



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE E
MEDICINA MOLECOLARE

XXI CICLO

Stress ossidativo ed anomalie citoscheletriche nell'Atassia di
Friedreich

Laura Maria Gaeta

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Dottorssa Fiorella Piemonte

Coordinatore: Prof. Giorgio Federici

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag. 4
1. L'atassia di Friedreich.....	pag. 5
2. Il glutatione.....	pag. 16
2.1 Sintesi del glutatione.....	pag. 20
2.2 Metabolismo del glutatione.....	pag. 21
3. Il glutatione nel cervello.....	pag. 22
3.1 Interazione tra i vari tipi cellulari.....	pag. 24
4. Glutatione, stress ossidativo e nurodegenerazione.....	pag. 26
5. Glutathionilazione delle proteine.....	pag. 28
SCOPO DELLA RICERCA.....	pag. 33
PARTE SPERIMENTALE.....	pag. 35
Campioni unmani.....	pag. 35
Analisi di genatica molecolare.....	pag. 36
Immunoistochimica.....	pag. 37
Comarcatura in immunofluorescenza per il GSH e l'actina, la vimentina, la β -tubulina ed i neurofilamenti.....	pag. 40
Western Blotting.....	pag. 41

Trattamento con il GSSG.....	pag. 43
Dosaggio delle proteine.....	pag. 43
Immunoprecipitazione.....	pag. 44
RISULTATI	pag. 46
DISCUSSIONE	pag. 65
BIBLIOGRAFIA	pag. 86

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è stato dimostrato con sempre maggiore evidenza che nella patogenesi di svariate malattie di tipo neurodegenerativo, tra le quali il morbo di Parkinson (PD), l'atassia di Friedreich (AF), il morbo di Alzheimer (AD) e la sclerosi laterale amiotrofica (ALS), possono essere coinvolte la produzione di specie ossigeno reattive (ROS) ed una disfunzione a livello mitocondriale.

In alcune, come nel caso del morbo di Parkinson, sembra che il coinvolgimento mitocondriale abbia un ruolo diretto nella patogenesi della malattia stessa. In altri casi, come avviene per l'atassia di Friedreich, il deficit mitocondriale potrebbe essere secondario ad una mutazione non a livello dei geni della catena respiratoria, ma bensì responsabile di un accumulo di radicali liberi, a loro volta causa di danno respiratorio (Schapira, 1999).

Le cellule del cervello umano consumano il 20% dell'ossigeno utilizzato dal corpo, pur costituendo solo il 2% del peso corporeo. Di conseguenza la quantità di specie ossigeno reattive che vengono generate da queste cellule nel corso del metabolismo ossidativo è estremamente elevata. Per questo motivo sempre più evidenze convergono a favore di un coinvolgimento dello stress ossidativo e della

disfunzione mitocondriale nel processo di morte neuronale, fenomeno tipico delle malattie neurodegenerative (Dringen, 2000).

Vista la sensibilità delle cellule nervose al danno ossidativo e poiché il sistema nervoso centrale è uno dei tessuti maggiormente colpiti nell'atassia di Friedreich, la patologia di nostro interesse, la nostra attenzione si è focalizzata sulla ricerca di un'eventuale legame tra lo stress ossidativo e la patogenesi della neurodegenerazione nel Friedreich.

1. L'Atassia di Friedreich

L'atassia di Friedreich (FRDA), una patologia neurodegenerativa progressiva a carattere autosomico recessivo, rappresenta la più comune forma di atassia ereditaria, con un'incidenza stimata di 1:30000. E' caratterizzata da progressiva atassia, disartria, areflessia, alterazioni sensoriali e debolezza muscolare a livello degli arti inferiori; le principali lesioni di tipo neurodegenerativo sono a carico del midollo spinale ed includono perdita di neuroni a livello delle radici dorsali dei gangli e delle colonne di Clarke, associate alla degenerazione dei loro tratti lunghi così come dei tratti piramidali (Puccio and Koenig, 2000; Oppenheimer and Esiri M, 1992).

Tra i segni non-neurologici, rilevanti sono la presenza di una cardiomiopatia ipertrofica, spesso causa di morte nei pazienti, ed un aumento dell'incidenza del diabete mellito. La comparsa dei sintomi solitamente avviene entro il venticinquesimo anno di età, soprattutto nel periodo della pubertà (Puccio and Koenig, 2000).

