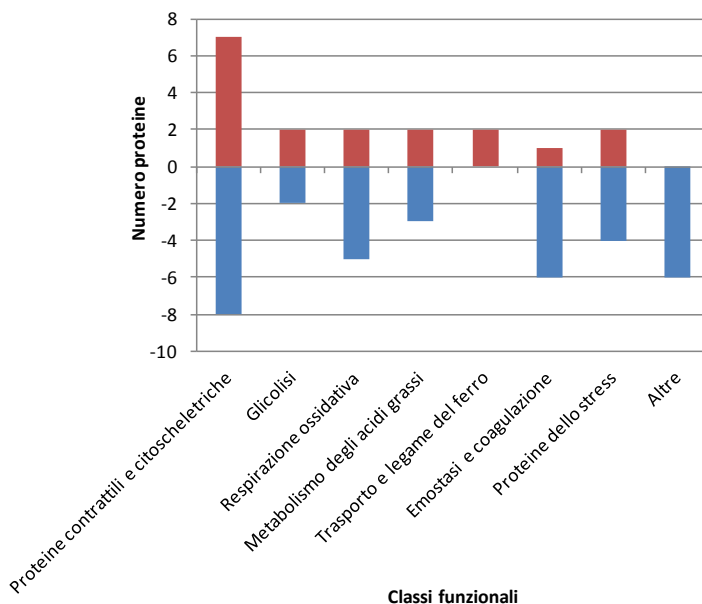


Figura 25: L'istogramma rappresenta le classi funzionali delle proteine variate tra giovane e senescente. Le barre rosse indicano il numero delle proteine up-regolate nel senescente rispetto al giovane. Le barre blu indicano il numero delle proteine down-regolate nel senescente rispetto al giovane.

Tra le proteine della glicolisi, si ha una diminuzione di due isoforme della beta-enolasi, essa si localizza sulla linea Z del sarcomero.

Della classe funzionale del metabolismo degli acidi grassi, la maggiore entità di variazione, riguarda la diminuzione nel senescente della *Acyl-CoA synthetase family member 2 (Acsf2)*, ossia l'enzima che catalizza la prima reazione del metabolismo degli acidi grassi.

Delle proteine della fosforilazione ossidativa si ha una generale diminuzione, con eccezione di una isoforma della *NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 10 (Ndufa10)* con av. Ratio di 3,41 ed una della *NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1 (Ndufv1)*. Tra le proteine diminuite nel senescente vi è un'altra subunità della *Ndufa10* che diminuisce con un av. Ratio pari a -10,35 e anche la proteina *Coq9* con una diminuzione pari -4,61.

Per le proteine dell'emostasi, della coagulazione, del trasporto ed in generale le proteine del siero si ha una diminuzione.

Sei proteine coinvolte nella risposta allo stress sono variate, in particolare si ha una diminuzione della *heat shock cognate 71 kDa protein* (Hspa8) con av ratio pari a -1,64 e di due isoforme della proteina aldeide deidrogenasi (Aldh2).

Anche in questo confronto si ha una diminuzione delle proteine serpine, in particolare della *serine protease inhibitor A3K* (Serpina3k) con un av. Ratio di -2,28, della *Serine protease inhibitor A3L* (serpina3l) con un av. Ratio di -1,76 e delle due isoforme della *Alpha-1-antiproteinase* (serpina1) con av. Ratio di -1,76 e -1,74. Inoltre tra le proteine della classe "altre" vi è una diminuzione nel senescente della proteina *Transferrin*.

7.2.2.2.3 Confronto tra Vecchio e Senescente

In Figura 26 è mostrata una mappa 2D-DIGE con indicate le 52 macchie differenzialmente espresse nel confronto tra vecchio e senescente. La lista delle proteine variate è presente nella tabella appendice 1.

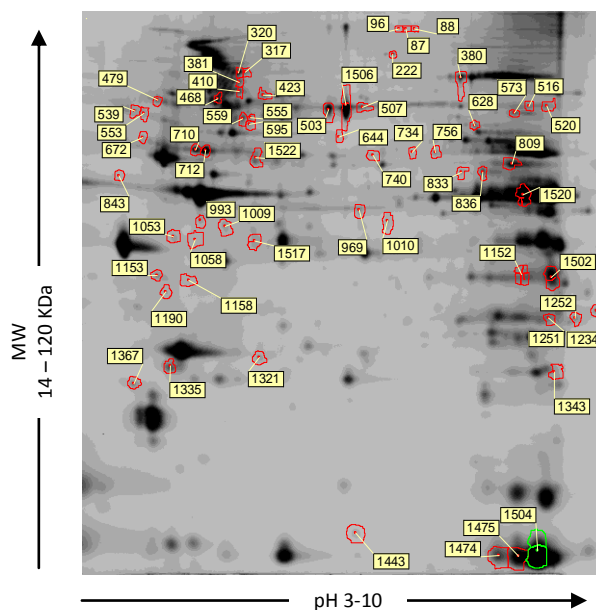


Figura 26: Mappa rappresentativa 2D-DIGE. Le macchie differenzialmente espresse nel confronto vecchio vs senescente sono indicate sulla mappa con il rispettivo numero del *master gel*.

Le proteine differenzialmente espresse sono state suddivise in classi funzionali e rappresentate con un istogramma a barre, vedi Figura 27. Nel complesso il senescente ha la maggior parte delle proteine variate diminuite rispetto al vecchio. Il numero delle proteine differenzialmente espresse sono pari al confronto precedente; questo risultato sottolinea la sostanziale differenza che distingue il cuore di ratto senescente dagli altri gruppi sperimentali.

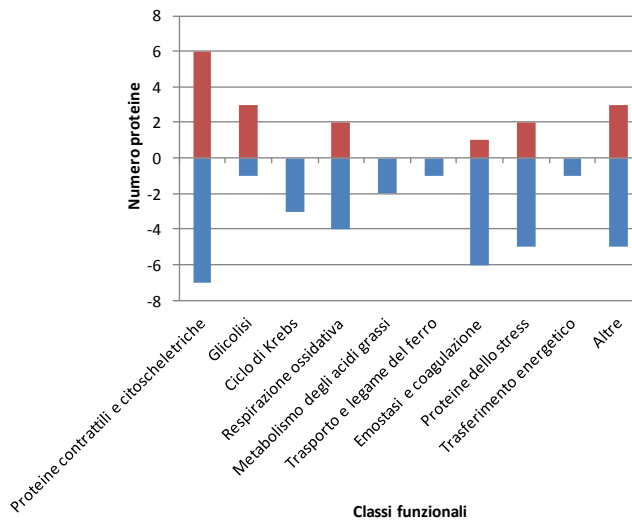


Figura 27: L'istogramma rappresenta le classi funzionali delle proteine variate tra vecchio e senescente. Le barre rosse indicano il numero delle proteine up regolate nel senescente rispetto al vecchio. Le barre blu indicano il numero delle proteine down-regolate nel senescente rispetto al vecchio.

Anche in questo confronto nella classe delle proteine contrattili e citoscheletriche, si ha un aumento nel senescente delle proteine dei filamenti intermedi, delle miosine a catena leggera e della proteina *Cysteine and glycine-rich protein 3* (Csrp3). Mentre si ha una importante diminuzione delle proteine che legano le miosine: tre isoforme della *myosin binding protein-C* (Mybpc3) e tre isoforme della *Myosin-binding protein H* (Mybph).

Tra le proteine della glicolisi si ha una aumento di due isoforme della beta-enolasi nel senescente rispetto al vecchio.

Peculiare di questo confronto è la variazione di tre proteine del ciclo di Krebs, in particolare la *isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha* (Idh3) la quale diminuisce con Av. Ratio di -1,58.

Anche in questo caso, della classe funzionale del metabolismo degli acidi grassi, la maggiore entità di variazione riguarda la diminuzione nel senescente della Acsf2, l'enzima che catalizza la prima reazione del metabolismo degli acidi grassi.

Delle proteine della fosforilazione ossidativa si ha una generale diminuzione, con eccezione di una isoforma di Ndufa10 con av. Ratio di 5,19 ed una di Ndufv1. Tra le proteine diminuite nel senescente vi è un'altra subunità della Ndufa10 che diminuisce con un av. Ratio pari a -11,66 e anche la proteina Coq9 con una diminuzione pari -4,93.

Per le proteine dell'emostasi, della coagulazione, del trasporto ed in generale le proteine del siero si ha una diminuzione.

Sei proteine coinvolte nella risposta allo stress sono variate, in particolare si ha un aumento della *protein disulfide-isomerase A3* (av. Ratio pari a 1,4), una diminuzione di Hspa8 (av ratio pari a -1,35) e di tre isoforme della proteina aldeide deidrogenasi (Aldh2).

Anche in questo confronto si ha una diminuzione delle proteine serpine, in particolare della Serpina3k con un av. Ratio di -1,68, della serpina3l con un av. Ratio di -1,35 e una delle isoforme della serpina1 con av. Ratio di -1,55. Inoltre tra le proteine della classe "altre" vi è una diminuzione nel senescente della proteina *Transthyretin*.

7.2.3 Immunoblotting

7.2.3.1 Studio della dinamica mitocondriale

Negli estratti proteici da muscolo cardiaco di giovane, vecchio e senescente sono state valutate le espressioni di alcune proteine coinvolte nella dinamica mitocondriale, tra le quali Bnip3, Beclin1, mTor, LC3 coinvolte nell'autofagia, Dlp1, Fis1, coinvolte nella fissione mitocondriale, BCL2 molecola anti-apoptotica e Sirt3 deacetilasi mitocondriale.

Bnip3 controlla l'attivazione di Beclin1 distruggendo l'interazione tra Beclin1 e Bcl2 e promuovendo l'autofagia [67]. Dai risultati (Figura 28) si osserva una forte diminuzione dell'espressione di Bnip3 nel senescente, mentre tra giovane e

vecchio non vi è una sostanziale differenza d'espressione; la proteina Beclin1 non risulta statisticamente variata tra i gruppi sperimentali.

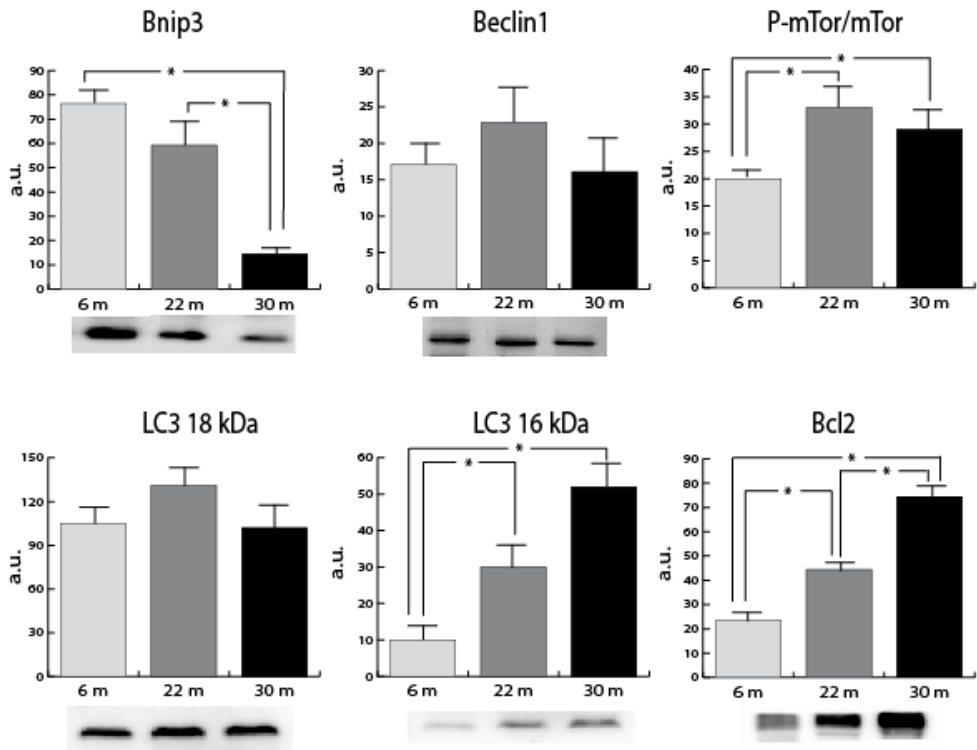


Figura 28: Risultati *immunoblotting* per le proteine coinvolte nell'autofagia. *Immunoblotting* e quantificazione delle proteine Bnip3, Beclin1, P-mTor/ mTor ratio, LC3 (banda a 18 kDa forma delipidata), e Bcl2. Gli istogrammi rappresentano il volume medio e la deviazione standard calcolate sulla specifica banda della proteina. Per ogni proteina è mostrata un'immagine rappresentativa delle tre repliche sperimentali effettuate. I dati sono stati normalizzati sulla colorazione del carico proteico totale ottenuta con colorante fluorescente Sypro Ruby (non mostrato). Per l'analisi statistica è stato applicato lo Student's T-test con $p < 0.05$. La significatività statistica è rappresentata da un asterisco (*).

Inoltre abbiamo valutato l'attivazione della proteina mTor attraverso il calcolo del *ratio* tra la proteina fosforilata e la relativa proteina totale: mTor risulta più attiva nel vecchio e nel senescente rispetto al giovane. A fianco di questi dati sull'autofagia, i quali fanno ipotizzare un blocco del *pathway* di attivazione classico dell'autofagia in corso di invecchiamento, vi è la valutazione di LC3. Abbiamo osservato le bande di LC3 a 18 kDa, forma integra della proteina, e la banda a 16

kDa, la forma delipidata. Si nota un incremento nell'invecchiamento della forma delipidata di LC3 ma nessun cambiamento significativo per la forma a 18 kDa di LC3. Bcl2, molecola antiapoptotica e coinvolta anche nel controllo dell'autofagia, aumenta in modo significativo tra i gruppi sperimentali.

Le proteine Dlp1 citosolica e Fis1, associata alla membrana mitocondriale esterna, hanno un importante ruolo nel controllo della fissione mitocondriale. Dlp1 decresce nei gruppi vecchio e senescente, rispetto al giovane. Anche Fis1 decresce in corso d'invecchiamento con significatività anche tra il vecchio ed il senescente (Figura 29).

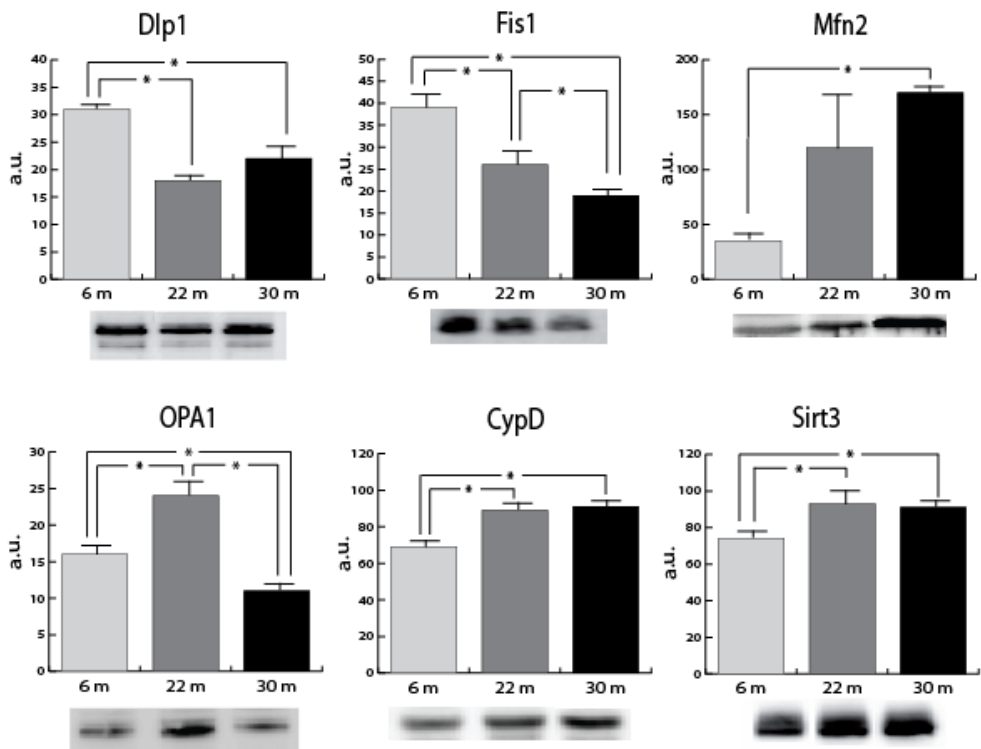


Figura 29: Risultati *immunoblotting* per le proteine coinvolte in fissione e fusione. *Immunoblotting* e quantificazione delle proteine Dlp1, Fis1, Mfn2, OPA1, CypD e Sirt3. Gli istogrammi rappresentano il volume medio e la deviazione standard calcolate sulla specifica banda della proteina. Per ogni proteina è mostrata un'immagine rappresentativa delle tre repliche sperimentali effettuate. I dati sono stati normalizzati sulla colorazione del carico proteico totale ottenuta con colorante fluorescente Sypro Ruby (non mostrato). Per l'analisi statistica è stato applicato lo Student's T-test con $p < 0.05$. La significatività statistica è rappresentata da un asterisco (*).

Le proteine mitofusina 2 (Mfn2) e OPA1 sono coinvolte nella fusione. Mfn2 aumenta durante l'invecchiamento ed in particolare nel senescente. La deviazione statistica troppo elevata nel vecchio non permette di raggiungere la significatività statistica, sebbene vi sia un chiaro aumento progressivo della fusione durante l'invecchiamento. OPA1, anch'essa coinvolta nella fusione ha un andamento anomalo, aumentando nel vecchio rispetto al giovane per poi diminuire nel senescente sia rispetto al giovane che rispetto al vecchio. Questi cambiamenti nel livello di OPA1 nel senescente potrebbero presupporre un'aumentata degradazione della proteina, presupposto per la formazione di mitocondri "giganti" [68]. Infine si è valutata l'espressione della proteina ciclofillina D, proteina regolatrice del poro mitocondriale di permeabilità transitoria (mPTP), si è osservato un aumento dell'espressione della proteina nei campioni vecchio e senescente rispetto al giovane. Per la sirtuina 3, una deacetilasi che ha importanti funzioni nel metabolismo dei mitocondri e nel *pathway* della resistenza allo stress, si osserva un aumento dell'espressione nel vecchio e nel senescente rispetto al giovane.

7.3 Mitocondri

7.3.1 Mitocondri isolati su gradiente di Percoll

Il primo risultato ottenuto dall'isolamento dei mitocondri è stato la possibilità di osservare come le due subpopolazioni mitocondriali, subsarcolemmali ed intermiofibrillari, si stratificassero in modo diverso all'interno della provetta da centrifuga.

È ben osservabile la distinzione delle bande a diverse altezze nel gradiente di Percoll: la foto ed il corrispondente disegno schematico a sinistra della Figura 30 rappresentano i mitocondri subsarcolemmali, mentre quelli a destra i mitocondri intermiofibrillari. Lo spessore delle bande è nettamente diverso tra le subpopolazioni, questo potrebbe indicare il numero dei mitocondri isolati, ovvero la resa dell'isolamento.