I processi patologici colpiscono soprattutto il sistema nervoso centrale e periferico e risultano in un'assonopatia di tipo "dying back" a carico degli assoni sensoriali dei gangli della radice dorsale e dei tratti spinocerebellare e piramidale del midollo, con conseguente perdita dei corpi cellulari. Non è un caso che l'atassia di Friedreich colpisca soprattutto i neuroni e le cellule cardiache, infatti questi tipi cellulari sono strettamente dipendenti dalla fosforilazione ossidativa per la loro funzionalità e quindi risultano particolarmente sensibili alle alterazioni a carico della catena respiratoria (Shapira, 1998).

Il gene responsabile della patologia nell'uomo è il gene FRDA (X25); è localizzato sul cromosoma 9q13 ed è formato da 7 esoni estesi per 80 kb di DNA genomico. Il trascritto più lungo misura 1.3 Kb ed è formato da 5 esoni (esoni 1-5a). Questo trascritto codifica per una proteina costituita da 210 aminoacidi chiamata fratassina. Esiste un trascritto alternativo, sia pure presente in quantità minore, che contiene l'esone 5b al posto del 5a, seguito dall'esone 6 non

codificante; il significato funzionale del trascritto alternativo è ancora poco chiaro (Puccio and Koenig, 2000).

Il gene *FRDA* presenta una specificità di espressione tessuto e sviluppo dipendente, che correla, almeno in parte, con i principali siti di espressione della malattia. Infatti, esso non si esprime solo in tessuto neuronale, ma anche nel cuore e nel pancreas, rendendo parzialmente ragione dell'aumentata incidenza di diabete e cardiomiopia ipertrofica nei pazienti *FRDA* (Campuzano et al., 1996). Tuttavia, la sua espressione è stata riscontrata anche in tessuti apparentemente indenni dalla malattia, come fegato, muscolo, timo e grasso bruno. Tutti i tessuti nei quali l'espressione del gene della fratassina è elevata sono accomunati dalla ricchezza di mitocondri (Koutnikova et al., 1997).

La principale causa di atassia di Friedreich è la grande espansione della tripletta *GAA* all'interno del primo introne del gene che codifica per la fratassina. Il 96% dei pazienti risultano omozigoti per l'espansione della tripletta *GAA*, mentre il restante 4% sono eterozigoti composti per l'espansione *GAA* ed una mutazione puntiforme nella regione codificante del gene. Le mutazioni per troncamento e le mutazioni missenso sono presenti in eguale percentuale, sebbene le missenso siano state riscontrate soltanto

nella seconda metà della proteina, suggerendone l'importanza come dominio funzionale (Campuzano et al., 1996).

L'analogo fenotipo clinico provocato dall'espansione della tripletta *GAA* e dalle mutazioni che provocano il troncamento della proteina suggerisce che l'espansione agisca provocando una perdita di funzione della fratassina. Infatti il livello dei messaggeri per la proteina risulta nettamente più basso rispetto ai controlli ed è stato dimostrato che l'espansione *GAA* interferisce con la trascrizione in un modo orientamento e lunghezza dipendente (Bidichandani et al., 1998).

La scoperta di una nuova struttura del DNA, lo "sticky DNA", formato dall'associazione di due strutture a tripla elica purina-purina-pirimidina (R-R-Y) a causa del superavvolgimento negativo, spiegherebbe attraverso quale meccanismo l'espansione impedisce l'espressione del gene (Sakamoto et al., 1999).

Il legame tra l'espansione della tripletta *GAA* e la patogenesi della malattia è dimostrato in modo molto significativo dalla correlazione inversa tra la dimensione della più piccola delle due espansioni e l'età di insorgenza, la gravità dei sintomi ed il rischio di insorgenza di disturbi aggiuntivi come la cardiomiopatia, la scoliosi ed il diabete (Puccio and Koenig, 2000).