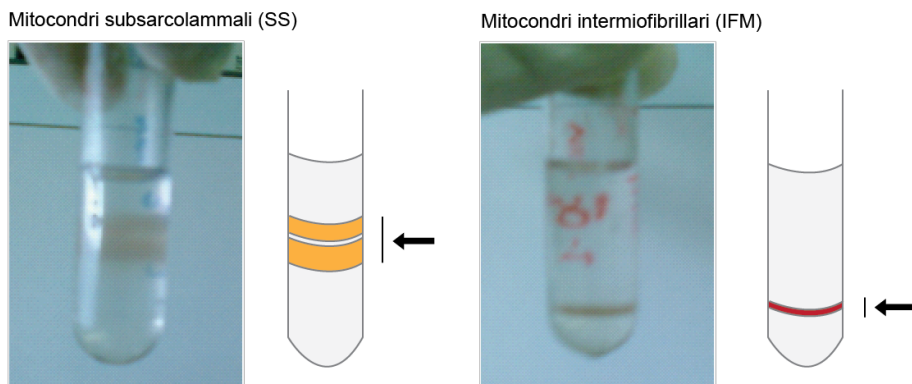


Figura 30: Isolamento dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) ed intermiofibrillari (IFM). Le foto illustrano le provette dopo l'ultracentrifuga, a fianco di ogni foto, vi sono degli schemi delle provette da centrifuga per evidenziare le differenti posizioni delle bande dei mitocondri isolati a seconda della subpopolazione mitocondriale.

7.3.1.1 Valutazione della purezza dei mitocondri isolati con Immunoblotting

La purezza dell'estratto mitocondriale è stata verificata mediante *immunoblotting* e attraverso la valutazione del contenuto di alcune proteine *marker* tra gli estratti mitocondriali e l'estratto del muscolo cardiaco in toto. Nel frazionamento cellulare, per definizione, i *marker* di un sub compartimento cellulare, sono delle proteine

presenti esclusivamente in un determinato compartimento. I *marker* ci permettono di valutare “se, oppure, non” è stato arricchito un subcompartimento, dopo il frazionamento cellulare, quindi lo si può considerare come un indice della bontà dell’esperienza. Gli estratti proteici sia dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) che dei mitocondri intermiofibrillari (IFM) sono risultati ben purificati da proteine marker del citosol (Gapdh) e del nucleo (Histone H3), ma non ben purificati, come atteso, da una proteina dei lisosomi, la Catepsina L (Figura 31).

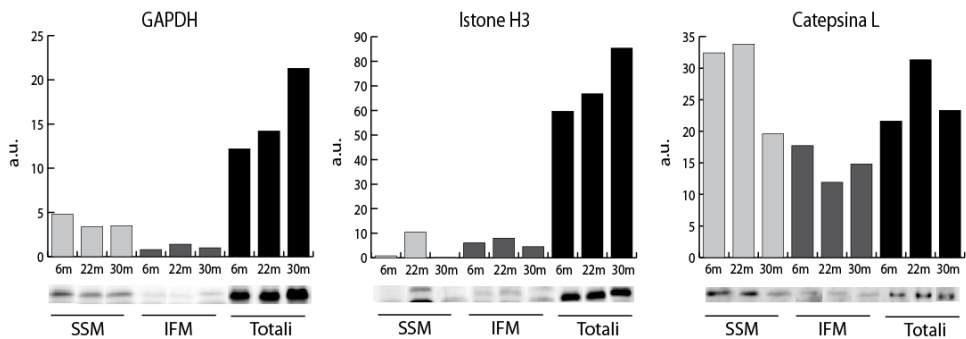


Figura 31: Analisi qualitativa mediante *immunoblotting* della purezza degli estratti mitocondriali. È stata verificata la purezza degli estratti proteici dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM), mediante *immunoblotting*. Si sono confrontate le quantità di proteine marker del citosol (GAPDH), del nucleo (Istone H3) e dei lisosomi (Catepsina L) rispetto al contenuto nell’estratto di muscolo cardiaco in toto (Totali). Le sigle 6m, 22m, 30m indicano i mesi d’età dei campioni di cuore di ratto quindi, rispettivamente, giovane, vecchio e senescente.

7.3.1.2 Valutazione dell’attività della citrato sintasi

L’attività della citrato sintasi è stata misurata nei mitocondri SSM e IFM dopo l’isolamento su gradiente di Percoll e nell’estratto del muscolo cardiaco in toto, di giovane, vecchio e senescente (Figura 32).

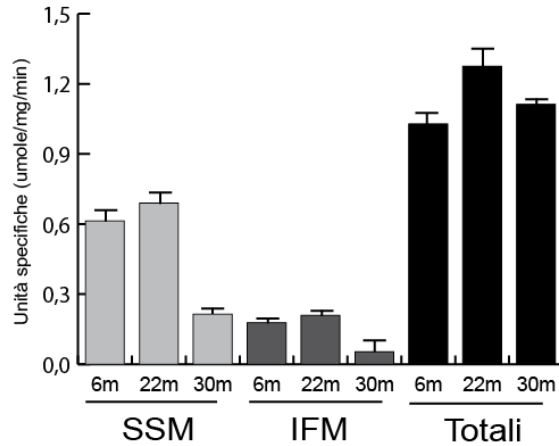


Figura 32: Saggio dell'attività della citrato sintasi. L'attività è stata misurata con Citrate synthase assay *Kit*, in mitocondri subsarcolemmali (SSM) e mitocondri intremiofibrillari (IFM) isolati su gradiente di Percoll e in estratto totale di muscolo cardiaco (totali). Le sigle 6m, 22m, 30m indicano i mesi d'età dei campioni di cuore di ratto quindi, rispettivamente, giovane, vecchio e senescente.

Si osserva che non si ha un'attività maggiore nelle frazioni purificate di mitocondri rispetto al totale, come ci si aspettava. Infatti, le frazioni di organelli arricchiti dovrebbero contenere una quantità elevata di mitocondri e quindi di citrato sintasi rispetto al contenuto del muscolo totale. Se paragonate le attività nei SSM e nei IFM si registra minor attività della citrato sintasi nei IFM.

7.3.1.3 Identificazioni

7.3.1.3.1 Mappa standard mitocondriale

Sono stati allestiti gel preparativi per identificare quali proteine erano state estratte dalle frazioni di mitocondri isolati da cuori di ratti giovani, adulti e senescenti. Sono state prelevate, per l'identificazione tramite spettrometria di massa MALDI, la maggior parte delle macchie visibili, per ottenere una "mappa standard". Nella tabella appendice 3 sono elencate le macchie identificate delle mappa preparativa.

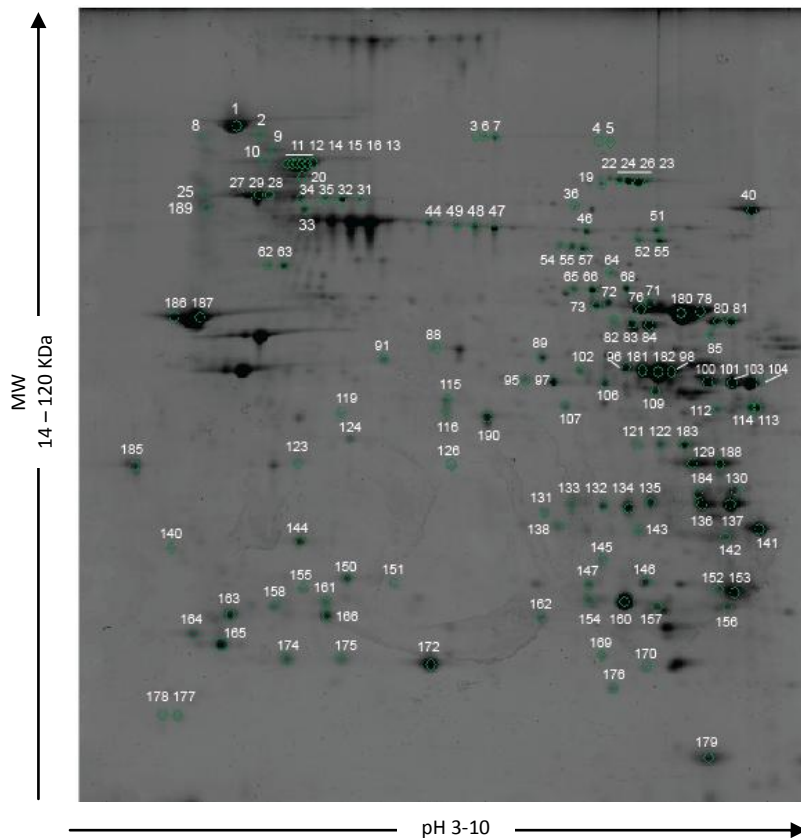


Figura 33: Mappa preparativa di mitocondri SSM e IFM estratti da cuori di ratti giovane, vecchio e senescente. Le macchie identificate sono indicate con un cerchio verde affiancato dal numero della *pick list*. La lista delle identificazioni è presente in appendice.

In Tabella appendice 3 le proteine identificate sono state numerate secondo la *pick list*, vi è per ogni proteina: l'*accession number*, il peso molecolare apparente, il punto isoelettrico, il nome e la localizzazione subcellulare. Vi sono 129 proteine, la maggior parte sono proteine mitocondriali: della membrana mitocondriale esterna, dello spazio intermembrana, della membrana mitocondriale interna e della matrice mitocondriale. In Figura 34 sono state rappresentate le proteine mitocondriali identificate in un mitocondrio stilizzato.

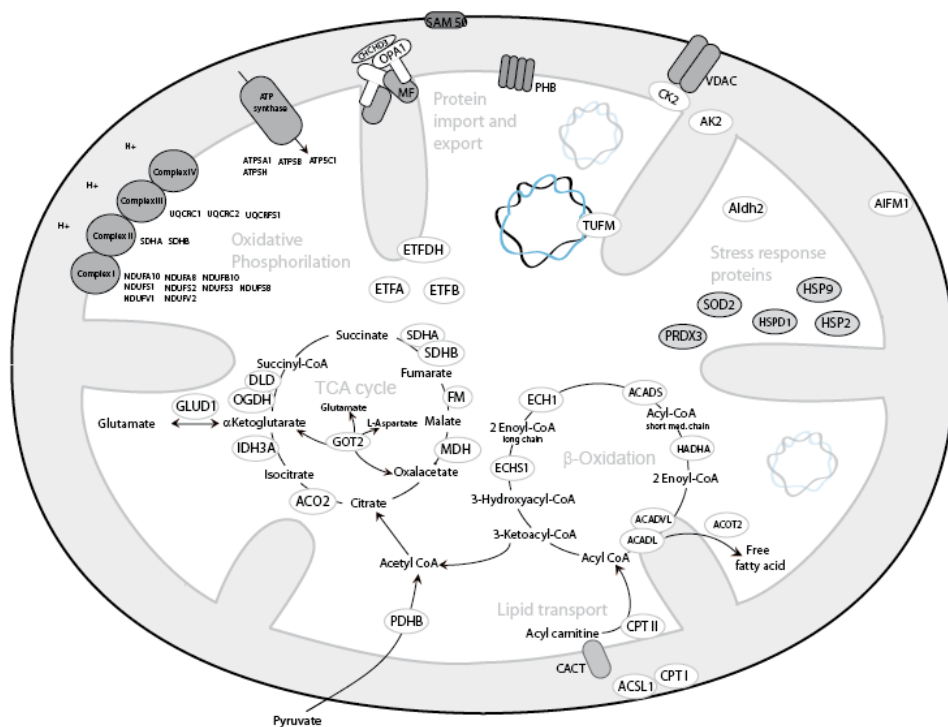


Figura 34: Rappresentazione delle proteine identificate con la spettrometria di massa. In questo schema è stata evidenziata la localizzazione subcellulare delle proteine identificate, sono state infatti identificate proteine delle membrane mitocondriali, dello spazio intermembrana e della matrice.

Vi sono, tra le proteine identificate, anche 42 proteine contaminanti dell'estratto mitocondriale che appartengono al citosol, ai perossisomi, al plasma e all'albumina bovina contenuta nel buffer B utilizzato per l'isolamento dei mitocondri intemiofibrillari.

7.3.1.4 Risultati della proteomica mitocondriale (2D-DIGE)

Per l'analisi differenziale sono stati eseguiti due esperimenti 2D-DIGE, uno per il confronto dei mitocondri SS e IFM tra giovane e vecchio, ed un secondo per il confronto dei mitocondri SS e IFM tra giovane e senescente.

Per l'analisi delle macchie differenzialmente espresse è stato applicato, in entrambe gli esperimenti, lo Student's T test ai seguenti confronti:

- SSM giovane vs SSM vecchio;
- IFM giovane vs IFM vecchio;

- SSM giovane vs SSM senescente;
- IFM giovane vs IFM senescente.

I risultati della *Differential Expression Analysis* sono elencati nelle tabelle appendice 4, 5, 6 e riassunti nella Tabella 7 e nella Tabella 8.

7.3.1.4.1 Confronto dei mitocondri SSM e IFM tra Giovane e vecchio

Dai dati dell'analisi 2D-DIGE, del confronto tra mitocondri SSM e IFM del giovane rispetto al vecchio, è emerso che per i mitocondri subsarcolemmali vi sono 35 macchie differenzialmente espresse tra giovane e vecchio (Tabella 7). Non vi sono invece macchie differenzialmente espresse (con t-test $p < 0.01$) nel confronto tra i mitocondri IFM.

	SS Giovane vs vecchio	IFM Giovane vs vecchio
N°macchie totali	35	0
N° macchie up-regolate	20	-
N°macchie down-regolate	15	-

Tabella 7: La tabella riassume il numero delle macchie differenzialmente espresse nei confronti: giovane SSM vs vecchio SSM, giovane IFM vs vecchio IFM.

Nel grafico di PCA, infatti, è chiara la situazione mostrata dall'analisi differenziale: i cerchi che corrispondono ai gel degli estratti dei SSM sono più distanti, rispetto ai gel degli IFM; sebbene in entrambe i casi i gruppi non vengano mai separati dagli assi della PCA. L'asse della PCA2 separa le due popolazioni mitocondriali ad indicare che le maggiori differenze sono a carico del sottotipo di organello (Figura 35). La Figura 36 mostra il risultato dell'analisi *Hierachical cluster*, le repliche sperimentali sono ben raggruppate nei *cluster*. Come già descritto dalla PCA, le maggiori differenze sono tra le due subpopolazioni mitocondriali, prima divisione del dendrogramma. La seconda divisione del dendrogramma separa per ogni sottotipo mitocondriale i giovani dai vecchi; anche nel caso dei mitocondri IFM che non hanno proteine differenzialmente espresse (con $p < 0.01$).

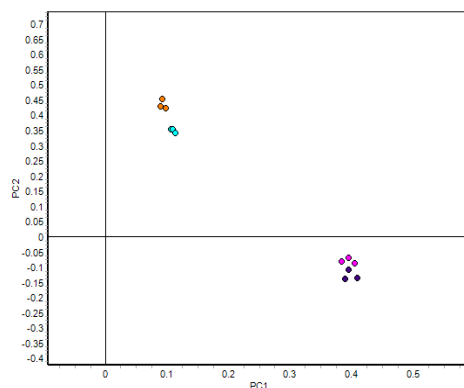


Figura 35: PCA per il confronto dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM) tra ratto giovane e vecchio. Ogni cerchio colorato rappresenta un gel, vi sono tre repliche sperimentali per ogni gruppo. I cerchi sono di quattro colori, azzurro, arancione, viola e glicine e rappresentano rispettivamente i SSM del ratto giovane, i SSM del ratto vecchio, i IFM del ratto giovane e i IFM del ratto vecchio.

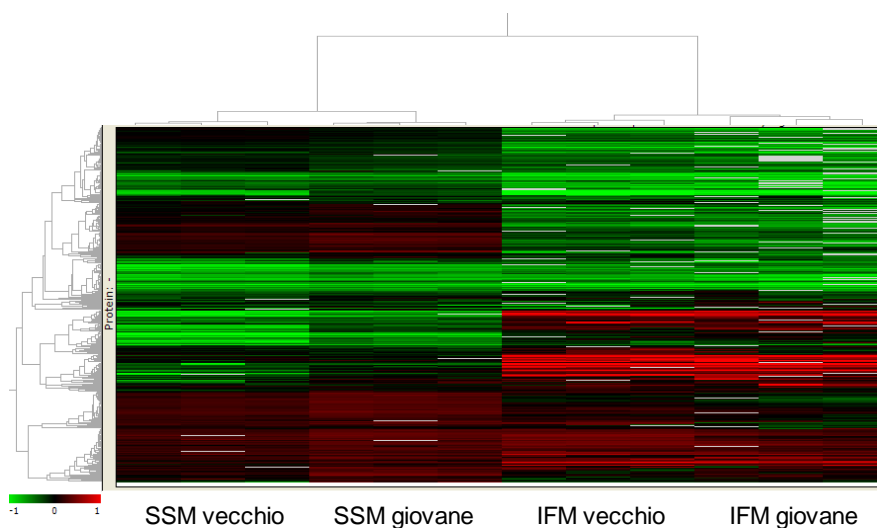


Figura 36: Hierarchical cluster delle proteine contenute nel Base set, i gel vengono raggruppati in base alla similitudine degli andamenti delle macchie proteiche presenti in ogni gel. La principale divisione del dendrogramma suddivide i gel dei estratti proteici dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) dagli estratti dei mitocondri intermiofibrillari (IFM). La successiva suddivisione separa il giovane dal vecchio. Il colore rosso indica le macchie *over*-espresse, il colore verde le macchie *down*-espresse.

Le proteine differenzialmente espresse (elencate in Tabella appendice 4) sono state suddivise in classi funzionali e rappresentate con un istogramma a barre, vedi Figura 37. Nel complesso i SSM del vecchio hanno la maggior parte delle proteine variate aumentate rispetto ai SSM del giovane. In particolare sono aumentate nel vecchio le proteine del ciclo di Krebs, le proteine dello stress e le proteine del metabolismo degli acidi grassi.

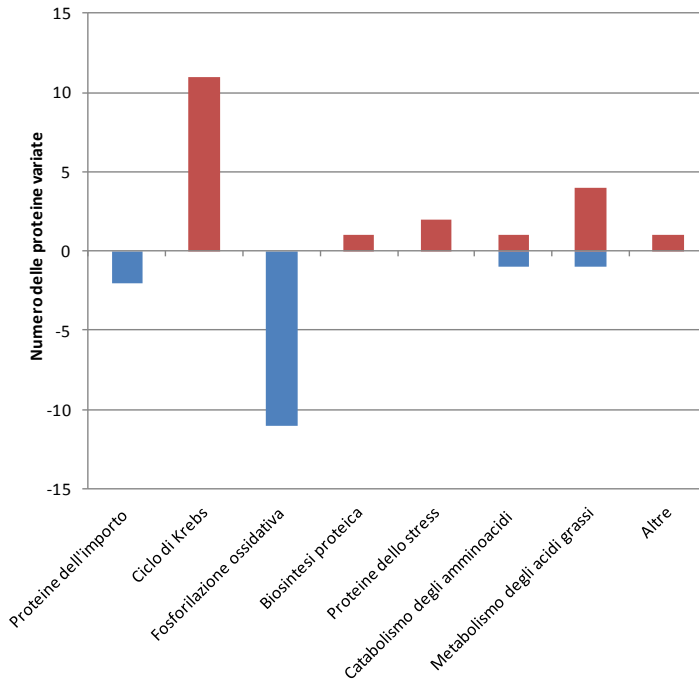


Figura 37: L'istogramma rappresenta il numero delle proteine variate (p value < 0.01) ed identificate nei confronti mitocondri subsarcolemmali tra ratto giovane e vecchio, divise in classi funzionali. Le barre rosse indicano il numero delle proteine up regolate nei SSM del senescente rispetto al giovane. Le barre blu indicano il numero delle proteine *down*-regolate.

Le proteine variate sono state inserite nello schema delle proteine identificate della mappa standard. In particolare nella Figura 38, sono state evidenziate le proteine della matrice mitocondriale; come si osserva le proteine differenzialmente espresse sono aumentate nel vecchio rispetto al giovane.

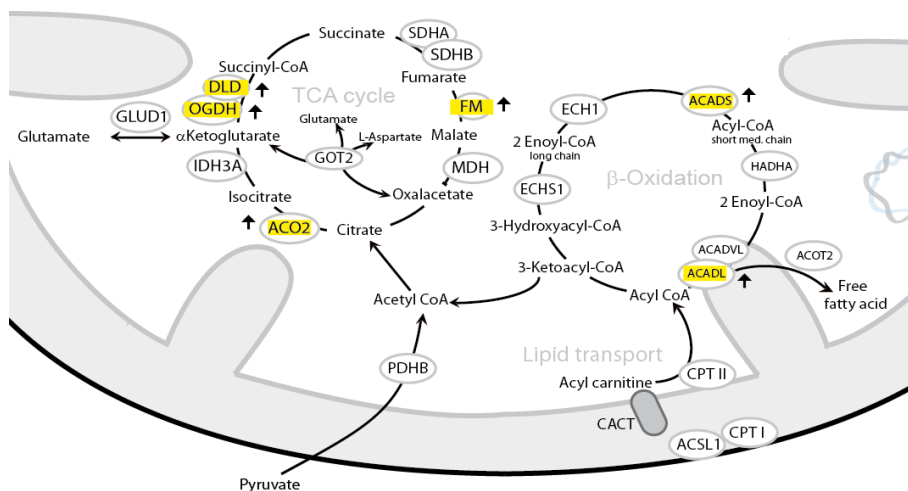


Figura 38: Disegno schematico delle proteine che appartengono al ciclo di Krebs, alla beta-ossidazione e al trasporto dei lipidi nel mitocondrio. In giallo sono evidenziate le proteine variate tra ratto giovane e vecchio, le frecce a fianco del nome della proteina indicano un aumento (↑) o una diminuzione (↓) nel vecchio rispetto al giovane.

Nella Figura 39 sono state rappresentate le proteine variate che hanno sub localizzazione nelle membrane mitocondriali (si noti come la maggior parte delle proteine delle membrane sia diminuita nel vecchio rispetto al giovane).

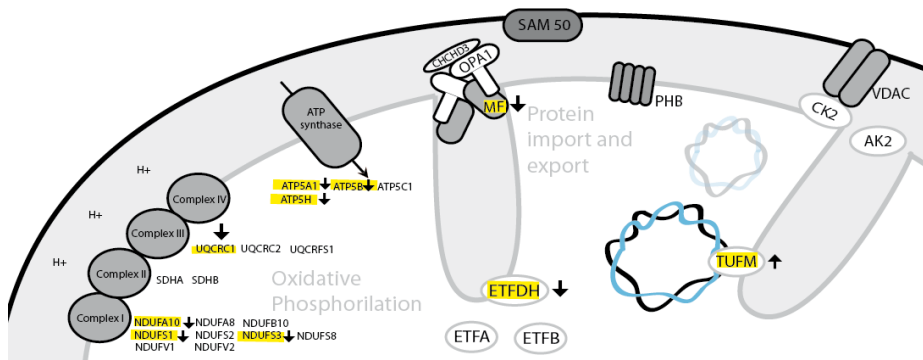


Figura 39: Disegno schematico delle proteine che appartengono alla fosforilazione ossidativa e all'importo ed esporto delle proteine dal mitocondrio. In giallo sono evidenziate le proteine variate tra giovane e vecchio, le frecce a fianco del nome della proteina indicano un aumento (↑) o una diminuzione (↓) nel ratto vecchio rispetto al giovane.

7.3.1.4.2 Confronto dei mitocondri SSM e IFM tra Giovane e senescente

Dai dati dell'analisi 2D-DIGE, del confronto tra mitocondri SSM e IFM del giovane rispetto al senescente, è emerso che per i mitocondri subsarcolemmali vi sono 82 macchie differenzialmente espresse tra giovane e senescente (Tabella 8). Solo 18 macchie differenzialmente espresse nei mitocondri IFM del giovane rispetto ai IFM del senescente. Nel caso dei mitocondri IFM quasi tutte le proteine variate sono aumentate nel senescente.

	<i>SS Giovane vs senescente</i>	<i>IFM Giovane vs senescente</i>
<i>N°macchie totali</i>	82	18
<i>N° macchie up-regolate</i>	48	17
<i>N°macchie down-regolate</i>	34	1

Tabella 8: La tabella riassume il numero delle macchie differenzialmente espresse nei confronti: giovane SSM vs senescente SSM, giovane IFM vs senescente IFM.

Nel grafico di PCA, come per il confronto precedente, si osserva che i cerchi che corrispondono ai gel degli estratti dei SSM sono più distanti, rispetto ai gel degli IFM; anche in questo caso i gel del confronto tra lo stesso sottotipo mitocondriale, non sono mai separati dagli assi della PCA. L'asse della PCA1 separa le due popolazioni mitocondriali ad indicare che le maggiori differenze sono a carico del sottotipo di organello (Figura 40).

La Figura 41 mostra il risultato dell'analisi *Hierarchical cluster*, le repliche sperimentali sono ben raggruppate nei *cluster*. Come già descritto dalla PCA, le maggiori differenze sono tra le subpopolazioni mitocondriali, prima divisione del dendrogramma. La seconda divisione del dendrogramma separa per ogni sottotipo mitocondriale i giovani dai senescenti.

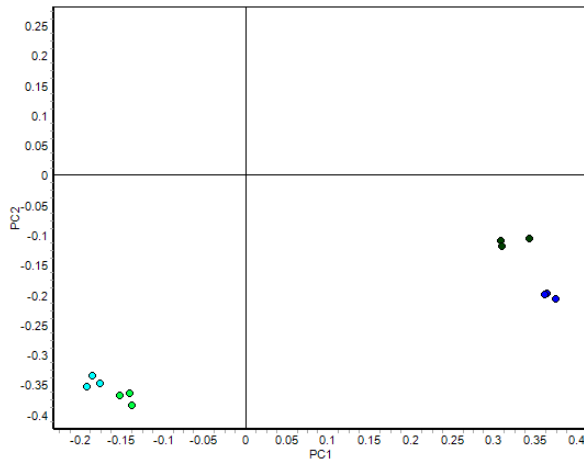


Figura 40: PCA del confronto tra mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM) di ratto giovane e senescente. Ogni cerchio colorato rappresenta un gel, vi sono tre repliche sperimentali per ogni gruppo. I cerchi sono di quattro colori, blu (per i SSM del ratto giovane), verde scuro (per i SSM del ratto senescente), verde chiaro (per i IFM del ratto giovane) e azzurro (per i IFM del ratto senescente).

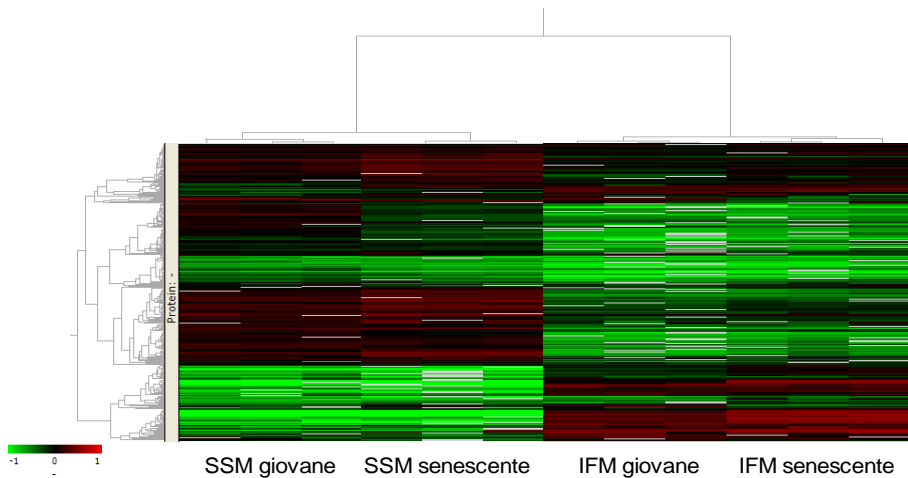


Figura 41: Hierarchical cluster delle proteine contenute nel Base set, i gel vengono raggruppati in base alla similitudine degli andamenti delle macchie proteiche presenti in ogni gel. La principale divisione del dendrogramma suddivide i gel dei estratti proteici dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) dagli estratti dei mitocondri intermiofibrillari (IFM). La successiva suddivisione separa il ratto giovane dal ratto senescente. Il colore rosso indica le macchie *over*-esprese, il colore verde le macchie *down*-esprese.

Le proteine differenzialmente espresse sono state suddivise in classi funzionali e rappresentate con un istogramma a barre, vedi Figura 42 (la lista delle proteine variate è presente nella Tabella appendice 5). Nel complesso i SSM del senescente hanno la maggior parte delle proteine variate aumentate rispetto al giovane, la maggior parte delle proteine aumentate fanno parte fosforilazione ossidativa.

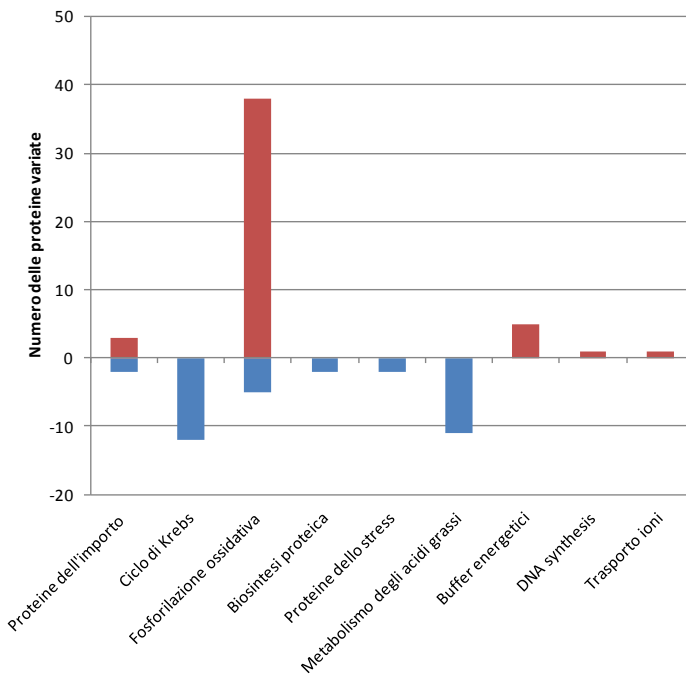


Figura 42: L'istogramma rappresenta il numero delle proteine variate (p value < 0.01) ed identificate nei confronti mitocondri subsarcolemmali tra ratto giovane e senescente, divise in classi funzionali. Le barre rosse indicano il numero delle proteine up regolate nei SSM del senescente rispetto al giovane. Le barre blu indicano il numero delle proteine *down*-regolate.

Le proteine variate nel confronto tra i mitocondri subsarcolemmali del giovane e senescente (elencate in Tabella appendice 5) sono state inserite nello schema delle proteine identificate della mappa standard. In particolare nella Figura 43 sono state evidenziate le proteine della matrice mitocondriale; come si osserva, le proteine differenzialmente espresse della matrice, sono diminuite nei SSM del senescente rispetto al giovane.

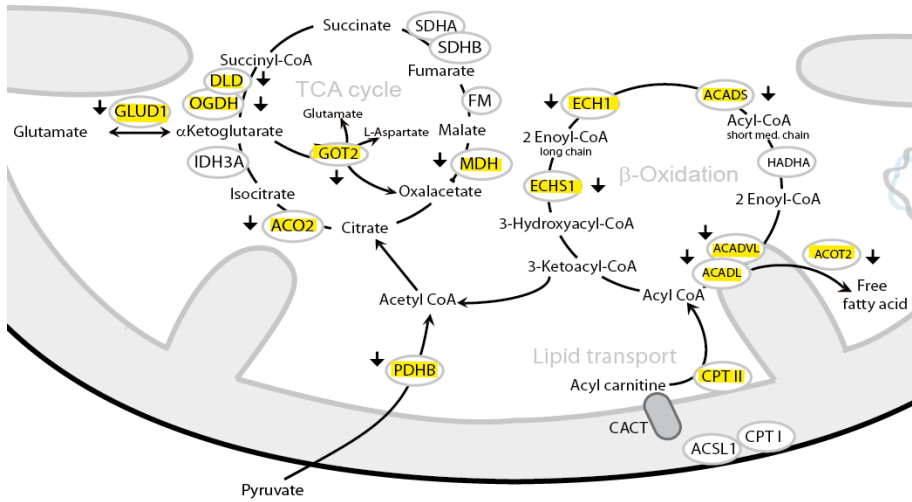


Figura 43: Disegno schematico delle proteine che appartengono al ciclo di Krebs, alla beta-ossidazione e al trasporto dei lipidi nel mitocondrio. In giallo sono evidenziate le proteine variate tra i mitocondri subsarcolemmali del ratto giovane e senescente, le frecce a fianco del nome della proteina indicano un aumento (↑) o una diminuzione (↓) nel senescente rispetto al giovane.

Nella Figura 44 sono state rappresentate le proteine variate che hanno sub localizzazione nelle membrane mitocondriali. Si noti come la maggior parte delle proteine delle membrane sia aumentata nei SSM del senescente rispetto al giovane.

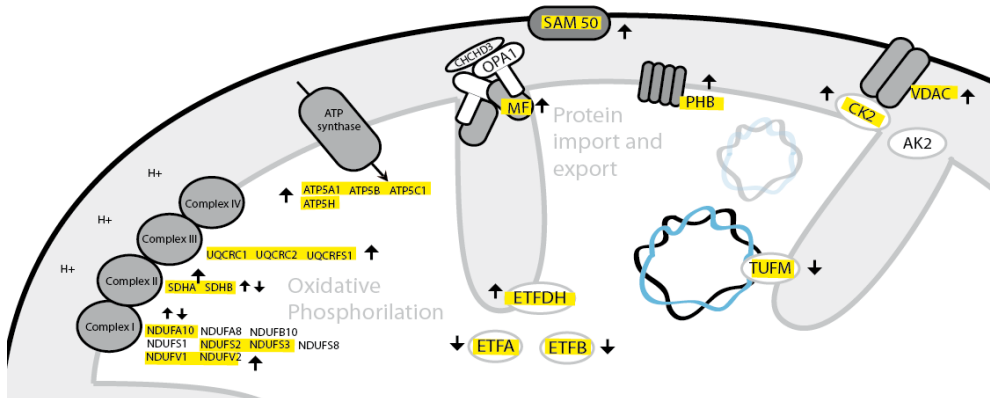


Figura 44: Disegno schematico delle proteine che appartengono alla fosforilazione ossidativa e all'importo ed esposto delle proteine dal mitocondrio. In giallo sono evidenziate le proteine variate tra i mitocondri subsarcolemmali del giovane e senescente, le frecce a fianco del nome

della proteina indicano un aumento (⬆) o una diminuzione (⬇) nel ratto senescente rispetto al giovane.

Infine le proteine differenzialmente espresse dei mitocondri intermiofibrillari nel confronto tra senescente e giovane (elencate in Tabella appendice 6), sono state suddivise in classi funzionali e rappresentate con un istogramma a barre, vedi Figura 45. Nel complesso i IFM del senescente hanno tutte le proteine aumentate, tranne una, rispetto al giovane, la maggior parte delle proteine variate fanno parte della fosforilazione ossidativa.

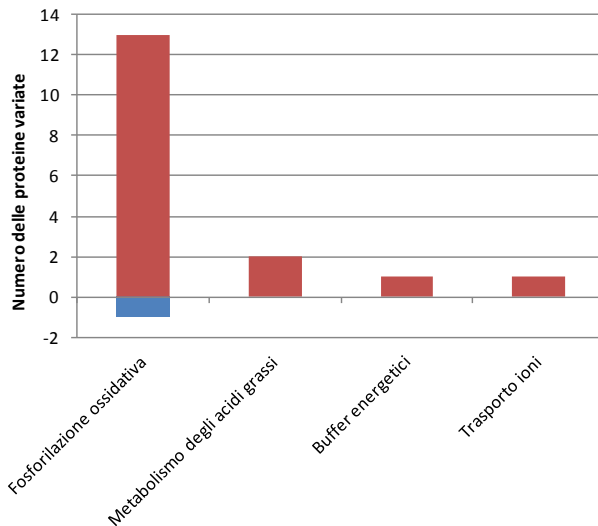


Figura 45: L'istogramma rappresenta il numero delle proteine variate (p value < 0.01) ed identificate nei confronti mitocondri intermiofibrillari tra ratto giovane e senescente, divise in classi funzionali. Le barre rosse indicano il numero delle proteine up regolate nei IFM del senescente rispetto al giovane. Le barre blu indicano il numero delle proteine down-regolate.

7.3.1.4.3 Considerazioni sulle proteine della fosforilazione ossidativa

Le proteine della fosforilazione ossidativa sono ampiamente espresse nei mitocondri, dato il loro compito di produrre ATP. Si osserva, nei confronti riguardanti i mitocondri subsarcolemmali, un andamento opposto delle proteine della fosforilazione ossidativa. Infatti nel vecchio, si ha una diminuzione delle proteine della fosforilazione ossidativa, mentre nel senescente, si ha un aumento (Figura 46). Infine, nel muscolo totale sia del vecchio che del senescente, si ha

sempre una diminuzione dell'espressione delle proteine della fosforilazione ossidativa rispetto al giovane.

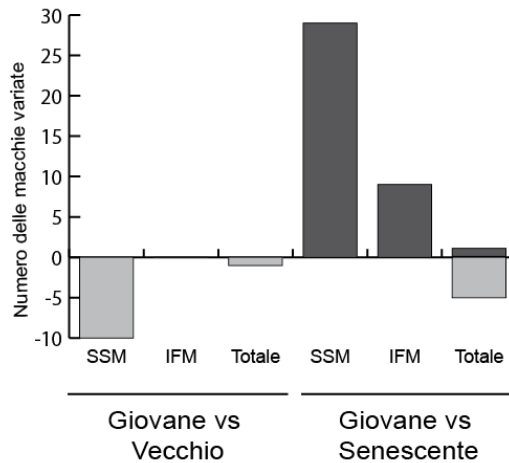


Figura 46: L'istogramma rappresenta il numero delle macchie identificate come proteine della catena respiratoria, *over* o *down* regolate, nei confronti eseguiti tra ratti giovane, vecchio e senescente. I dati si riferiscono ai risultati della proteomica differenziale di muscolo cardiaco totale e di quella mitocondriale degli estratti da mitocondri subsarcolemmali (SSM) e mitocondri intermiofibrillari (IFM).

7.3.1.5 Immunoblotting per la valutazione dell'integrità mitocondriale

L'arricchimento delle frazioni mitocondriali è stata valutato mediante *immunoblotting*. Come *marker* sono state scelte due proteine della matrice (IDH2 e Citrato sintasi), una proteina delle membrana mitocondriale esterna (Vdac1) e una della membrana mitocondriale interna (Ndufa6). Per valutare l'arricchimento è stato comparato il quantitativo di queste proteine negli estratti mitocondriali con il contenuto nell'estratto da muscolo totale.