La fratassina non presenta domini omologhi a nessuna delle proteine di funzione nota, perciò non se ne può intuire la funzione dalla sequenza aminoacidica. Tuttavia, essa presenta uno stretch di 27 aminoacidi codificato dagli esoni 4 e 5a estremamente conservato tra gli eucarioti. In base ad omologie di sequenza è probabile che il gene della fratassina derivi dal precursore batterico del genoma mitocondriale, che condivide un antenato filogenetico con i batteri Gram-negativi, e si sia successivamente trasferito nel genoma nucleare (Puccio and Koenig, 2000).

Gli studi di microscopia elettronica condotti usando anticorpi monoclonali hanno rivelato la localizzazione mitocondriale della fratassina endogena che, pur non possedendo un frammento transmembrana idrofobico, risulta associata con membrane e creste mitocondriali (Campuzano et al., 1997).

In lievito *Saccharomyces Cerevisiae* la delezione del gene omologo della fratassina YFH1 (Yeast Frataxin Homologue 1) provoca una riduzione della crescita in terreno contenente glicerolo ed etanolo, indicando che la proteina in questione è coinvolta nella fosforilazione ossidativa (Campuzano et al., 1997). Inoltre, i lieviti mutanti risultano più sensibili agli agenti ossidanti come il perossido di idrogeno ed il ferro e presentano una quantità di ferro mitocondriale 10 volte

superiore a quella riscontrabile nei lieviti wild type. Se la funzione della frataxina umana fosse simile a quella di lievito, questo suggerirebbe che il ferro si accumula nei mitocondri dei pazienti FRDA e questo fenomeno provoca l'ipersensibilità allo stress ossidativo a causa della reazione di Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \Rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$). Infatti, dopo autopsia, sono stati rilevati alcuni depositi di ferro a livello di alcune miofibrille del cuore, a livello del fegato e della milza di pazienti FRDA (Bradley et al., 2000).

E' stato riportato da alcuni autori un aumento del livello di lattato nel sangue dei pazienti, dato che supporta l'ipotesi di un interessamento del sistema della fosforilazione ossidativa in questa patologia (Schapira, 1999). Sono state riscontrate anche deficienze selettive dell'attività dei complessi della catena respiratoria I, II e III e dell'aconitasi mitocondriale e citosolica in biopsie di cuore di due pazienti Friedreich, mentre le attività degli altri complessi della catena respiratoria e del ciclo di Krebs risultavano normali. Nessun deficit delle attività enzimatiche è stato riscontrato in muscolo, fibroblasti o linfociti degli stessi pazienti. Tutti gli enzimi e i complessi deficitari contengono clusters ferro-zolfo (Fe-S) nei loro siti attivi e sono proprio le proteine ferro-zolfo ad essere particolarmente sensibili ai radicali liberi; quindi la loro inattivazione

può suggerire la presenza di stress ossidativo nei tessuti Friedreich affetti (Rotig et al., 1997).

Per quanto riguarda il sistema nervoso centrale, non esistono evidenze dirette dell'accumulo di ferro, tuttavia è stata indicata la presenza di prodotti della perossidazione lipidica nel sistema nervoso centrale e nel sangue di pazienti affetti da atassia di Friedreich (Edmond et al., 2000).

Quindi sembra che la funzione della fratassina sia quella di regolare il trasporto del ferro all'interno del mitocondrio, forse intervenendo su un sistema di carrier per lo ione, presente a livello della membrana mitocondriale interna. La riduzione dei livelli di fratassina, causando un'alterazione del metabolismo del ferro, potrebbe provocare un eccesso dello ione all'interno dei mitocondri, con conseguente accumulo di radicali liberi e stress ossidativo.

Il ruolo chiave dello stress ossidativo nella patofisiologia della malattia è stato confermato da studi che hanno dimostrato il ruolo protettivo degli antiossidanti, come idebenone e vitamina E, in modelli animali o modelli in vitro della patologia (Seznec et al., 2004; Jauslin et al., 2007).

In un precedente lavoro (Piemonte et al. 2001) abbiamo studiato il metabolismo del glutathione nel sangue di malati di atassia di

Friedreich, dimostrando che la concentrazione del glutatione libero (GSH free) risulta significativamente ridotta negli eritrociti dei pazienti rispetto ai valori ottenuti nei soggetti sani, mentre il glutatione totale (GSH tot.) non mostra variazioni significative rispetto ai controlli, dato quest'ultimo che ci consente di escludere un difetto a livello della sintesi del glutatione e fa propendere per un'alterazione a livello del suo metabolismo.

Analizzando i campioni di emoglobina di sei pazienti con atassia di Friedreich mediante ESI-MS abbiamo dimostrato che le concentrazioni di GSSHb β sono significativamente più elevate nei pazienti con atassia di Friedreich, rispetto ai controlli, dato che spiega la diminuzione del glutatione libero (Piemonte et al. 2001).

Abbiamo, poi, determinato l'attività catalitica dei principali enzimi antiossidanti: la superossido dismutasi (SOD) e la glutatione perossidasi (GPx), che costituiscono la prima linea difensiva dell'organismo contro il danno da radicali liberi, e la glutatione trasferasi (GST), che rappresenta l'enzima principale nella seconda linea di difesa antiossidante della cellula (Tozzi et al. 2002).

L'attività della SOD appare significativamente aumentata negli eritrociti dei pazienti con atassia di Friedreich, mentre l'attività della GPx è paragonabile ai controlli, con un conseguente aumento del

rapporto SOD/GPx nei pazienti; l'attività specifica della GST π nel sangue dei pazienti mostra un aumento dell'83% rispetto ai controlli (Piemonte et al. 2001).

E' ormai noto che i cambiamenti nei rapporti fisiologici tra gli enzimi che metabolizzano i ROS hanno profondi effetti sulla resistenza cellulare al danno ossidativo. Abbiamo ipotizzato che l'aumento di attività della SOD nei pazienti Friedreich rappresenti un'adattamento delle cellule ad una iperproduzione di anione superossido e lo squilibrio nel rapporto tra la SOD e la GPx contribuisca all'accumulo di H₂O₂ nei tessuti. L'acqua ossigenata in eccesso, in presenza di alte concentrazioni di ioni ferro, reagendo con il metallo secondo la reazione di Fenton, porterebbe ad una iperproduzione del radicale ossidrile ed, inoltre, all'attivazione dell'enzima GST (Piemonte et al. 2001).

In un successivo lavoro (Pastore et al., 2003 a) abbiamo analizzato il metabolismo del glutatione e le proteine glutathionilate nei fibroblasti derivati da biopsie cutanee di pazienti con atassia di Friedreich, allo scopo di valutare l'esistenza di un legame tra la glutathionilazione e la funzionalità delle proteine nella regolazione del segnale cellulare, in caso di stress ossidativo.

Abbiamo dimostrato che nei fibroblasti di pazienti FRDA il rapporto redox tra glutatione ridotto (GSH) e ossidato (GSSG) diminuisce, spostandosi a favore di quest'ultimo, dato che dimostra la presenza di stress ossidativo all'interno delle cellule. Inoltre, nei fibroblasti dei pazienti, al contrario dei controlli, la forma prevalente del GSH risulta essere quella legata alle proteine, sia rispetto al GSH totale che rispetto a quello libero (Pastore et al., 2003 a).

Abbiamo identificato l'actina come proteina maggiormente glutationilata nel FRDA, ad un livello 5 volte superiore a quello dei controlli (Pastore et al., 2003 a).

Per confermare la presenza di un legame diretto tra la glutationilazione dell'actina e lo stress ossidativo, abbiamo trattato i lisati cellulari con sostanze pro- ed anti-ossidanti, mostrando che la glutationilazione dell'actina aumenta in presenza di pro-ossidanti (GSSG, H_2O_2) ed è un processo reversibile, in quanto scompare in seguito a trattamento con agenti riducenti (GSH, DTT) (Pastore et al., 2003 a).

Poiché, come detto in precedenza, nella patogenesi dell'ataxia di Friedreich è coinvolto uno squilibrio nell'omeostasi del ferro, dovuto ad un deficit di fratassina, ci siamo trovati di fronte anche alla necessità di dimostrare un legame tra questo squilibrio e la

glutathionilazione dell'actina. Abbiamo quindi incubato *in vivo* per tempi diversi delle cellule di controllo con FeSO_4 e dimostrato che la quantità di glutathione legato alle proteine incrementa con l'aumentare del tempo di incubazione, come avviene anche per la quantità di actina glutathionata (Pastore et al., 2003 a).