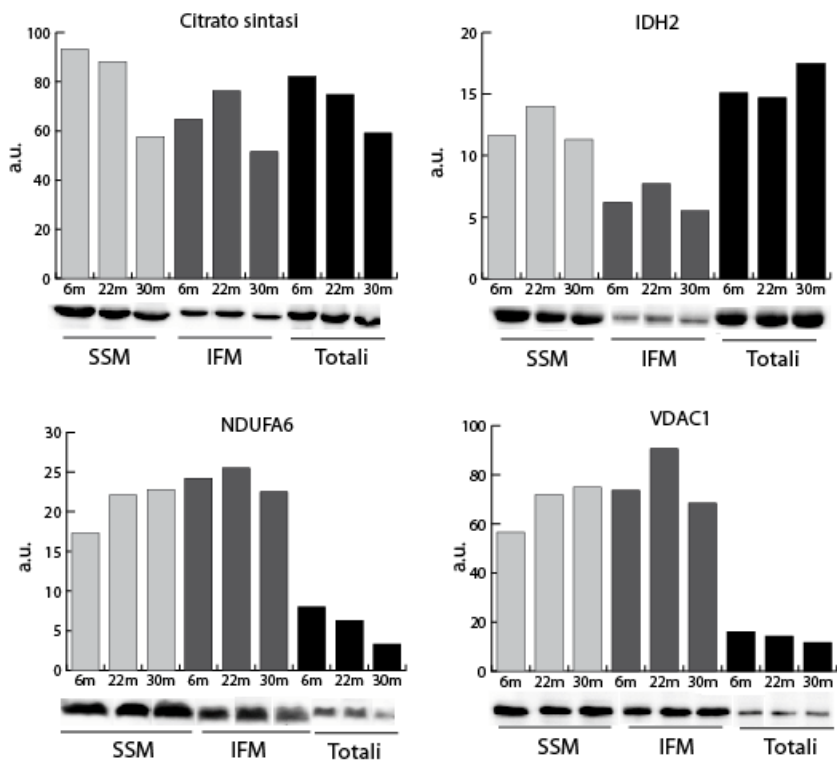


Figura 47: Analisi mediante *immunoblotting* dell'arricchimento di proteine mitocondriali. È stata verificato l'arricchimento negli estratti proteici dei mitocondri subsarcolemmali (SS) e intermiofibrillari (IFM), mediante *immunoblotting*. Si sono confrontate le quantità di due proteine marker della matrice mitocondriale (IDH2 e Citrato sintasi) e di due proteine marker delle membrane mitocondriali (VDCA1 e NDUFA6) rispetto al contenuto nell'estratto di muscolo cardiaco in toto. Le sigle 6m, 22m, 30m indicano i mesi d'età dei campioni di cuore di ratto quindi, rispettivamente, Giovane, Vecchio e Senescente.

Si è osservato che, come ci si aspettava, le proteine delle membrane mitocondriali sono ben arricchite, tanto che raggiungono percentuali di arricchimento del 600%. L'arricchimento delle proteine di membrana sembra aumentare con l'invecchiamento, soprattutto nei mitocondri IF. Mentre, al contrario dell'atteso, le proteine della matrice non sono arricchite rispetto al muscolo totale. Questi dati suggeriscono che i mitocondri isolati sia IFM che SSM sono rotti. Nei grafici in Figura 48, vi sono riassunti gli andamenti degli arricchimenti nei mitocondri SSM ed IFM per età, delle proteine *marker* testate.

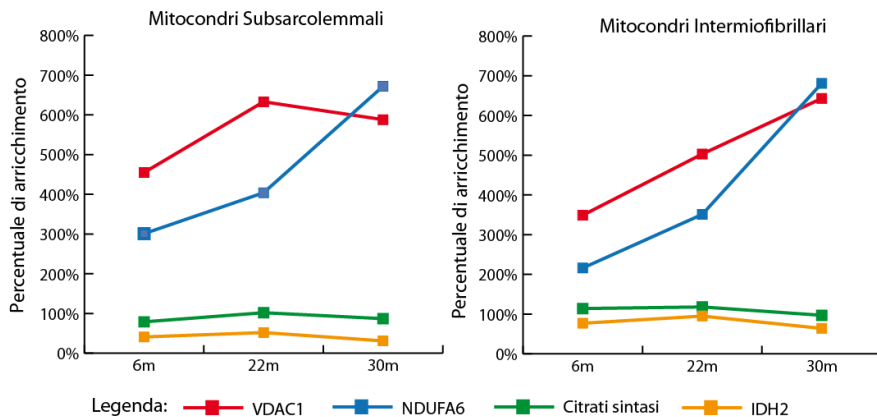


Figura 48: Grafico a punti, riassuntivo del calcolo dell'arricchimento delle proteine mitocondriali testate negli estratti proteici di mitocondri SS e IFM. Le sigle 6m, 22m, 30m indicano i mesi d'età dei campioni di cuore di ratto quindi, rispettivamente, Giovane, Vecchio e Senescente.

7.3.1.6 Immunoblotting sui sovranatanti per la ricerca di proteine mitocondriali

Per verificare l'ipotesi della rottura dei mitocondri, è stata eseguita un'ulteriore prova sui sovranatanti corrispondenti al pellet mitocondriale subsarcolemmale prima dell'ultracentrifuga (Figura 49).



Figura 49: Schema del protocollo di centrifugazioni differenziali effettuate per l'isolamento dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) e intermiofibrillari (IFM). Il sovranatante analizzato è stato riquadrato di rosso.

Nei sovranatanti è stata testata la presenza di due proteine *marker* della matrice mitocondriale (aconitasi 2, Aco2 e alpha ketoglutarato deidrogenasi, Ogdh) e di una proteina associata alla membrana mitocondriale interna (succinato deidrogenasi A, Sdha). Le proteine mitocondriali testate erano tutte presenti nei sovranatanti di giovani, vecchi e senescenti.

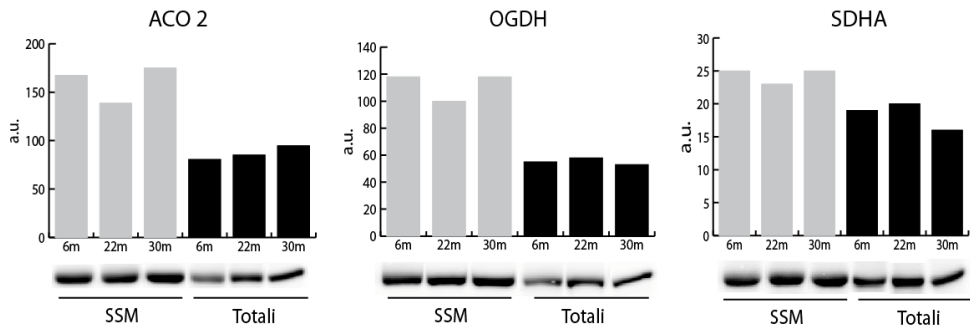


Figura 50: verifica della presenza di proteine mitocondriali nel sovranatante dopo isolamento dei mitocondri. È stata verificata la presenza di proteine mitocondriali negli estratti proteici dei mitocondri subsarcolemmal (SS), mediante *immunoblotting*. Si sono confrontate le quantità di tre proteine mitocondriali (Aconitasi 2, alpha ketoglutarato deidrogenasi e succinato deidrogenasi A) rispetto al contenuto nell'estratto di muscolo cardiaco in toto. Le sigle 6m, 22m, 30m indicano i mesi d'età dei campioni di cuore di ratto quindi, rispettivamente, Giovane, Vecchio e Senescente.

Per l'analisi dei sovranatanti, le proteine presenti sono state precipitate con il *clean-up kit*, e solubilizzate in un volume più piccolo di *lysis buffer*, altrimenti il loro contenuto proteico sarebbe stato troppo diluito per l'analisi con *immunoblotting*.

7.3.1.7 Impiego di kit commerciali

7.3.1.7.1 Kit per l'estrazione dei mitocondri (Kit Mito Iso 1), saggio di integrità delle membrane mitocondriali

Si è voluta verificare l'integrità dei mitocondri con il saggio della citrato sintasi (*Citrate Synthase Assay Kit*) su un altro estratto mitocondriale ottenuto con un *kit* commerciale, il *kit MitoISO1*. Da questa analisi è risultato che i mitocondri del giovane hanno in media il 47% dei mitocondri rotti, mentre per il vecchio ed il senescente, la percentuale di rottura sale rispettivamente al 55% e al 54%. Anche impiegando un *kit* commerciale per isolare i mitocondri da muscolo cardiaco, risultano per la maggior parte rotti.

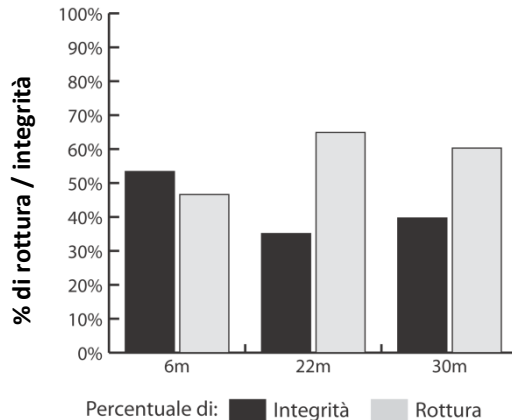


Figura 51: Percentuale di rottura delle membrane mitocondriali dopo estrazione con *Kit MitoISO1*. Calcolo della percentuale di rottura di mitocondri estratti con *kit MitoISO1* mediante misura dell'attività della citrato sintasi. Le sigle 6m, 22m, 30m indicano rispettivamente, 6, 22 e 30 mesi.

7.3.1.7.2 *Kit per l'estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali*

Data la buona resa di estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali, abbiamo concentrato la nostra attenzione sul loro studio; per farlo abbiamo impiegato un *kit* per l'estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali *Minute™ Mitochondria Membrane Protein Isolation Kit*. Prima dell'analisi quantitativa, si è voluto testare il *kit* per verificare il suo funzionamento. Il primo risultato è che a partire da 27,2 mg di tessuto si ottengono 14 µg di proteine delle membrane mitocondriali, quindi una resa di estrazione pari a 0,5 µg di proteine per mg di tessuto.

Per testare la presenza di proteine del citosol della matrice e delle membrane mitocondriali sono stati allestiti degli *immunoblotting*, analizzando tutti i sovranatanti ed i pellet che sarebbero stati scartati nei passaggi del *kit*. Per l'analisi dei pellet è stata fatta un'aggiunta di lysis buffer per solubilizzare il contenuto, per i sovranatanti le proteine presenti sono state precipitate con il *clean-up kit*, altrimenti il loro contenuto sarebbe stato troppo scarso. L'*immunoblotting* eseguito è di tipo qualitativo, in quanto la quantità di materiale caricata è molto variabile e riportato alla fine di ogni lane della Figura 52. Dato lo scopo, non era importante una quantificazione precisa, ma era necessario poter testare la presenza di determinate proteine.

Sono stati testati tre marker delle membrane mitocondriali (VDAC1, Ndufa6, ATP5b), uno della matrice mitocondriale (aconitasi 2) ed uno del citosol (GAPDH). Il pellet delle proteine delle membrane mitocondriali risulta contaminato in parte da Aco2 e da GAPDH. Il risultato più evidente è che si ha una continua perdita in tutti i pellet e sovranatanti scartati delle proteine delle membrane mitocondriali (Figura 52). Nella sezione materiali e metodi, si trova il disegno sperimentale per la corrispondenza dei pellet e dei sovranatanti nelle fasi del *kit* di estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali.

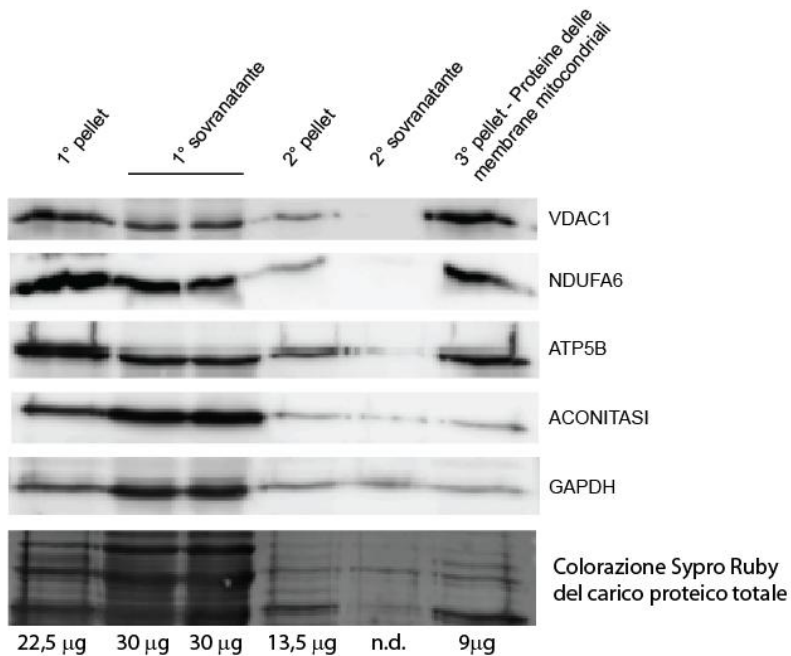


Figura 52: *Immunoblotting* qualitativo per la verifica del *kit* Minute per l'estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali. Sono stati testati gli anticorpi contro una proteina della membrana mitocondriale esterna (VDAC1), due proteine della membrana mitocondriale interna (NDUFA6, ATP5B), una proteina della matrice mitocondriale (Aconitasi Aco2) e una proteina del citosol (GAPDH). In fondo all'immagine vi è la colorazione del carico totale proteico con Sypro Ruby. In µg è espresso il quantitativo proteico caricato per ogni *lane*.

8 DISCUSSIONE

8.1 *Cambiamenti del proteoma del muscolo cardiaco durante l'invecchiamento*

La tecnica 2D-DIGE ha permesso di confermare, quanto già descritto da altri autori [90], che non vi sono grandi cambiamenti proteici a carico del muscolo cardiaco invecchiato. Sebbene le proteine variate siano un numero discreto, il loro incremento, o la loro diminuzione in corso di invecchiamento, è modesto e non coinvolge le principali proteine del muscolo cardiaco, ma isoforme meno significative dal punto di vista quantitativo e spesso non direttamente associabili a modificazioni post-tradizionali. Si nota comunque, nelle proteine variate, una progressione proporzionale con l'invecchiamento. Questo modello d'invecchiamento, con modesti cambiamenti, potrebbe essere associato ad un invecchiamento libero da malattia come nel caso dei centenari, infatti non sviluppa cardiomiopatia spontanea, a differenza di altri modelli murini quali 1) i ratti Fisher 344 i quali sviluppano una cardiomiopatia caratterizzata da degenerazione miocardica, fibrosi e miocardite cronica interstiziale (il 33% dei maschi e il 18% delle femmine) [91]; 2) *Spontaneously hypertensive rats* (SHR) i quali sono un modello di ipertensione primaria (o essenziale) usati per gli studi delle malattie cardiovascolari [92]; 3) *Obese Zucker rats* animali i quali hanno un elevato livello di lipidi e colesterolo nel sangue e sono insulino-resistenti, tutti fattori di rischio per lo sviluppo di cardiomiopatie [93].

I risultati della PCA, derivanti sia dall'analisi dello *hierarchical cluster* che dalla *Differential expression analysis*, indicano che il proteoma del cuore di ratto senescente si discosta maggiormente dai profili proteomici del giovane e del vecchio. In tutti i confronti (giovane vs vecchio, giovane vs senescente e vecchio vs senescente) si ha un maggior numero di proteine *down*-regolate, questo ad indicare probabilmente una diminuita espressione proteica durante l'invecchiamento.

In particolare, nel confronto tra giovane e vecchio, non si hanno grandi variazioni, come detto, sia nel numero che nell'intensità delle variazioni; fanno eccezione però due proteine identificate, una come subunità della miosina a catena leggera

catalitica, ovvero coinvolta nella contrazione *Myosin light chain 4*, e la seconda come subunità della miosina a catena leggera regolatoria *Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform*. Esse sono proteine sarcomeriche coinvolte nella contrazione del muscolo cardiaco [94]. Queste proteine fanno eccezione perché hanno av. Ratio importanti di -2,38 e -6,17 rispettivamente. Valutando però la loro posizione nella mappa bidimensionale, queste non appartengono alle proteine più abbondanti ma a proteine meno espresse (Figura 53).

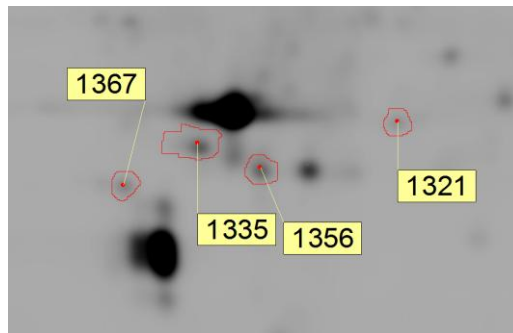


Figura 53: L'immagine rappresenta un ingrandimento di una mappa rappresentativa 2D-DIGE dove sono indicate in particolare le macchie: numero 1335, identificata come *Myosin light chain 4*, e la numero 1367, corrispondente alla *Myosin regulatory light chain 2*, differenzialmente espresse nel confronto giovane vs vecchio (le suddette proteine sono indicate sulla mappa con il rispettivo numero del *master gel*).

Le variazioni nelle proteine meno espresse tra quelle contrattili, potrebbe indicare un iniziale coinvolgimento dell'apparato contrattile, che non intacca ancora la funzionalità cardiaca.

Nel confronto tra giovane e senescente, le macchie differenzialmente espresse sono in un numero più consistente e con variazioni più accentuate. In questo confronto si può osservare un maggior coinvolgimento dell'apparato contrattile in particolare delle proteine che legano le miosine (*miosyn binding protein*). La *myosin binding protein-C* (Mybpc3) è una proteina sarcomerica dai filamenti sottili che interagisce con la titina, la miosina e l'actina; tale proteina regola l'assemblaggio, la struttura e la funzione del sarcomero ed è anche coinvolta nella rigenerazione delle cellule muscolari. La *myosin binding protein-C* ha tre isoforme tessuto specifiche che sono espresse esclusivamente: le Mybpc 1 e Mybpc 2 nel

muscolo scheletrico e la Mybpc 3 nel muscolo cardiaco. La Mybpc 3 comprende il 2% delle proteine contrattili nel cuore. Topi *knockout* per questa proteina hanno un'anormale struttura del sarcomero con alterazione nella grandezza dei filamenti sottili e una mancata linea M nelle unità contrattili. I topi Knockout sono vitali, ma sviluppano cardiomiopatie e disfunzioni contrattili a 3 mesi d'età, indicando che la Mybpc è necessaria per un'organizzazione corretta del sarcomero e una normale funzione cardiaca [47, 95]. È molto interessante osservare che vi sono tre isoforme variate della Mybpc3 nel cuore di ratto e come diminuiscano in modo importante nell'invecchiamento avanzato.

Un'altra proteina variata che lega le miosine è la *Myosin-binding protein H* (Mybph), di cui sono variate nel senescente tre isoforme anche se con delle variazioni meno significative rispetto alla Mybpc3. La Mybph è stata meno studiata come proteina e sembra che la sua localizzazione nel cuore sia confinata alle fibre del Purkinje [96, 97]. Si potrebbe speculare che una sua diminuzione possa in qualche modo influenzare la trasmissione dell'impulso elettrico nel cuore ed inoltre, avanzare l'ipotesi, che le proteine Mybph siano diminuite nel muscolo cardiaco perché vengono rilasciate nel circolo sanguigno. Sarebbe quindi interessante poter ricercare questa proteina nel plasma come possibile biomarker, per il monitoraggio dell'invecchiamento del muscolo cardiaco.

La troponina-I (Tnni3), subunità inibitoria della troponina, ossia il complesso regolatorio del filamento sottile che conferisce sensibilità al calcio nell'interazione dell'actina con le teste della miosina nel sarcomero, è aumentata. Questa proteina ha un andamento particolare nell'invecchiamento del muscolo cardiaco dato che, quando è mutata, porta a cardiomiopatia dilatativa, restrittiva o ipertrofica [98] anche il suo aumento non ha ancora una ben precisa associazione. L'aumento delle troponine nel plasma viene utilizzato in clinica come indicatore diagnostico e prognostico per l'individuazione di danno ai cardiomiociti dopo un evento acuto, quale l'infarto cardiaco; i cardiomiociti danneggiati difatti, rilasciano in circolo il complesso della troponina [99]. Un aumento della troponina I nel tessuto, potrebbe indicare un ripristino e una over espressione della Tn-I nel tessuto a causa di un possibile lieve danno ai cardiomiociti oppure al contrario che vi sia una modificazione post tradizionale della Tn-I la quale rende la proteina non più

efficace e che una difettiva degradazione porti al suo accumulo nel tessuto; ulteriori studi sono necessari per comprendere il ruolo dell'aumento della Tn-I in corso d'invecchiamento nel muscolo cardiaco.

Il metabolismo in corso d'invecchiamento non sembra particolarmente variato, ad eccezione della proteina *Acyl-CoA synthetase family member 2 (Acsf2)*, enzima che catalizza la prima reazione del metabolismo degli acidi grassi la cui diminuzione potrebbe indicare una restrizione nell'impiego di acidi grassi per la produzione di ATP nel cuore senescente, con un conseguente diminuzione dell'energia necessaria per la contrazione [1].

Tra le proteine coinvolte nella fosforilazione ossidativa, solo alcune isoforme hanno importanti variazioni nel senescente come *Ndufa10 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10)* e *Ndufav1 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1)*, subunità del complesso primo della catena respiratoria. Inoltre la proteina *Ubiquinone biosynthesis protein CoQ9 (Coq9)*, coinvolta nella biosintesi del ubiquinone (o coenzima Q), è fortemente diminuita durante l'invecchiamento cardiaco. Studi comparativi su differenti specie mammifere hanno indicato che la quantità di radicale anione superossido generata è direttamente correlata con il contenuto di CoQ9 mitocondriale ed inversamente correlata con l'ammontare di CoQ10 [100]. Nel caso del cuore di ratto senescente si osserva una forte diminuzione della proteina Coq9 probabilmente ad indicare una diminuzione dei radicali liberi presenti nel senescente; questa osservazione è in linea con l'ipotesi di un modello con invecchiamento di successo.

La proteina Aldeide deidrogenasi mitocondriale (*Aldh2*) è l'enzima responsabile dell'ossidazione e detossificazione dell'acetaldeide nel metabolismo dell'etanolo [101, 102]. Recenti studi hanno riportato come una over-espressione della proteina *Aldh2* possa diminuire la generazione di ROS e quindi fornisca una protezione dallo stress ossidativo [102, 103]. Inoltre il gruppo di Li Rui-Jian ha dimostrato come l'impiego dell'*Alpha-lipoic acid (alpha-LA)*, un composto naturale con proprietà antiossidanti, migliori lo stress ossidativo in pazienti con sindrome coronarica acuta, attraverso l'aumento dell'attività antiossidante di *Aldh2* [102]. In questo studio si è osservato come, durante l'invecchiamento, vi sia una marcata diminuzione della proteina *Aldh2*, con Av. Ratio anche oltre -2; è possibile quindi

dedurre che questa proteina sia un candidabile *marker* per il monitoraggio dell'invecchiamento cellulare. In generale, le proteine dello stress sono per la maggior parte diminuite durante l'invecchiamento con poche eccezioni.

Un'altra classe di proteine variata in modo importante nell'invecchiamento sono le serpine: *alpha-1-antiproteinase* (*serpin 1*), *serine protease inhibitor* (Serpina3l) e *serine protease inhibitor A3K* (Serpina3k). Le serpine sono proteine capaci di inibire le serin proteasi, non sono proteine muscolari ma sono localizzate nel plasma e nella matrice extracellulare [104]. Le serpine sono inibitori dell'attivatore del plasminogeno, dell'urochinasi e inoltre inibiscono la fibrinolisi modulando sia il *pathway* della coagulazione che quello dell'infiammazione [104]. Una deficienza di *Alpha-1-antitrypsin* porta allo sviluppo di una patologia genica, nella quale le proteine mutate non ben ripiegate polimerizzano e si accumulano negli epatociti, portando ad un aumento dello stress ossidativo che causa danno tissutale e progressione della patologia (che va a colpire prevalentemente il fegato [105]). Gli studi di Packzec et al., sul siero di ratti invecchiati Wistar e di uomini volontari sani dai 20 agli 82 anni, hanno mostrato una diminuzione dell'attività della tripsina ed un aumento dell'elastasi, confermando che l'attività degli enzimi proteolitici nel siero cambiano con l'invecchiamento [106, 107]. Dai risultati dell'analisi proteomica in corso d'invecchiamento si hanno più macchie diminuite, corrispondenti alle proteine della famiglia delle serpine, ma il loro legame con l'invecchiamento del muscolo cardiaco non è stato ancora ben chiarito.

8.2 Dinamica mitocondriale in corso d'invecchiamento

Per studiare in modo approfondito la dinamica mitocondriale in corso d'invecchiamento, abbiamo valutato alcune proteine coinvolte nella fissione, nella fusione e nell'autofagia. Come ci si aspettava, durante l'invecchiamento, abbiamo osservato una diminuzione delle proteine coinvolte nella fissione (Fis1 e Dlp1), ed un aumento, seppur al limite della significatività, delle proteine della fusione [68]. Mentre per quanto riguarda l'autofagia, al contrario dell'atteso, si assiste ad una diminuita attivazione dell'autofagia durante l'invecchiamento, controllata da mTOR e Bcl2 [67], ma ad un aumento delle forme delipidate delle molecole effettrici (Lc3) che costituiscono l'autofagosoma. Ulteriori studi sono ancora necessari per comprendere a fondo questo paradosso che si osserva in questo modello

d'invecchiamento, ma possiamo ipotizzare una possibile attivazione della via non-canonica dell'autofagia [65].

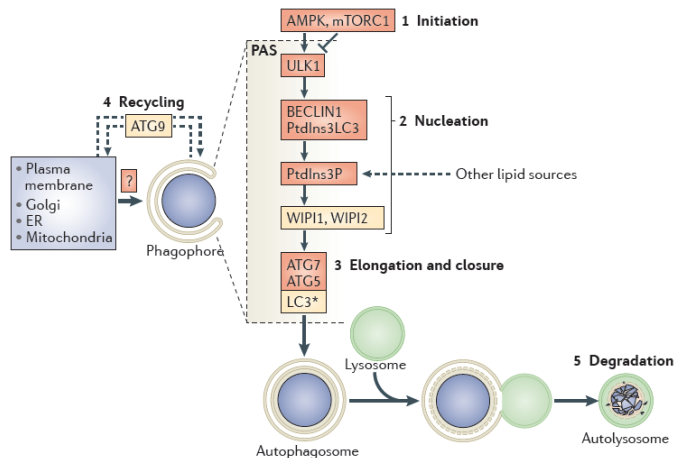


Figura 54: Schema della via canonica e via non canonica dell'autofagia. La via non canonica per la formazione dell'autofagosoma, oltrepassa alcuni passaggi della via canonica dell'autofagia. Le proteine che potrebbero essere oltrepassate durante l'autofagia non canonica sono sottolineate da rettangoli rossi. Immagine modificata dall'articolo di Codogno et al [65].

La via non canonica dell'autofagia esclude dei passaggi chiave dell'autofagia canonica, come la dipendenza da mTor o da Beclin1 [65] (Figura 54). Non è ancora chiaro il motivo per il quale venga attivata dalla cellula una via non canonica dell'autofagia indipendente da Beclin1, si ipotizza però, che sia un meccanismo di adattamento sviluppato nell'evoluzione, per prevenire il blocco dell'autofagia il quale potrebbe essere troppo deleterio per la sopravvivenza cellulare [65].

Un altro meccanismo protettivo è stato osservato nell'invecchiamento di questo modello murino ovvero l'aumento della sirtuina mitocondriale 3, essa ha infatti un ruolo importante nella protezione dallo stress ossidativo.

Infine è stato osservato che la CypD, proteina che impedisce l'inattivazione del poro di permeabilità transitoria mitocondriale (mPTP), aumenta nell'invecchiamento; questo indica che ci potrebbe essere una maggiore suscettibilità all'apertura di mPTP, pertanto rappresenta un fattore deleterio nell'invecchiamento.

Nel complesso sono stati riscontrati normali cambiamenti nell'invecchiamento quali la diminuzione nella fissione mitocondriale, l'aumento di fusione, il blocco dell'attivazione dell'autofagia e l'aumento della CypD; sono stati tuttavia osservati anche cambiamenti protettivi non tipici dell'invecchiamento come l'aumento di Bcl2, di sirt3 e della delipidazione di LC3 con un probabile attivazione non canonica dell'autofagia. I cambiamenti, che risultano essere protettivi per l'invecchiamento, sembrano in linea con un'ipotesi di un invecchiamento di successo, sebbene vi sia una cospicua alterazione della dinamica mitocondriale.

8.3 *Analisi del protocollo di isolamento dei mitocondri*

Per lo studio del proteoma dei mitocondri subsarcolemmali ed intermiofibrillari, si è scelto di isolare i mitocondri utilizzando una combinazione dei protocolli di subfrazionamento di Palmer et al. [84] e di Ferreira et al [82]. Lo scopo era quello di riuscire ad ottenere due frazioni il più purificate possibile. Il protocollo di Palmer, il quale consiste in un metodo tradizionale che utilizza centrifughe differenziali, ci avrebbe permesso di ottenere in due momenti distinti le due subpopolazioni, mentre il protocollo di Ferreira, introducendo l'ultracentrifugazione su gradiente di Percoll, avrebbe invece permesso di purificare ulteriormente le due frazioni.

Dopo le ultracentrifughe abbiamo osservato che ad ogni subpopolazione mitocondriale corrispondevano bande distinte a diverse altezze della provetta da centrifuga, questo ad indicare che le popolazioni hanno effettivamente caratteristiche morfologiche differenti, almeno per quanto riguarda la densità e la grandezza. Date lo spessore delle bande, si può supporre che non vi sia stata la stessa efficienza di isolamento delle subpopolazioni mitocondriali, in particolare sono stati isolati pochi mitocondri intermiofibrillari.

Le frazioni sono risultate ben purificate da una proteina del citosol, da una del nucleo, ma non ben purificata da una proteina dei lisosomi. Questo era un risultato atteso, dato che i lisosomi hanno caratteristiche morfologiche (densità e dimensioni) simili ai mitocondri e, con i protocolli di centrifughe differenziali ed in gradiente di densità, non è possibile separarli in modo efficiente.

Dopo l'isolamento dei mitocondri è stata inoltre misurata l'attività della citrato sintasi. Ci aspettavamo un'attività della citrato sintasi ben più elevata negli estratti mitocondriali, rispetto al muscolo totale, perché l'enzima citrato sintasi, con

localizzazione mitocondriale, sarebbe dovuto essere in quantità più elevata dove vi era un arricchimento di mitocondri; al contrario è risultata una minore attività dell'enzima negli estratti mitocondriali. Avevamo ipotizzato che il problema fosse dovuto alla possibilità che l'enzima fosse stato degradato, a causa del congelamento del tessuto oppure a causa della proteasi Nagarse, utilizzata per la digestione delle miofibrille. Difatti avevamo riscontrato un'ulteriore diminuzione dell'attività della citrato sintasi nei mitocondri intermiofibrillari, per la cui estrazione è stata utilizzato l'enzima Nagarse.

Abbiamo deciso di proseguire nell'allestimento di una mappa standard mitocondriale, dalla quale sono state identificate proteine di tutti i compartimenti mitocondriali, soprattutto della membrana mitocondriale interna e della matrice.

8.4 Cambiamenti inattesi nel Proteoma mitocondriale

È stata effettuata una seconda analisi 2D-DIGE sugli estratti dei mitocondri subsarcolemmali (SSM) ed intermiofibrillari (IFM). Dai risultati dall'analisi statistica della PCA è emerso che le subpopolazioni mitocondriali hanno espressioni proteiche caratteristiche, mentre all'interno della stessa popolazione non vi è separazione tra i mitocondri del giovane e quelli dei vecchi. Questo dato ci ha sorpreso perché ci aspettavamo dei grandi cambiamenti a carico dei mitocondri durante l'invecchiamento, invece i maggiori cambiamenti si sono riscontrati a carico delle subpopolazioni mitocondriali.

Globalmente, dai risultati della *Differential Expression Analysis* e dalle identificazioni effettuate con spettrometria di massa MALDI , si è riscontrato: un aumento delle proteine della matrice mitocondriale ed una diminuzione delle proteine delle membrane mitocondriali, nel vecchio rispetto al giovane, ed un *trend* opposto si è osservato invece nel senescente rispetto al giovane.

In particolare si è notata una forte discrepanza tra le variazioni delle proteine della fosforilazione ossidativa tra il muscolo cardiaco in toto ed i mitocondri subsarcolemmali. Il muscolo cardiaco infatti, durante l'invecchiamento, mostra una progressiva diminuzione delle proteine della fosforilazione ossidativa, mentre, nei mitocondri subsarcolemmali, vi è una diminuzione delle proteine della catena respiratoria nel vecchio ed un loro aumento nel senescente. Il risultato inatteso, dell'aumento delle proteine della fosforilazione ossidativa nel senescente rispetto

al giovane, si osservava sia per i mitocondri subsarcolemmali che per quelli intermiofibrillari.

Questi dati inoltre risultavano in conflitto anche con i dati pubblicati in letteratura sull'invecchiamento del miocardio, i quali riportano i cambiamenti tipici dell'invecchiamento ovvero, un declino delle proteine della catena respiratoria e del consumo di ossigeno con un incremento dei ROS, una diminuzione della produzione di ATP e del potenziale di membrana [1, 82, 108].

8.5 La tecnica di isolamento classica provoca la rottura dei mitocondri

Per i motivi sopra citati, abbiamo verificato l'integrità dei mitocondri estratti verificando gli arricchimenti delle proteine mitocondriali, rispetto al muscolo totale, negli estratti proteici impiegati anche per l'analisi 2D-DIGE. Purtroppo abbiamo osservato un arricchimento solo delle proteine delle membrane mitocondriali, mentre le proteine della matrice non erano arricchite negli estratti mitocondriali. Inoltre pare vi sia un aumento dell'arricchimento delle proteine di membrana nell'invecchiamento, mentre per quanto riguarda le proteine della matrice, non vi è sostanziale differenza tra giovane, vecchio e senescente.

L'ipotesi della rottura dei mitocondri durante l'isolamento è stata confermata con la presenza di proteine della matrice nei sovranatanti corrispondenti al pellet mitocondriale subsarcolemmale prima dell'ultracentrifuga.

Ulteriori conferme sono state fornite anche dall'impiego di *kit* commerciali per isolare i mitocondri e le membrane mitocondriale. Dalla valutazione dell'integrità dei mitocondri attraverso la misura dell'attività della citrato sintasi negli estratti mitocondriali, dopo isolamento con il *kit MitoISO1*, è risultata una percentuale di rottura dal 47% al 55%. Inoltre, nell'esperimento di verifica eseguito dopo l'estrazione delle proteine delle membrane mitocondriali con il *kit MinuteTM*, il pellet finale risulta arricchito delle proteine delle membrane mitocondriali, ma nei vari passaggi vengono perse molte delle proteine delle membrane mitocondriali. Questi esperimenti confermano una mancata preservazione dell'integrità mitocondriale, anche con l'impiego di *kit* commerciali; quindi risulta incauto anche il loro impiego per analisi di tipo quantitativo.

Nel 2007 Frezza e Scorrano hanno pubblicato sulla rivista Nature il protocollo per l'estrazione dei mitocondri, sia da fibroblasti embrionali murini (MEFs), che da tessuto muscolare scheletrico di topo. Essi pongono come punto critico l'utilizzo dell'omogeneizzatore di Potter nella fase di omogeneizzazione del tessuto e suggeriscono l'impiego dell'accoppiamento tra pestello di Teflon (materiale plastico polimerico) e camicia di vetro, perché rappresentano il miglior compromesso per la preservazione e l'integrità dei mitocondri, sebbene, dichiarino che i mitocondri in questa fase siano facilmente danneggiabili [109].

8.6 I mitocondri sono reti di tubuli interconnessi

Recenti studi di Martin Picard et al. hanno messo in evidenza come il tradizionale metodo per l'isolamento dei mitocondri, il quale impiega una rottura meccanica del tessuto muscolare e delle centrifughe differenziali, non sia il miglior metodo per lo studio dei mitocondri. L'isolamento mitocondriale infatti causa: frammentazione morfologica dell'organello, aumento drammatico della suscettibilità all'apertura del mtPTP, alterazione differenti della respirazione mitocondriale a seconda della condizione sperimentale e drammatico aumento della produzione di H₂O₂ [110]. L'impiego dell'omogeneizzatore di Potter, per ottenere la rottura meccanica della cellula, non preserva l'integrità mitocondriale, ma crea, anzi, delle rotture temporanee delle membrane mitocondriali con perdita del contenuto della matrice e/o delle membrane mitocondriali interne e acquisizione del contenuto del medium d'isolamento [42, 111].

Dagli esperimenti eseguiti è risultato che gli estratti mitocondriali hanno una perdita del contenuto della matrice ed un conseguente arricchimento delle proteine di membrana. L'isolamento dei mitocondri con l'impiego dell'omogeneizzatore di Potter non funziona, perché si basa su un "antico" concetto il quale prevede che la struttura dei mitocondri abbia una forma sferoidale simile a dei fagioli e che la rottura meccanica permetta il rilascio dei mitocondri dal proprio contesto [42].

Invece, come da molte recenti evidenze, i mitocondri nella cellula sono organizzati in "reti di tubuli interconnessi" che interagiscono con altri organelli della cellula (come il reticolo endoplasmico) e con il citoscheletro [112]; i mitocondri essendo molto dinamici, grazie alla loro capacità di fusione e fissione, sono in continua trasformazione. La procedura di isolamento porta quindi necessariamente alla

dissoluzione di queste reti di tubuli e alla riaggregazione in piccoli mitocondri circolari, con conseguente perdita del contenuto della matrice [113] e la formazione di organelli che si possono definire “artefatti tecnici”. Come mostrato nella Figura 55, dalle immagini di microscopia e dalle ricostruzioni 3D al computer, è chiaramente visibile che dopo l'estrazione con omogeneizzatore di Potter vi è una distruzione della rete tubulare mitocondriale [42].

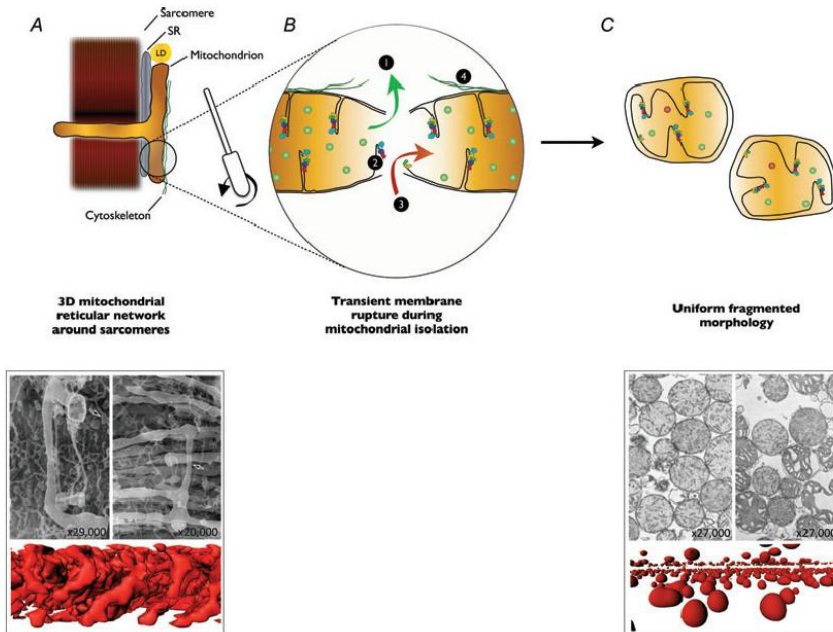


Figura 55: L'isolamento mitocondriale frammenta i mitocondri ed altera la funzione mitocondriale. Il risultato finale dell'isolamento è una popolazione relativamente omogenea di organelli sferici rigonfi, con creste disorganizzate e con un contenuto della matrice diluito. L'immagine è stata modificata dal lavoro di Picard et al [42], le immagini di microscopia si riferiscono al muscolo scheletrico ed ai relativi mitocondri isolati.