Inoltre, la glutathionilazione dell'actina interferisce sulla sua funzionalità poichè, utilizzando un indicatore dell'actina filamentosa (rodamina-falloidina), abbiamo dimostrato una disorganizzazione dei microfilamenti di F-actina ed una diminuzione della crescita e della vitalità cellulare nei fibroblasti patologici. Il nostro dato concorda pienamente con quanto riportato in letteratura, poichè è noto che la glutathionilazione dell'actina ne regola la polimerizzazione inibendola (Wang et al., 2001). La colorazione con ematossilina-eosina conferma un'alterata morfologia delle cellule patologiche, meno numerose e più slargate rispetto a quelle di controllo (Pastore et al., 2003 a).

Quindi, nei fibroblasti FRDA la glutathionilazione dell'actina è implicata nelle dinamiche dei microfilamenti e provoca un'alterazione delle funzioni del citoscheletro. La rilevanza clinica dei nostri dati è supportata dal fatto che, trattando *in vivo* i fibroblasti patologici con il glutathione ridotto (GSH), si assiste ad un recupero della morfologia, della crescita e della vitalità cellulare, si verifica un calo del

glutathione legato alle proteine rispetto al GSH libero ed un aumento del rapporto GSH/GSSG, con un contemporaneo calo della glutathionilazione dell'actina (Pastore et al., 2003 a).

La domanda alla quale ci proponiamo di rispondere nel corso di questo lavoro è se la glutathionilazione delle proteine intervenga nella patogenesi della neurodegenerazione nell'Atassia di Friedreich. Quindi lo scopo del nostro studio sarà quello di identificare e valutare la funzionalità delle proteine glutathionilate nei tessuti umani maggiormente colpiti dalla patologia, in particolare lavoro la nostra attenzione si focalizzerà sul sistema nervoso centrale.

2. Il glutathione

Negli organismi aerobi esiste un equilibrio stabile tra la produzione di radicali liberi e la loro detossificazione, che avviene tramite appositi sistemi antiossidanti, deputati ad impedire o minimizzare un eventuale danno causato proprio dai radicali liberi.

In caso di stress ossidativo le difese antiossidanti cellulari possono risultare insufficienti per mantenere i livelli dei ROS al di sotto della soglia di tossicità, sia a causa di una eccessiva produzione di ROS stessi, che a causa di un calo delle difese antiossidanti, che a causa di entrambi i fenomeni.

Il glutathione è una molecola ubiquitaria che viene prodotta in tutti gli organi, soprattutto nel fegato, tuttavia all'interno dei singoli organelli cellulari la distribuzione non è omogenea; infatti, circa l'80-85% del glutathione totale è presente nel citosol, dove viene sintetizzato, mentre il restante 10-15% è concentrato all'interno dei mitocondri, dove, tuttavia, la concentrazione raggiunta è paragonabile a quella del citosol (Griffith and Meister, 1985).

Poiché all'interno dei mitocondri non sono presenti gli enzimi per la sintesi del glutathione, la sua concentrazione viene mantenuta costante con un uptake continuo dal citosol, ad opera di trasportatori specifici. Nei mitocondri di fegato di ratto sono stati dimostrati due sistemi di trasporto, uno ad alta affinità stimolato dall'ATP ed uno a bassa affinità stimolato da ATP e ADP. Poiché nei mitocondri non è presente la catalasi, l'unica forma di difesa dal perossido di idrogeno sono proprio il GSH e la glutathione perossidasi (Martensson J. et al., 1990).

Nelle cellule il glutathione totale può essere libero o legato alle proteine (fig. 2).

Figura 2



Il glutathione libero (*GSH free*) è presente principalmente nella sua forma ridotta (*GSH*), che può essere convertita in quella ossidata (*GSSG*) in caso di stress ossidativo e riconvertita nella forma ridotta dall'azione dell'enzima glutathione reduttasi. Lo stato redox dipende dall'ammontare relativo della forma ridotta e ossidata del glutathione (*GSH/GSSG*) ed appare avere un ruolo critico nella cellula. In condizioni normali la coppia redox del glutathione è presente con la forma ridotta *GSH* predominante rispetto all'ossidata. Inoltre, il glutathione può essere legato alle proteine e portare alla formazione di proteine glutathionilate (*GS-Pro*) (Pastore et al., 2003 b).