Allo stato attuale dell'arte, sembra impensabile riuscire ad isolare mitocondri integri e funzionanti dal muscolo cardiaco o scheletrico, i quali necessitano l'impiego della rottura meccanica e di proteasi per la disgregazione delle miofibrille e per la liberazione dei mitocondri.

Infatti, sebbene alcuni lavori valutino l'integrità mitocondriale dopo l'isolamento, non considerano contemporaneamente marcatori di tutti gli spazi e delle membrane mitocondriale. Un esempio è il lavoro di Song et al. del 2006, essi

utilizzano la tecnica del western blot per valutare l'integrità e la purezza degli organelli organelli isolati, confrontando l'estrazione da tessuto fresco, tessuto omogeneizzato congelato e da tessuto congelato. In particolare, per la frazione dei mitocondri, sono stati utilizzati anticorpi anti-VDAC, per la membrana mitocondriale esterna, anti-citocromo C, per lo spazio intermembrana, e anti-COXIV, per la membrana mitocondriale interna [114]. Non sono stati però impiegati, per una corretta valutazione dell'integrità, anticorpi contro i marcatori della matrice mitocondriale. Inoltre il gruppo di Song utilizza la microscopia elettronica per provare l'integrità e la purezza degli organelli, ma, come è stato illustrato, i mitocondri circolari che si osservano dalle immagini di microscopia, non sono altro che strutture mitocondriali rimaneggiate a causa delle procedure di isolamento.

Dalle nostre analisi confermiamo che la rottura dei mitocondri sussiste proprio nella fase di isolamento, con una perdita in particolare delle proteine della matrice mitocondriale. Pertanto riteniamo che non sia possibile applicare una metodologia quantitativa, quando nella preparazione del campione, l'estratto mitocondriale, risulta compromesso. Inoltre non possiamo più considerare attendibili gli articoli pubblicati basati sull'estrazione mitocondriale mediante omogeneizzatore di Potter, a meno che non vi sia una prova di un arricchimento omogeneo delle proteine mitocondriali. Con questo lavoro vogliamo proporre un controllo di qualità dell'estratto mitocondriale da applicare prima dell'analisi quantitativa, che non si basi solo sulla verifica della purificazione dalle proteine degli altri compartimenti cellulari (quali nuclei o citoplasma), ma anche sull'arricchimento delle proteine degli stessi compartimenti mitocondriali (quali membrane e spazi mitocondriali). Anche le tecnologie emergenti per la purificazione degli organelli, quali la *free flow electrophoresis*, la purificazione per immunoaffinità e la *Fluorescence-activated organelle sorting* sono necessariamente influenzate dal metodo di isolamento dei mitocondri perché basate sull'utilizzo di mitocondri necessariamente integri [79].

9 CONCLUSIONI

Grazie alla tecnica 2D-DIGE abbiamo compreso che, durante l'invecchiamento fisiologico del cuore di ratto, le variazioni proteiche sono poche e di entità modesta; in particolare le variazioni interessano le proteine contrattili, le proteine della glicolisi e della catena respiratoria, probabilmente perché il cuore è un organo vitale ed il suo buon funzionamento è necessario per la sopravvivenza. Le proteine emerse da questa analisi e gli andamenti che caratterizzano l'invecchiamento intrinseco del miocardio (perché in condizione libera da patologie secondarie), sono le seguenti:

- le proteine che legano le miosine (*myosin binding protein*), le quali sono diminuite;
- la troponina I, subunità inibitoria della troponina, la quale è aumentata;
- la proteina aldeide deidrogenasi mitocondriale (Aldh2), la quale è diminuita;
- le proteine della famiglia delle serpine le quali sono tutte diminuite.

I loro andamenti sembrano caratterizzare l'invecchiamento e potrebbero essere utilizzati come biomarcatori al fine di individuare in modo precoce i segni dell'invecchiamento. I risultati sul muscolo cardiaco in toto hanno inoltre evidenziato, accanto ai cambiamenti tipici dell'invecchiamento (quali un'attivazione difettosa della via classica dell'autofagia, una diminuzione della generazione di nuovi mitocondri per fissione ed un aumento della fusione mitocondriale), l'attivazione di meccanismi protettivi (quali l'aumento della resistenza all'apoptosi, l'aumento della sirtuina 3 e la possibile attivazione della via non canonica dell'autofagia).

Lo studio dei cambiamenti a livello proteomico del muscolo cardiaco, in questo modello fisiologico d'invecchiamento, ci ha permesso di osservare i cambiamenti che avvengono solo per l'effetto dell'invecchiamento intrinseco del miocardio; tale invecchiamento viene da noi paragonato ad un invecchiamento libero da malattia, come nel caso dei soggetti centenari. Infatti, questi animali non hanno, né l'influenza dei fattori di rischio spesso presenti nell'uomo quali diabete o

ipertensione, né la tendenza allo sviluppo spontaneo di cardiomiopatie. I loro cambiamenti nel proteoma sono limitati e sono sia di tipo deleterio che di tipo protettivo, quest'ultimi sono probabilmente i fattori fondamentali per un giusto equilibrio per un invecchiamento di successo.

Lo studio del proteoma mitocondriale, basato sull'isolamento dei mitocondri, sebbene sia in teoria un ottimo approccio per superare il *range* dinamico dell'espressione proteica nel muscolo cardiaco, non può essere utilizzato per l'analisi quantitativa. Infatti, come la tecnica 2D-DIGE ha messo in luce, vi era una discrepanza tra i dati del muscolo cardiaco in toto e quelli del proteoma mitocondriale. Questa valutazione è stata suffragata da recenti pubblicazioni, che criticano la metodologia classica di isolamento dei mitocondri, in quanto, a dispetto del suo ampio utilizzo, essa permette lo studio di una sola parte dei mitocondri della cellula muscolare ed inoltre distrugge, sia la complessa rete tridimensionale mitocondriale, che l'interazione dei mitocondri con altri compartimenti cellulari quali citoscheletro e reticolo endoplasmico. Con questo lavoro è stato messo in luce un problema tecnico che dovrebbe essere affrontato e valutato in modo critico da tutta la comunità scientifica; dal canto nostro proponiamo, prima delle analisi quantitative, una valutazione dell'integrità dei mitocondri isolati (considerando sia le proteine delle membrane che degli spazi mitocondriali), per garantire l'affidabilità dei successivi risultati ottenuti. Queste osservazioni dovrebbero costringere ogni scienziato alla cautela nelle considerazioni sui dati ottenuti dall'isolamento dei mitocondri senza l'inserimento di un accurato controllo dell'integrità mitocondriale.

10 PROSPETTIVE FUTURE

Ulteriori avanzamenti saranno possibili comparando il modello di invecchiamento fisiologico con altri modelli di patologie cardiovascolari. Il confronto permetterà di comprendere se i biomarcatori candidati per il monitoraggio dell'invecchiamento, possano anticipare la manifestazione delle patologie cardiache, oppure se essi stessi, abbiano un ruolo causale nelle patologie cardiache. Infine è auspicabile la traslazione dei risultati dall'animale, all'uomo, per l'individuazione di nuovi target

per la prevenzione o la terapia delle malattie cardiovascolari associate all'invecchiamento.

11 BIBLIOGRAFIA

- [1] Chakravarti B, Oseguera M, Dalal N, Fathy P, Mallik B, Raval A, et al. Proteomic profiling of aging in the mouse heart: Altered expression of mitochondrial proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;474:22-31.
- [2] Bergman H, Ferrucci L, Guralnik J, Hogan DB, Hummel S, Karunanathan S, et al. Frailty: an emerging research and clinical paradigm--issues and controversies. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2007;62:731-7.
- [3] Xue QL. The frailty syndrome: definition and natural history. *Clinics in geriatric medicine*. 2011;27:1-15.
- [4] Cruz-Jentoft AJ, Boland B, Rexach L. Drug therapy optimization at the end of life. *Drugs & aging*. 2012;29:511-21.
- [5] Venturelli M, Schena F, Richardson RS. The role of exercise capacity in the health and longevity of centenarians. *Maturitas*. 2012;73:115-20.
- [6] Salinas SUM. Sull'invecchiamento della popolazione, appunti e riflessioni. 2004.
- [7] Instat. "Il futuro demografico del paese: previsioni regionali della popolazione residente al 2065". 2011.
- [8] Ferrara N, CG, Scarpa D., Rengo G., Longobardi G., Mazzella F., Cacciatore F., Rengo F. Teorie dell'invecchiamento (The aging theories). *g gerontol*. 2005;53:57-74.
- [9] Jaeger CD. Fisiologia dell'invecchiamento. *Medicina Riabilitativa*.
- [10] Shioi T, Inuzuka Y. Aging as a substrate of heart failure. *Journal of cardiology*. 2012;60:423-8.
- [11] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153:1194-217.
- [12] Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;361:1475-85.
- [13] Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481:287-94.
- [14] Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*. 1989;1:642-5.
- [15] Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, et al. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & development*. 2008;22:832-53.

- [16] Cao L, Li W, Kim S, Brodie SG, Deng CX. Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. *Genes & development*. 2003;17:201-13.
- [17] Wong KK, Maser RS, Bachoo RM, Menon J, Carrasco DR, Gu Y, et al. Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*. 2003;421:643-8.
- [18] Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*. 1999;96:701-12.
- [19] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1961;25:585-621.
- [20] d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes & development*. 2004;18:1781-99.
- [21] Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8:275-83.
- [22] Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, et al. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*. 2011;469:102-6.
- [23] Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, et al. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107 Suppl 1:1710-7.
- [24] Guarente L. Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2011;76:81-90.
- [25] Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging cell*. 2009;8:311-23.
- [26] Naidoo N. ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing research reviews*. 2009;8:150-9.
- [27] Blagosklonny MV. Rapamycin-induced glucose intolerance: hunger or starvation diabetes. *Cell Cycle*. 2011;10:4217-24.
- [28] Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*. 2010;328:321-6.
- [29] Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*. 2012;61:1315-22.
- [30] Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, et al. Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:3438-42.

- [31] Schumacher B, van der Pluijm I, Moorhouse MJ, Kosteus T, Robinson AR, Suh Y, et al. Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms. *PLoS genetics*. 2008;4:e1000161.
- [32] Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nature cell biology*. 2008;10:1241-7.
- [33] McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*. 1989;5:155-71; discussion 72.
- [34] Raffaello A, Rizzuto R. Mitochondrial longevity pathways. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813:260-8.
- [35] Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nature cell biology*. 2010;12:842-6.
- [36] Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, et al. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;284:R474-80.
- [37] Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308:1909-11.
- [38] Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:18769-70.
- [39] Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8:729-40.
- [40] Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Current opinion in immunology*. 2010;22:507-13.
- [41] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging*. 2012;4:166-75.
- [42] Picard M, Taivassalo T, Gouspillou G, Hepple RT. Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of physiology*. 2011;589:4413-21.
- [43] Denollet J, Sys SU, Stroobant N, Rombouts H, Gillebert TC, Brutsaert DL. Personality as independent predictor of long-term mortality in patients with coronary heart disease. *Lancet*. 1996;347:417-21.
- [44] Martin P, Baenziger J, Macdonald M, Siegler IC, Poon LW. Engaged Lifestyle, Personality, and Mental Status Among Centenarians. *Journal of adult development*. 2009;16:199-208.
- [45] Lachman ME, Agrigoroaei S. Promoting functional health in midlife and old age: long-term protective effects of control beliefs, social support, and physical exercise. *PloS one*. 2010;5:e13297.

[46] www.wikipedia.org.

[47] Barefield D, Sadayappan S. Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48:866-75.

[48] Stelzer JE. <http://physiology.case.edu/person/julian-e-stelzer/>.

[49] El-Armouche A, Pohlmann L, Schlossarek S, Starbatty J, Yeh YH, Nattel S, et al. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;43:223-9.

[50] Dai DF, Rabinovitch PS. Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress. *Trends in cardiovascular medicine*. 2009;19:213-20.

[51] Kosugi R, Shioi T, Watanabe-Maeda K, Yoshida Y, Takahashi K, Machida Y, et al. Angiotensin II receptor antagonist attenuates expression of aging markers in diabetic mouse heart. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2006;70:482-8.

[52] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003;107:346-54.

[53] Bruce A. JA, LEWIS Julian , RAFF Martin , ROBERTS Keith , WALTER Peter *Biologia molecolare della cellula*. 5° edizione ed.

[54] Murphy E, Bers D, Rizzuto R. Mitochondria: from basic biology to cardiovascular disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46:765-6.

[55] Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238:450-60.

[56] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*. 1956;11:298-300.

[57] Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology*. 2011;21:569-76.

[58] Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*. 2010;464:520-8.

[59] Toman J, Fiskum G. Influence of aging on membrane permeability transition in brain mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2011;43:3-10.

[60] Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovascular research*. 2006;70:191-9.

[61] Di Lisa F, Bernardi P. A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46:775-80.

- [62] Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813:1316-22.
- [63] Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of cell science*. 2010;123:2533-42.
- [64] Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & development*. 2007;21:2861-73.
- [65] Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13:7-12.
- [66] Campello S, Scorrano L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO reports*. 2010;11:678-84.
- [67] He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*. 2009;43:67-93.
- [68] Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12:503-35.
- [69] Sato A, Nakada K, Hayashi J. Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1763:473-81.
- [70] Gatto L, Vizcaino JA, Hermjakob H, Huber W, Lilley KS. Organelle proteomics experimental designs and analysis. *Proteomics*. 2010;10:3957-69.
- [71] Lee YH, Tan HT, Chung MC. Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. *Proteomics*. 2010;10:3935-56.
- [72] Dreger M. Subcellular proteomics. *Mass spectrometry reviews*. 2003;22:27-56.
- [73] Graham JM, Ford T, Rickwood D. Isolation of the major subcellular organelles from mouse liver using Nycodenz gradients without the use of an ultracentrifuge. *Analytical biochemistry*. 1990;187:318-23.
- [74] J. M. Graham DR. *Subcellular Fractionation : A Practical Approach*: Oxford University Press; 1997.
- [75] Wildgruber R, Weber G, Wise P, Grimm D, Bauer J. Free flow electrophoresis in proteome sample preparation. *Proteomics*. 2013.
- [76] Zischka H, Braun RJ, Marantidis EP, Buringer D, Bornhovd C, Hauck SM, et al. Differential analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free flow electrophoresis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2006;5:2185-200.

- [77] Fang X, Zhang WW. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *Journal of proteomics*. 2008;71:284-303.
- [78] Bock G, Steinlein P, Huber LA. Cell biologists sort things out: Analysis and purification of intracellular organelles by flow cytometry. *Trends in cell biology*. 1997;7:499-503.
- [79] Cao Z, Li C, Higginbotham JN, Franklin JL, Tabb DL, Graves-Deal R, et al. Use of fluorescence-activated vesicle sorting for isolation of Naked2-associated, basolaterally targeted exocytic vesicles for proteomics analysis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2008;7:1651-67.
- [80] Lukyanenko V, Chikando A, Lederer WJ. Mitochondria in cardiomyocyte Ca²⁺ signaling. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41:1957-71.
- [81] Hoppel CL, Tandler B, Fujioka H, Riva A. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41:1949-56.
- [82] Ferreira R, Vitorino R, Alves RM, Appell HJ, Powers SK, Duarte JA, et al. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *Proteomics*. 2010;10:3142-54.
- [83] Satori CP, Kostal V, Arriaga EA. Review on recent advances in the analysis of isolated organelles. *Analytica chimica acta*. 2012;753:8-18.
- [84] Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *The Journal of biological chemistry*. 1977;252:8731-9.
- [85] Laboratory H. Datasheet Sprague Dawley www.harlan.com.
- [86] Vigano A, Vasso M, Caretti A, Bravata V, Terraneo L, Fania C, et al. Protein modulation in mouse heart under acute and chronic hypoxia. *Proteomics*. 2011;11:4202-17.
- [87] Y. B. On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistic. *Journal of educational and behavioral statistics*. 2000;25:60-3.
- [88] Rovetta s. Il problema del clustering. 2003.
- [89] Moriggi M, Vasso M, Fania C, Capitanio D, Bonifacio G, Salanova M, et al. Long term bed rest with and without vibration exercise countermeasures: effects on human muscle protein dysregulation. *Proteomics*. 2010;10:3756-74.
- [90] Walther DM, Mann M. Accurate quantification of more than 4000 mouse tissue proteins reveals minimal proteome changes during aging. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10:M110 004523.
- [91] Coleman GL, Barthold W, Osbaldiston GW, Foster SJ, Jonas AM. Pathological changes during aging in barrier-reared Fischer 344 male rats. *Journal of gerontology*. 1977;32:258-78.

- [92] Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Japanese circulation journal. 1963;27:282-93.
- [93] Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN. The diabetic Zucker fatty rat. Proc Soc Exp Biol Med. 1983;173:68-75.
- [94] Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. Science. 1993;261:58-65.
- [95] Cheng Y, Wan X, McElfresh TA, Chen X, Gresham KS, Rosenbaum DS, et al. Impaired contractile function due to decreased cardiac myosin binding protein C content in the sarcomere. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2013;305:H52-65.
- [96] Gilbert R, Cohen JA, Pardo S, Basu A, Fischman DA. Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle. Journal of cell science. 1999;112 (Pt 1):69-79.
- [97] Alyonycheva T, Cohen-Gould L, Siewert C, Fischman DA, Mikawa T. Skeletal muscle-specific myosin binding protein-H is expressed in Purkinje fibers of the cardiac conduction system. Circulation research. 1997;80:665-72.
- [98] GeneCards. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNNI3>.
- [99] Mueller C. Use of high-sensitivity troponin for the diagnosis of acute myocardial infarction. Coronary artery disease. 2013;24:710-2.
- [100] Sohal RS, Forster MJ. Coenzyme Q, oxidative stress and aging. Mitochondrion. 2007;7 Suppl:S103-11.
- [101] Bosron WF, Li TK, Vallee BL. New molecular forms of human liver alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of ADHIndianapolis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1980;77:5784-8.
- [102] Li RJ, Ji WQ, Pang JJ, Wang JL, Chen YG, Zhang Y. Alpha-lipoic acid ameliorates oxidative stress by increasing aldehyde dehydrogenase-2 activity in patients with acute coronary syndrome. The Tohoku journal of experimental medicine. 2013;229:45-51.
- [103] Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhofer J, Muller J, Hortmann M, Oelze M, et al. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. Cardiovascular research. 2008;80:280-9.
- [104] Chen H, Davids JA, Zheng D, Bryant M, Bot I, van Berckel TJ, et al. The serpin solution; targeting thrombotic and thrombolytic serine proteases in inflammation. Cardiovascular & hematological disorders drug targets. 2013;13:99-110.
- [105] Marcus NY, Blomenkamp K, Ahmad M, Teckman JH. Oxidative stress contributes to liver damage in a murine model of alpha-1-antitrypsin deficiency. Exp Biol Med (Maywood). 2012;237:1163-72.

- [106] Paczek L, Michalska W, Bartłomiejczyk I. Trypsin, elastase, plasmin and MMP-9 activity in the serum during the human ageing process. *Age and ageing*. 2008;37:318-23.
- [107] Paczek L, Michalska W, Bartłomiejczyk I. Proteolytic enzyme activity as a result of aging. *Aging clinical and experimental research*. 2009;21:9-13.
- [108] Fu YJ, Xiong S, Lovell MA, Lynn BC. Quantitative proteomic analysis of mitochondria in aging PS-1 transgenic mice. *Cellular and molecular neurobiology*. 2009;29:649-64.
- [109] Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature protocols*. 2007;2:287-95.
- [110] Picard M. Pathways to aging: the mitochondrion at the intersection of biological and psychosocial sciences. *Journal of aging research*. 2011;2011:814096.
- [111] Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C, et al. Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PloS one*. 2011;6:e18317.
- [112] Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1100:291-8.
- [113] Picard M, Burelle Y. Mitochondria: starving to reach quorum?: Insight into the physiological purpose of mitochondrial fusion. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2012;34:272-4.
- [114] Song Y, Hao Y, Sun A, Li T, Li W, Guo L, et al. Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics*. 2006;6:5269-77.

12 APPENDICE

Tabella appendice 1: Elenco delle proteine significativamente variate (One way ANOVA e Tukey test <0.01) con i rispettivi Av. Ratio, nei tre confronti (giovane vs vecchio, giovane vs senescente, vecchio vs senescente), il nome della proteina identificata e la classe funzionale di appartenenza. “ni” indica la macchia non identificata, “np” la macchia non prelevata dal gel preparativo. Frammenti* indica i frammenti delle catene pesanti della miosina.

N° Master	Av. Ratio Giovane vs vecchio	Av. Ratio Giovane vs senescente	Av. Ratio Vecchio vs senescente	Nome	Classe funzionale
222			-1,23	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Ciclo di Krebs
516			-1,23	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mit	Ciclo di Krebs
1009			-1,58	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	Ciclo di krebs
226		-1,23		Plasminogen	Emostasi e coagulazione
1053	1,83		-2,28	Haptoglobin	Emostasi e coagulazione
1058	1,74	-1,65	-2,87	Haptoglobin	Emostasi e coagulazione
1463	-1,63	-1,93		Hemoglobin subunit beta-2	Emostasi e coagulazione
1474	-1,66	-2,02	-1,21	Hemoglobin subunit beta-1	Emostasi e coagulazione
1475	-1,52	-2,1	-1,38	Hemoglobin subunit beta-1	Emostasi e coagulazione
1504	-1,46	-2	-1,37	Hemoglobin subunit beta-1	Emostasi e coagulazione
1522			-1,25	Fibrinogen gamma chain	Emostasi e coagulazione
809		2,98	2,71	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Fosforilazione ossidativa
969		-10,35	-11,66	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Fosforilazione ossidativa
1010	-1,52	3,41	5,19	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Fosforilazione ossidativa
1152		-1,32	-1,26	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Fosforilazione ossidativa
1158		-4,61	-4,93	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	Fosforilazione ossidativa
1251		-1,31	-1,3	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Fosforilazione ossidativa
1513		-1,23		Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Fosforilazione ossidativa
192		-1,23		myosin-7	Frammenti*
320		-1,36	-1,37	myosin-7	Frammenti*
381		-1,56	-1,52	myosin-7	Frammenti*
410		-1,61	-1,42	myosin-7	Frammenti*
411		1,24		cardiac myosin heavy chain 5	Frammenti*
479		-1,51	-1,75	myosin-7	Frammenti*
495		-1,22		myosin-6	Frammenti*
555		-1,5	-1,33	cardiac myosin heavy chain 5	Frammenti*
563	1,5			cardiac myosin heavy chain 5	Frammenti*
584		1,34		cardiac myosin heavy chain 5	Frammenti*
734	1,36		-1,31	Aldehyde dehydrogenase,	glicolisi

N° Master	Av. Ratio Giovane vs vecchio	Av. Ratio Giovane vs senescente	Av. Ratio Vecchio vs senescente	Nome	Classe funzionale
				mitochondrial	
740	1,37	-1,63	-2,23	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	glicolisi
756	-1,68	-2,05	-1,22	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	glicolisi
833	-1,58	1,73	1,65	Beta-enolase	glicolisi
836	-1,87	-1,34	1,32	Beta-enolase	glicolisi
1252		1,3	1,22	Phosphoglycerate mutase 2	Glicolisi
1515		1,24		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glicolisi
1517	1,26		-1,26	L-lactate dehydrogenase B chain	Glicolisi
573			-1,23	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Metabolismo degli acidi grassi
628		-1,43	-1,3	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial	Metabolismo degli acidi grassi
939	1,22	1,28		Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Metabolismo degli acidi grassi
1159		-1,23		Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Metabolismo degli acidi grassi
1321	1,68	1,3	-1,29	Apolipoprotein A-I	Metabolismo degli acidi grassi
1501		-1,21		Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Metabolismo degli acidi grassi
87		-2,4	-2,51	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Proteine contrattili e citoscheletriche
88		-3,44	-4,05	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Proteine contrattili e citoscheletriche
96		-2,01	-1,88	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Proteine contrattili e citoscheletriche
317		-1,52	-1,49	myosin H	Proteine contrattili e citoscheletriche
559		-1,41	-1,24	myosin H	Proteine contrattili e citoscheletriche
595		-1,42	-1,3	myosin H	Proteine contrattili e citoscheletriche
665		1,35		Vimentin	Proteine contrattili e citoscheletriche
696	-1,4	-1,45		Tubulin beta-4B chain	Proteine contrattili e citoscheletriche
710			1,23	Desmin	Proteine contrattili e citoscheletriche
711	-1,29	-1,32		Desmin	Proteine contrattili e citoscheletriche
712		1,22	1,31	Desmin	Proteine contrattili e citoscheletriche
993			-1,4	Actin, alpha cardiac muscle 1	Proteine contrattili e citoscheletriche
1190		1,45	1,32	Actin, alpha cardiac muscle 1	Proteine contrattili e citoscheletriche
1234		1,32	1,51	Troponin I, cardiac muscle	Proteine contrattili e citoscheletriche
1335	-2,38	2,16	5,13	Myosin light chain 4	Proteine contrattili e citoscheletriche
1343		1,4	1,42	Cysteine and glycine-rich protein 3	Proteine contrattili e citoscheletriche
1367	-6,17	1,88	11,62	Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform	Proteine contrattili e citoscheletriche
468	-1,21	-1,64	-1,35	Heat shock cognate 71 kDa protein	Proteine dello stress
644	-1,48		1,4	Protein disulfide-isomerase A3	Proteine dello stress
843		1,22	1,24	Ribonuclease inhibitor	Proteine dello stress

N° Master	Av. Ratio Giovane vs vecchio	Av. Ratio Giovane vs senescente	Av. Ratio Vecchio vs senescente	Nome	Classe funzionale
1177	-1,21			3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Proteine dello stress
1331		1,29		Glutathione S-transferase P	Proteine dello stress
1356	-1,21			Peroxiredoxin-2	Proteine dello stress
1502		-1,36	-1,25	Glutathione S-transferase theta-1	Proteine dello stress
846	1,33			Creatine kinase B-type	Trasferimeto energetico
1520			-1,21	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Trasferimeto energetico
367	1,41	1,31		Serotransferrin	Trasporto e legame del ferro
377	1,52	1,27		Serotransferrin	Trasporto e legame del ferro
380	1,48		-1,26	Serotransferrin	Trasporto e legame del ferro
503	-1,22		1,27	Serum albumin	altre
507	-1,28		1,3	Serum albumin	altre
520			-1,39	Calcium-binding mitochondrial	Altre
539		-2,28	-1,68	serine protease inhibitor A3K	Altre
553	-1,31	-1,76	-1,35	Serine protease inhibitor A3L	Altre
568		-1,21		Alpha-2-HS-glycoprotein	Altre
672		-1,76	-1,55	Alpha-1-antiproteinase	Altre
678	-1,4	-1,74		Alpha-1-antiproteinase	Altre
1153		1,46	1,42	Annexin A5	altre
1443		-1,54	-1,65	Transthyretin	altre
1506	-1,3		1,27	Serum albumin	altre
412			-1,33	ni	
423			-1,3	ni	
465	1,26	1,4		ni	
476		-1,78	-2,51	ni	
484		-1,23	-1,26	ni	
680		1,5		ni	
693		1,28		ni	
732	1,44	1,86	1,29	ni	
733		1,51	1,45	ni	
735	1,31	1,53		ni	
805		1,58	1,83	ni	
861			-1,24	ni	
1027		-1,39	-1,23	ni	
1247		-1,24		ni	
1304	1,26	1,27		ni	
1396	-5,51	3,59	1,57	ni	
1473	-1,49	-2,08	-1,4	ni	
1488		1,4	1,39	ni	
1518		-1,3		ni	
505	-1,3		1,32	np	
508	-1,3		1,3	np	
713		1,25	1,25	np	
992		-1,92	-2,1	np	
1157		1,64	1,83	np	
1222		-1,28	-1,24	np	
1246		1,28		np	
1318	1,31	1,37		np	
1366	-5,69	3,61	20,52	np	
1370		1,5	1,44	np	
1385		1,51	1,35	np	

Tabella appendice 2 : Elenco delle proteine significativamente variate e identificate dalla mappa standard di cuore di ratto; per ogni proteina è indicato, il numero della pick list, *accession number*, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI), il nome del gene, il nome della proteina e la classe funzionale di appartenenza.

N° Pick List	AC number	MW (kDa)	pI	Simbolo del gene	Nome	Classe funzionale
5	O70468	140,30	6,20	Mybpc3	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Cytoskeletal and contractile proteins
6	O70468	140,30	6,20	Mybpc3	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Cytoskeletal and contractile proteins
8	O70468	140,30	6,20	Mybpc3	Myosin-binding protein C, cardiac-type	Cytoskeletal and contractile proteins
18	P02564	222,90	5,50	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
21	Q5XI78	116,20	6,30	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
22	Q01177	90,50	6,90	Plg	Plasminogen	Hemostasis and coagulation
31	O88599	49,40	5,30	Mybph	Myosin-binding protein H	Cytoskeletal and contractile proteins
32	P02564	222,90	5,50	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
37	P12346	76,30	7,20	Tf	Serotransferrin	Iron binding and trasport
38	P12346	76,30	7,20	Tf	Serotransferrin	Iron binding and trasport
39	P12346	76,30	7,20	Tf	Serotransferrin	Iron binding and trasport
40	P02564	222,90	5,50	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
46	P02564	222,90	5,50	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
47	P02564	47,80	5,40	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
56	P63018	70,80	5,20	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein	Chaperones and stress response proteins
60	P02564	222,90	5,50	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
64	P02563	223,40	5,50	Myh6	Myosin-6	Cytoskeletal and contractile proteins
66	P02770	68,70	6,10	Alb	Serum albumin	Others
67	P02770	68,70	6,10	Alb	Serum albumin	Others
68	Q920L2	71,60	6,80	Sdha	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, mitochondrial	TCA cycle
69	Q8BH59	74,50	9,10	Slc25a12	Calcium-binding mitochondrial	Others
75	P05545	45,5	5,2	Serpina3k	serine protease inhibitor A3K	Others
76	P05544	36,80	5,00	Serpina3l	Serine protease inhibitor A3L	Others
77	P02564	47,80	5,40	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins

N° Pick List	AC number	MW (kDa)	pI	Simbolo del gene	Nome	Classe funzionale
78	O88599	49,40	5,30	Mybph	Myosin-binding protein H	Cytoskeletal and contractile proteins
79	P02564	47,80	5,40	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
80	P24090	38,00	6,30	Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	Others
82	P45953	70,80	9,60	Acadvl	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Lipid metabolism
83	P02564	47,80	5,40	Myh7	Myosin-7	Cytoskeletal and contractile proteins
86	O88599	49,40	5,30	Mybph	Myosin-binding protein H	Cytoskeletal and contractile proteins
89	Q499N5	67,80	9,30	Acsf2	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial	Lipid metabolism
91	P11598	56,60	5,80	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3	Chaperones and stress response proteins
96	P31000	53,70	4,90	Vim	Vimentin	Cytoskeletal and contractile proteins
97	P17475	46,10	5,70	Serpina1	Alpha-1-antiproteinase	Others
98	P17475	22,80	6,10	Serpina1	Alpha-1-antiproteinase	Others
103	Q6P9T8	49,80	4,60	Tubb4b	Tubulin beta-4B chain	Cytoskeletal and contractile proteins
106	P48675	53,40	5,10	Des	Desmin	Cytoskeletal and contractile proteins
107	P48675	53,40	5,10	Des	Desmin	Cytoskeletal and contractile proteins
108	P48675	53,40	5,10	Des	Desmin	Cytoskeletal and contractile proteins
114	P11884	55,60	6,80	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Chaperones and stress response proteins
115					ni	
116	P11884	55,50	6,40	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Chaperones and stress response proteins
119	P11884	55,60	6,80	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Chaperones and stress response proteins
125	Q5XIH3	50,70	9,40	Ndufv1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
126	Q68FY0	52,80	5,50	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
127	P15429	47,00	7,80	Eno3	Beta-enolase	glycolysis
128	P15429	47,00	7,80	Eno3	Beta-enolase	glycolysis
129	-	49,90	4,50	Rnh1	Ribonuclease inhibitor	Chaperones and stress response proteins
130	-	42,70	5,20	Ckb	Creatine kinase B-type	energy transfer
148	P15650	47,80	8,70	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Lipid metabolism
154	Q561S0	40,50	8,50	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
162	P68033	41,80	5,10	Actc1	Actin, alpha cardiac muscle 1	Cytoskeletal and contractile

N° Pick List	AC number	MW (kDa)	pl	Simbolo del gene	Nome	Classe funzionale
						proteins
164	Q99NA5	39,60	6,50	Idh3a	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	TCA cycle
165	Q561S0	40,50	7,80	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
169	P06866	38,50	6,10	Hp	Haptoglobin	Hemostasis and coagulation
170	P06866	38,50	6,10	Hp	Haptoglobin	Hemostasis and coagulation
179	P13803	34,90	9,50	Etfa	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
180	P14668	35,70	4,80	Anxa5	Annexin A5	Hemostasis and coagulation
182	Q62651	36,20	9,10	Ech1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Lipid metabolism
186	P97532	32,90	5,90	Mpst	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Chaperones and stress response proteins
189	P68033	41,80	5,10	Actc1	Actin, alpha cardiac muscle 1	Cytoskeletal and contractile proteins
197	P23693	24,10	10,10	Tnni3	Troponin I, cardiac muscle	Cytoskeletal and contractile proteins
200	Q68FU3	27,70	8,90	Etfb	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Oxidative phosphorylation
201	P16290	28,70	9,50	Pgam2	Phosphoglycerate mutase 2	glycolysis
217	P04639	29,90	5,40	Apoa1	Apolipoprotein A-1	Lipid metabolism
220	P04906	23,40	7,70	Gstp1	Glutathione S-transferase P	Chaperones and stress response proteins
221	P17209	21,30	4,80	Myl4	Myosin light chain 4	Cytoskeletal and contractile proteins
223	P50463	20,80	10,00	Csrp3	Cysteine and glycine-rich protein 3	Cytoskeletal and contractile proteins
227	P35704	21,80	5,20	Prdx2	Peroxiredoxin-2	Chaperones and stress response proteins
229	-	18,30	4,30		Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform	Cytoskeletal and contractile proteins
237	P02767	13,10	6,10	Ttr	Transthyretin	Others
239	P11517	16,00	9,70	-	Hemoglobin subunit beta-2	Hemostasis and coagulation
241	P02091	16,00	9,00	Hbb	Hemoglobin subunit beta-1	Hemostasis and coagulation
242	P02091	16,00	9,00	Hbb	Hemoglobin subunit beta-1	Hemostasis and coagulation
253	Q64428	82,60	9,80	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Lipid metabolism
254	Q01579	27,50	7,90	Gstt1	Glutathione S-transferase theta-1	Chaperones and stress response proteins
256	P02091	16,00	9,00	Hbb	Hemoglobin subunit beta-1	Hemostasis and coagulation
258	P02770	68,70	6,10	Alb	Serum albumin	Others
263	P12075	12,70	6,50	Cox5b	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
267	P42123	36,60	5,60	Ldhb	L-lactate dehydrogenase B chain	glycolysis
270	P09605	47,40	9,50	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	energy transfer

N° Pick List	AC number	MW (kDa)	pI	Simbolo del gene	Nome	Classe funzionale
271	P15999	55,20	8,90	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
272	P02680	49,60	5,80	Fgg	Fibrinogen gamma chain	Hemostasis and coagulation

Tabella appendice 3: Elenco delle proteine identificate dalla mappa standard di mitocondri subsarcolemmali e intermiofibrillari isolati da cuori di ratto giovane, vecchio e senescente; "ni" non identificato.

N° Pick List	AC number	Mw (kDa)	pI	Nome	Localizzazione subcellulare
1	P02563	223,4	5,5	Myosin-6	Cytoplasm
2	P02563	223,4	5,5	Myosin-6	Cytoplasm
3	Q5X178	116,2	6,3	2-oxoglutarate mitochondrial dehydrogenase,	Mitochondrion matrix
4	Q01177	90,5	6,9	plasminogen	Secreted
5	Q01177	90,5	6,9	plasminogen	Secreted
6	Q5X178	116,2	6,3	2-oxoglutarate mitochondrial dehydrogenase,	Mitochondrion matrix
7	Q5X178	116,2	6,3	2-oxoglutarate mitochondrial dehydrogenase,	Mitochondrion matrix
8	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
9	P02563	223,4	5,5	Myosin-6	Cytoplasm
10	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
11	P02563	223,4	5,5	Myosin-6	Cytoplasm
12	P02563	223,4	5,5	Myosin-6	Cytoplasm
13	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
14	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
15	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
16	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
17	P12346	76,3	7,8	Serotransferrin	Secreted
18	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
19	P12346	76,3	7,8	Serotransferrin	Secreted
20	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
21	P17156	69,7	5,5	Heat shock-related 70 kDa protein 2	mitochondrion
22	Q9ER34	85,4	8,7	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion
23	Q9ER34	85,4	8,7	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion
24	Q9ER34	85,4	8,9	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion
25	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
26	Q9ER34	85,4	8,7	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion
27	Q66HF1	79,4	5,6	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
28	Q66HF1	79,4	5,6	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
29	Q66HF1	79,4	5,6	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
30	ni				
31	Q3KR86	67,1	5,5	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	Mitochondrion inner membrane
32	Q3KR86	67,1	5,5	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	Mitochondrion inner membrane
33	P48721	73,8	5,9	Stress-70 protein, mitochondrial	mitochondrion
34	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
35	Q3KR86	67,1	5,5	Mitochondrial inner membrane protein	Mitochondrion inner membrane
36	P18163	78,1	6,7	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	Mitochondrion outer membrane
37	ni				

N° Pick List	AC number	Mw (kDa)	pI	Nome	Localizzazione subcellulare
38	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
39	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
40	Q64428	82,6	9,8	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion matrix.
41	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
42	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
43	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
44	P02770	68,7	6,1	Serum albumin	Secreted.
45	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
46	P18886	1,1	7,0	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
47	Q920L2	71,6	6,8	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane;
48	Q920L2	71,6	6,8	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane;
49	Q920L2	71,6	6,8	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane;
50	ni				
51	Q9JM53	66,7	9,7	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	Mitochondrion intermembrane space. Mitochondrion inner membrane
52	P45953	70,7	9,7	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane;
	ni				
54	Q66HF3	68,1	7,9	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Mitochondrion inner membrane;
55	P45953	70,7	9,7	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane;
56	Q66HF3	68,1	7,9	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Mitochondrion inner membrane;
57	Q66HF3	68,1	7,9	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Mitochondrion inner membrane;
58	P35527	62,0	5,0	keratin 9 [Homo sapiens]	-
59	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
60	P02769	69,3	5,8	Serum albumin [Bos taurus]	-
61	ni				
62	P63038	60,9	5,8	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Mitochondrion matrix
63	P63038	60,9	5,8	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Mitochondrion matrix
64	P11980	57,8	6,7	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Cytoplasm
65	Q6P6R2	54,0	9,0	Dihydropyridyl dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
66	Q6P6R2	54,0	9,0	Dihydropyridyl dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
67	Q6AXV4	51,9	6,4	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Mitochondrion outer membrane
68	Q9D0K2	56,0	9,5	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial	Mitochondrion matrix
69	ni				
70	ni				
71	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
72	P10860	61,4	8,8	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Mitochondrion matrix
73	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
74	ni				
75	ni				
76	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
77	ni				
78	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
79	ni				
80	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner