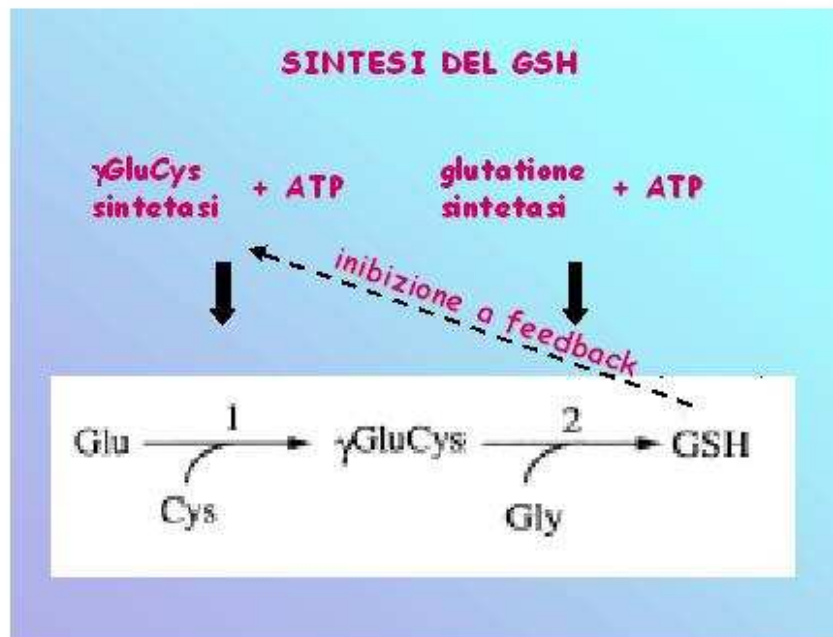
Il ruolo del glutathione è estremamente complesso, infatti esso può agire come antiossidante, sia come scavenger diretto dei radicali liberi, sia come substrato degli enzimi glutathione-dipendenti, cioè la

glutathione reduttasi (GR), la glutathione trasferasi (GST), la glutathione perossidasi (GPx). Inoltre, può comportarsi anche come pro-ossidante, nella sua forma ossidata (GSSG), e come modulatore della funzionalità proteica, tramite il fenomeno di glutathionilazione delle proteine (Dringen, 2000; Pastore et al., 2003 b; Hayes and McLellan, 1999).

2.1 Sintesi del glutathione

La sintesi del GSH è un processo in due tappe (fig. 3), catalizzato da due diversi enzimi. Innanzitutto la γ -glutammina-cisteina sintetasi (γ Glu-Cys sintetasi) sintetizza, consumando una molecola di ATP, la γ -glutammina-cisteina a partire da glutammina e cisteina; nel secondo passaggio la glutathione sintetasi, sempre consumando una molecola di ATP, catalizza l'aggiunta di una molecola di glicina alla γ -glutammina-cisteina, sintetizzando glutathione. Il glutathione stesso esercita un'inibizione a feedback sulla γ -glutammina-cisteina sintetasi (Dringen, 2000).