N° Pick List	AC number	Mw (kDa)	pI	Nome	Localizzazione subcellulare
					membrane.
81	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
82	Q5XIH3	50,7	9,4	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Mitochondrion inner membrane.
83	Q5XIH3	50,7	9,4	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Mitochondrion inner membrane.
84	Q5XIH3	50,7	9,4	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Mitochondrion inner membrane.
85	Q5XIH3	50,7	9,4	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Mitochondrion inner membrane.
86	Q68FY0	52,8	5,5	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
87	Q641Y2	52,5	6,6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
88	Q641Y2	52,5	6,6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
89	Q8BFR5	49,5	7,9	Elongation factor Tu, mitochondrial	mitochondrion
90	Q5M964	54,4	9,6	Fumarate hydratase 1	mitochondrion, cytoplasm
91	Q5XIH3	50,7	9,4	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Mitochondrion inner membrane.
92	P09605	47,4	9,5	Creatine kinase S-type, mitochondrial *vedi 995	Mitochondrion inner membrane
93	ni				
94	P68033	41,8	5,1	Actin, alpha cardiac muscle 2	Cytoplasm
95	P15650	47,8	8,7	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
96	P09605	47,4	9,5	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
97	P15650	47,8	8,7	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
98	P09605	47,4	9,5	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
99	ni				
100	P32551	48,4	9,6	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
101	P32551	48,4	9,6	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
102	O55171	49,7	8,7	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	Mitochondrion matrix
103	P32551	48,4	9,6	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
104	P32551	48,4	9,6	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
105	P32551	48,4	9,6	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
106	P00564	43,0	6,6	Creatine kinase M-type	Cytoplasm.
107	P15651	44,9	9,3	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix.
108	ni				
109	P32551	48,4	9,6	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
110	ni				
111	ni				
112	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
113	P00507	47,3	9,8	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
114	P00507	47,3	9,8	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
115	Q561S0	40,5	7,8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Mitochondrion matrix
116	Q561S0	40,5	7,8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Mitochondrion matrix
117	ni				

N° Pick List	AC number	Mw (kDa)	pI	Nome	Localizzazione subcellulare
118	ni				
119	Q99NA5	39,6	6,5	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	mitochondrion
120	Q9D6R2	39,6	6,3	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	mitochondrion
121	P04797	35,8	9,0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasm
122	P04797	35,8	9,0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasm
123	Q45QL6	35,0	5,9	Guanine nucleotide binding protein beta 2	Cell membrane
124	P42123	36,6	5,6	L-lactate dehydrogenase B chain	Cytoplasm
125	ni				
126	O88989	36,5	6,2	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Cytoplasm
127	ni				
128	Q9D051	38,9	6,5	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Mitochondrion matrix.
129	P09605	47,4	9,5	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
130	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
131	Q62651	36,2	9,1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Mitochondrion. Peroxisome.
132	P13803	34,9	9,5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion matrix
133	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
134	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
135	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
136	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
137	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
138	ni				
139	ni				
140	P10719	51,2	4,8	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
141	P35435	30,2	9,4	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
142	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
143	Q920L2	71,6	6,8	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane;
144	P67778	29,8	5,5	Prohibitin	Mitochondrion inner membrane
145	P29410	25,5	7,8	Adenylate kinase 2, mitochondrial	Mitochondrion intermembrane space
146	Q68FU3	27,7	8,9	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Mitochondrion matrix
147	P14604	31,5	9,4	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
148	ni				
149	Q9CRB9	26,3	9,3	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
150	Q9DCT2	30,1	6,8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
151	Q9DCT2	30,1	6,8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
152	P21913	26,6	9,4	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
153	P21913	26,6	9,4	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
154	P20788	27,7	9,7	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
155	Q9DCT2	30,1	6,8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-	Mitochondrion inner

N° Pick List	AC number	Mw (kDa)	pI	Nome	Localizzazione subcellulare
				sulfur protein 3, mitochondrial	membrane
156	P21913	26,6	9,4	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
157	P20788	27,7	9,7	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
158	P35435	30,2	9,4	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
159	ni				
160	P20788	27,7	9,7	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
161	Q68FY0	52,8	5,5	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
162	ni				
163	P19234	27,4	6,3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
164	Q68FY0	52,8	5,5	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
165	Q8K3J1	24,0	5,9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	Mitochondrion
166	Q68FY0	52,8	5,5	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
167	ni				
168	Q9DCS9	21,0	9,1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	Mitochondrion inner membrane
169	-	25,6	7,7	H(+)-transporting ATP synthase	-
170	P07895	24,7	9,6	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Mitochondrion matrix.
171	P07895	24,7	9,6	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Mitochondrion matrix.
172	P31399	18,8	6,2	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
173	ni				
174	P31399	18,8	6,2	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
175	P31399	18,8	6,2	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
176	P23928	19,9	6,9	Alpha-crystallin B chain [Rattus rattus]	Cytoplasm
177	P08733	18,9	4,7	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	Cytoplasm
178	P08733	18,9	4,7	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	Cytoplasm
179	D4A311	22,0	9,5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 (NDFUSA8)	Mitochondrion inner membrane
180	P15999	59,7	9,7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
181	P09605	47,4	9,5	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
182	P09605	47,4	9,5	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
183	P04797	35,8	9,0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasm
184	P81155	31,7	8,7	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Mitochondrion outer membrane.
185	P58771	32,7	4,6	Tropomyosin alpha-1 chain	Cytoplasm
186	P10719	51,2	4,8	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
187	P10719	51,2	4,8	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
188	P04636	35,7	9,8	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix.
189	P02564	222,9	5,5	Myosin-7	Cytoplasm
190	Q6P6W6	40,5	7,8	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10	Mitochondrion matrix
191	P11884	55,6	8,5	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix.
192	Q9ER34	85,4	8,7	Aconitate hydratase, mitochondrial	mitochondrion
193	Q920L2	71,6	6,8	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane;

N° Pick List	AC number	Mw (kDa)	pI	Nome	Localizzazione subcellulare
194	P18886	1,1	7,0	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane
195	Q6P6R2	54,0	9,0	Dihydropyridin dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix
196	Q68FY0	52,8	5,5	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
197	Q68FY0	52,8	5,5	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Mitochondrion inner membrane.
198	Q8BFR5	49,5	7,9	Elongation factor Tu, mitochondrial	mitochondrion
199	Q5M964	54,4	9,6	Fumarate hydratase 1	mitochondrion, cytoplasm
200	Q5XI78	116,2	6,3	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	Mitochondrion matrix

Tabella appendice 4: Elenco delle proteine significativamente variate (Student T-test <0.01) nel confronto tra mitocondri subsarcolammali di giovane vs vecchio con i rispettivi numero di master, accession number, Av. Ratio, nome del gene, nome della proteina identificata e la classe funzionale di appartenenza.

N° master	AC number	Av. Ratio	Nome del gene	Nome	Classe funzionale
366	Q3KR86	-1,3	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	Mitochondrial import
367	Q3KR86	-2,01	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	Mitochondrial import
166	Q60597	1,41	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
167	Q60597	1,44	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
168	Q60597	1,38	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
290	Q9ER34	1,43	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
291	Q9ER34	1,34	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
298	Q9ER34	1,46	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
301	Q9ER34	1,36	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
664	Q6P6R2	1,36	Dld	Dihydropyridin dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
669	Q6P6R2	1,38	Dld	Dihydropyridin dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
670	Q6P6R2	1,16	Dld	Dihydropyridin dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
913	Q5M964	1,28	Fh1	Fumarate hydratase 1	TCA cycle
338	Q66HF1	-1,35	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
541	Q66HF3	-1,4	Etfdh	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Oxidative phosphorylation
756	P15999	-1,31	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
843	Q68FY0	-1,35	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1081	Q561S0	-1,38	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1154	Q561S0	-1,42	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1522	Q0QEP3	-1,42	Atp5b	ATP synthase subunit beta	Oxidative phosphorylation
1642	Q9DCT2	-1,39	Ndufs3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-	Oxidative

N° master	AC number	Av. Ratio	Nome del gene	Nome	Classe funzionale
				sulfur protein 3, mitochondrial	phosphorylation
1837	P31399	-1,23	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
2183	Q68FY0	-1,24	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
2189	P10719	-1,31	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
937	Q8BFR5	1,27	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	Protein biosynthesis
413	P48721	1,32	Hspa9	Stress-70 protein, mitochondrial [Rattus sp.]	stress response
1746	Q9Z0V6*	1,47	Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial (Prdx3)	stress response
616	Q5XIT9	-1,61	Mccc2	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	Aminoacid degradation
1028	P12007	1,32	Ivd	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Aminoacid degradation
393	Q64428	-1,41	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1010	P15650	1,39	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1116	Q6IMX3	1,44	Acads	acyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain	Fatty acid metabolism
1124	Q6IMX3	1,27	Acads	acyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain	Fatty acid metabolism
2180	P15650	1,34	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1183	Q5XIE6	1,21	Hibch	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	Others

Tabella appendice 5: Elenco delle proteine significativamente variate (Sudent T-test <0.01) nel confronto tra mitocondri subsarcolammali di giovane vs senescente con i rispettivi numero di master, accession number, Av. Ratio, nome del gene, nome della proteina identificata e la classe funzionale di appartenenza.

N° master	AC number	Av. Ratio	Nome del gene	Nome	Classe funzionale
596	P63038	-2,45	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Mitochondrial Import
591	P63038	-1,96	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Mitochondrial Import
675	Q6AXV4	1,9	Samm50	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Mitochondrial Import
369	Q3KR86	2,07	Immt	Mitochondrial inner membrane protein	Mitochondrial Import
357	Q3KR86	2,49	Immt	Mitochondrial inner membrane protein (Mitofilin)	Mitochondrial Import
139	Q5XI78	-2,3	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
135	Q5XI78	-2,25	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
128	Q5XI78	-2,08	Ogdh	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
287	Q9ER34	-2,16	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
272	Q9ER34	-2,13	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
280	Q9ER34	-2,11	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
270	Q9ER34	-2,06	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
265	Q9ER34	-1,88	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial	TCA cycle
2389	P04636	-1,94	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle

N° master	AC number	Av. Ratio	Nome del gene	Nome	Classe funzionale
1313	Q9D051	-1,85	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	TCA cycle
653	Q6P6R2	-1,41	Dld	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	TCA cycle
724	P10860	-1,39	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	TCA cycle
726	P15999	1,39	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
741	P15999	1,44	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
802	P15999	1,35	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
814	P15999	1,35	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1100	P15999	2,08	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
2378	P15999	1,22	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1504	P10719	1,43	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
2387	P10719	1,35	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
2388	P10719	1,22	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1918	P31399	1,51	Atp5h	ATP synthase subunit d, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1514	P35435	1,33	Atp5c1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1515	P35435	1,28	Atp5c1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
866	Q68FY0	1,56	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
876	Q68FY0	1,35	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
878	Q68FY0	1,38	Uqcrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
995	P32551	1,3	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
997	P32551	1,33	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1000	P32551	1,33	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1002	P32551	1,26	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1675	P20788	1,31	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1684	P20788	1,38	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1700	P20788	-1,91	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1716	P20788	1,49	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1410	P13803	-2,31	Etfa	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1616	Q68FU3	-1,4	Etfb	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Oxidative phosphorylation
513	Q66HF3	1,58	Etfb	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Oxidative phosphorylation
519	Q66HF3	1,4	Etfb	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Oxidative phosphorylation
526	Q66HF3	1,46	Etfb	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Oxidative phosphorylation
2391	Q6P6W6	2,26	Ndufa10	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10	Oxidative phosphorylation

N° master	AC number	Av. Ratio	Nome del gene	Nome	Classe funzionale
816	Q5XIH3	1,57	Ndufv1	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Oxidative phosphorylation
823	Q5XIH3	1,66	Ndufv1	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Oxidative phosphorylation
827	Q5XIH3	1,6	Ndufv1	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Oxidative phosphorylation
853	Q5XIH3	1,26	Ndufv1	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) flavoprotein 1	Oxidative phosphorylation
1114	Q561S0	-3,77	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1729	P19234	1,52	Ndufv2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
904	Q641Y2	1,4	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1641	Q9DCT2	1,47	Ndufs3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1645	Q9DCT2	1,84	Ndufs3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
456	Q920L2	1,33	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
452	Q920L2	1,33	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1651	P21913	1,52	Sdhb	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1652	P21913	1,38	Sdhb	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1691	P21913	-1,53	Sdhb	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
907	Q8BFR5	-3,23	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	Protein biosynthesis
901	Q8BFR5	-2,8	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial	Protein biosynthesis
1890	P07895	-1,45	Sod2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Stress response
1886	P07895	-1,43	Sod2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Stress response
1617	P14604	-1,75	Echs1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1065	P15651	-1,73	Acads	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1402	Q62651	-1,67	Ech1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
978	P15650	-1,63	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
987	P15650	-1,51	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
505	P45953	-1,27	Acadvl	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
449	P18886	-1,26	Cpt2	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1101	P00507	-1,98	Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1105	P00507	-1,95	Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Fatty acid metabolism
999	O55171	-1,3	Acot2	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1005	Q6IMX3	-1,91	Acads	acyl-coenzyme A dehydrogenase, short chain	Fatty acid metabolism
989	P09605	1,49	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Energy buffering
2379	P09605	1,62	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Energy buffering
2380	P09605	1,63	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Energy buffering
983	P09605	1,71	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Energy buffering
1567	P29410	1,54	Ak2	Adenylate kinase 2, mitochondrial	Energy buffering
1554	P67778	1,35	Phb	Prohibitin	DNA synthesis

Tabella appendice 6: Elenco delle proteine significativamente variate (Sudent T-test <0.01) nel confronto tra mitocondri intermiofibrillari di giovane vs senescente con i rispettivi numero di master, accession number, Av. Ratio, nome del gene, nome della proteina identificata e la classe funzionale di appartenenza.

N° master	AC number	Av. Ratio	Nome del gene	Nome	Classe funzionale
866	Q68FY0	1,36	Uqrc1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1002	P32551	1,33	Uqrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1684	P20788	1,32	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
519	Q66HF3	1,82	Etfdh	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Oxidative phosphorylation
2391	Q6P6W6	3,04	Ndufa10	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10	Oxidative phosphorylation
1114	Q561S0	-5,17	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1149	Q561S0	3,72	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
304	Q66HF1	1,6	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
305	Q66HF1	2,1	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
317	Q66HF1	1,58	Ndufs1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
456	Q920L2	1,48	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
457	Q920L2	1,72	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
1531	Q920L2	1,72	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
452	Q920L2	1,45	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Oxidative phosphorylation
410	Q64428	1,73	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Fatty acid metabolism
402	Q64428	1,97	Hadha	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Fatty acid metabolism
1321	P09605	1,46	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	Energy buffering

13 PRODOTTI SCIENTIFICI DELLA DOTTORANDA

Pubblicazione su riviste scientifiche:

De Palma S, Leone R, Grumati P, Vasso M, Polishchuk R, et al. (2013) “*Changes in Muscle Cell Metabolism and Mechanotransduction Are Associated with Myopathic Phenotype in a Mouse Model of Collagen VI Deficiency*”. PLoS ONE doi:10.1371/journal.pone.0056716

Il manoscritto relativo a questa tesi di dottorato è in fase di stesura.

Presentazione orale a convegno:

Leone R, Viganò A, Fania C, Gelfi C. “*Mitochondrial isolation and proteomic analysis in rat cardiac muscle in course of aging: advantages and critical points*” Intervento orale al convegno “1st SIRC workshop on new roads in cardiovascular research” (Milano, 24 novembre 2012)

Contributo a convegno (Poster):

Leone R, Viganò A, Vasso M, Gelfi C. “*Subsarcolemmal and Intermyofibrillar Mitochondria Metabolism and Dynamics in Rat Heart Aging*”. Poster presentato al congresso “VII ItPA annual congress” (Viterbo, 12 -15 giugno 2012)

Gelfi C, Leone R, Capitanio D, Viganò A, Fania C, Anastasia L, Leri A. “*Differential Proteomics Of Subsarcolemmal And Intermyofibrillar Mitochondria In Rat Cardiac Muscle Aging*”. Poster presentato al congresso “Basic Cardiovascular Sciences” (New Orleans, LA, USA, 18-21 luglio 2011)

Leone R, Capitanio D, Viganò A, Fania C, Anastasia L, Leri A, Gelfi C. “*Differential Proteomics Of Subsarcolemmal And Intermyofibrillar Mitochondria In Rat Cardiac Muscle Aging*”. Poster presentato al congresso “DynaMito (Mitochondrial dynamics) from mechanism to disease congress” (Sardegna, 11-15 settembre 2011)

14 RINGRAZIAMENTI

Il dottorato è l'incubatore per un giovane ricercatore e il trampolino di lancio verso nuove avventure, verso il mondo del lavoro. Con questo ultimo capitolo volevo ringraziare coloro che hanno permesso di poter realizzare questo lavoro, a partire dalla mia responsabile la Prof.ssa Cecilia Gelfi, titolare dei fondi (GRANT: FIRB RBR No 7BMCT to CG) per i quali è stato possibile realizzare questo studio. La ringrazio inoltre per avermi guidato in questo percorso e per avermi dato la possibilità di poter lavorare a questo progetto molto stimolante e con autonomia.

Ringrazio la scuola di dottorato di Medicina Molecolare.

Ringrazio i colleghi, per il sostegno morale e i preziosi consigli sia tecnici che progettuali, Agnese Viganò, Daniele Capitanio, Manuela Moriggi, Sara De Palma, Enrica Torretta e Laura Barbalini. Ringrazio in particolare Chiara Fania e Michele Vasso per gli esperimenti di spettrometria di massa.

Ringrazio mio padre, Antonio Leone, per aver sviluppato il software per la gestione del database degli esperimenti di proteomica che ho utilizzato per questo lavoro.

Ringrazio tutta la mia famiglia che non smette mai di credere in me e di sostenermi sempre, in particolare a mamma, papà mia sorella Lety, i miei zii Bruno, Emiliana, Toni, Enza e i miei cugini Gabri, Gianfri e Arianna.

Ringrazio Maria Flora per i consigli utili per affrontare la scrittura della tesi e per il dono della "griglia" che è stata fondamentale per l'organizzazione del lavoro, e gli amici della scuola "CRS", in particolare Paola e Ale.

Ringrazio le mie amiche, Sabry, Stefy, Giò, Hanqiao che mi hanno sempre dato forza e sostenuto nei momenti belli e anche in quelli difficili.

Ringrazio con gioia le mie amiche ed ex compagne dell'università Marta, Eni, Cri, Giuly, Miky e Silvia, per la nostra splendida amicizia.

Ringrazio Michael per la pazienza e l'amore che mi ha regala ogni giorno e per il nostro sogno che si sta per realizzare.

Ringrazio i miei nonni, nonna Rina e nonno Gianni, che mi sono sempre stati vicini...

"L'unico vero viaggio verso la scoperta non consiste nella ricerca di nuovi paesaggi, ma nell'aver nuovi occhi" Marcel Proust