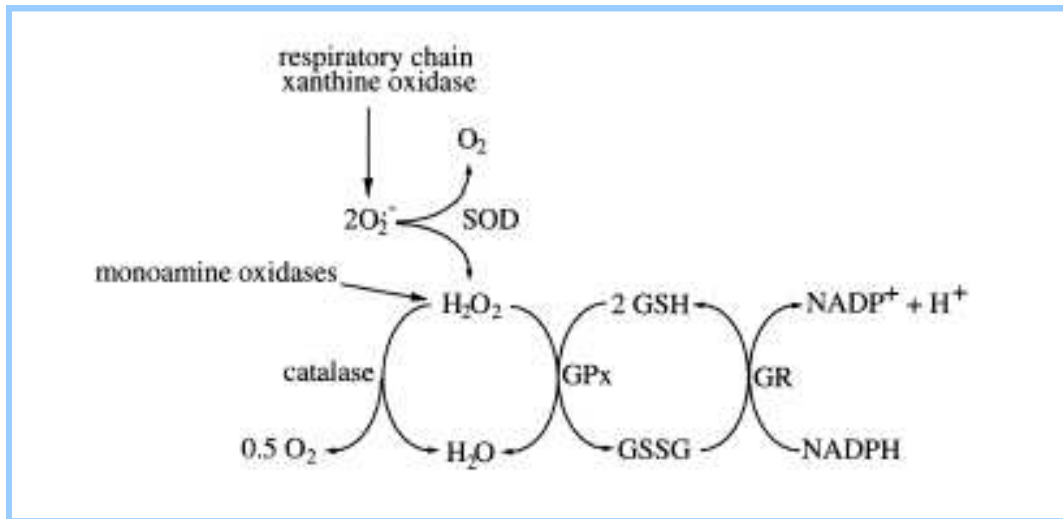
Figura 3



2.2 Metabolismo del glutathione

Il GSH può reagire in modo non enzimatico con i radicali dell'ossigeno (es. idrossile o superossido). Nella reazione catalizzata dalla glutathione per ossidasi (GPx) può neutralizzare i perossidi, formando GSSG, che a sua volta viene nuovamente ridotto a GSH dalla glutathione reduttasi (GR), con il consumo di NADPH (fig.4) (Dringen, 2000).

Figura 4



3. Il glutatione nel cervello

Lo stress ossidativo è una conseguenza dell'alterazione dell'equilibrio tra i processi antiossidanti e la produzione di specie ossigeno-reattive (ROS), a favore di queste ultime.

Il cervello rispetto agli altri organi presenta alcuni svantaggi riguardo la produzione e la detossificazione dei ROS. Infatti, le cellule del cervello usano il 20% dell'ossigeno consumato dal corpo, pur essendo solo il 2% del peso corporeo; in alcune zone del cervello è presente un alto contenuto di ferro, che può contribuire a generare ROS; il cervello è ricco di lipidi con acidi grassi insaturi, target della perossidazione lipidica; nel cervello le attività di superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GPx) e catalasi sono più basse rispetto ad altri tessuti; infine, i neuroni persi non

vengono sostituiti con la generazione di nuovi neuroni, tranne limitati fenomeni di rigenerazione in determinate aree cerebrali (Dringen, 2000).

Il glutatione è presente nelle cellule cerebrali ad una concentrazione di 1-3 mM. E' presente sia nei neuroni che nella glia, con prevalenza negli astrociti rispetto ai neuroni (Cooper, 1997).

E' stato riportato che il glutatione può attraversare la barriera ematoencefalica, ma non è noto se intatto, tramite un trasportatore Na-dipendente (Kannan et al., 1996; Kannan et al., 1999) , o se scisso dalla γ -gluttamil-transpeptidasi nel lume dei capillari cerebrali (Jain et al., 1991; Meister 1991).

La sua sintesi segue la stessa via degli altri tessuti, anche se le attività specifiche degli enzimi sono inferiori. La neosintesi avviene trasportando gli amminoacidi precursori (ad es. glutamina, cisteina) attraverso la barriera emato-encefalica (Dringen, 2000).

I neuroni sono particolarmente vulnerabili all' H_2O_2 , che causa apoptosi nelle cellule in coltura (Whittermore et al., 1995). Il loro sistema di difesa è rappresentato soprattutto dal glutatione (Desagher et al., 1996); la somministrazione di H_2O_2 a cellule neuronali in coltura causa una rapida ossidazione del GSH e uno squilibrio nel rapporto GSH/GSSG (Dringen et al. 1999).

Negli astrociti il contenuto di glutatione è in un range che varia tra

16-50 nmol/mg proteina. Sono le uniche cellule capaci di rilasciare GSH nel mezzo (Dringen, 2000).

Gli oligodendrociti sono molto vulnerabili all' H_2O_2 poiché contengono basse concentrazioni di glutatione ed un'elevata quantità di ferro (Dringen, 2000).

Tra i vari tipi di cellule gliali la microglia è la più ricca di GSH (Chatterjee et al., 1999) e presenta l'attività della GR più alta (Gutterer et al., 1999). Il fenomeno non è casuale, poiché queste cellule, quando attivate, sono in grado di rilasciare radicali superossido e nitrossido ed hanno quindi bisogno del sistema del glutatione per difendersi dai ROS (Dringen, 2000).

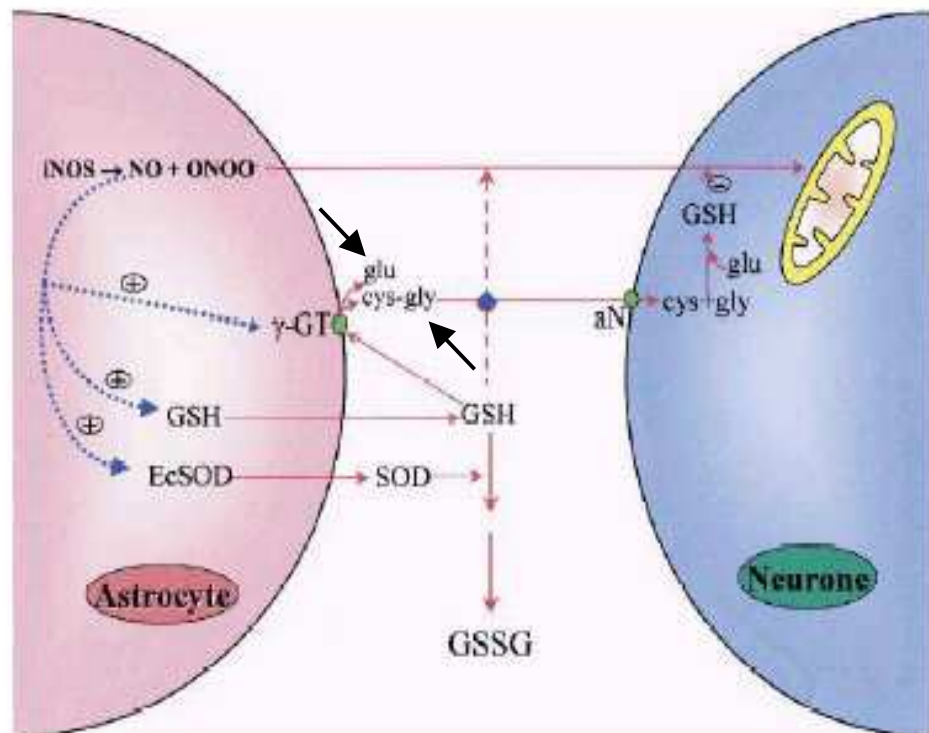
3.1 Interazioni tra i vari tipi cellulari

Lo scambio metabolico più attivo avviene tra astrociti e neuroni. Gli astrociti hanno un ruolo prominente nella difesa del cervello dai ROS, poiché nel complesso contengono il livello di antiossidanti più elevati rispetto alle altre cellule neuronali; non a caso i neuroni sono più vulnerabili rispetto ad essi agli insulti ad es. dell' H_2O_2 , in colture isolate (Dringen, 2000). Se, al contrario, si analizzano le co-culture neuroni-astrociti, questi ultimi svolgono un ruolo protettivo rimuovendo i perossidi e salvaguardando i neuroni (Desagher et al., 1996).

Gli astrociti sono responsabili nei confronti dei neuroni della

disponibilità di cisteina, il fattore limitante nella sintesi di glutathione, poiché sono essi che rilasciano GSH, trasformato poi in cisteinil-glicina (CysGly) e glutammina (Glu) dall'ectoenzima astrogliale γ -glutamminil-transpeptidasi (γ GT). L'amino-neuropeptidasi, ectoenzima di membrana neuronale, scinde poi la cisteinil-glicina in cisteina e glicina, che utilizza assieme alla glutammina per la resintesi del glutathione (Dringen, 2000) (fig. 5).

Figura 5



4. Glutathione, stress ossidativo e neurodegenerazione

Nel cervello la fonte principale di ROS sono i mitocondri, la nitrossido sintetasi, la monoamino ossidasi e gli enzimi P450; inoltre l'elevato livello metabolico dei neuroni implica un'elevata produzione basale di ROS. E' per questo motivo che le cellule cerebrali sane possiedono elevate concentrazioni di difese antiossidanti, sia enzimatiche, come la superossido dismutasi rame-zinco o manganese, la glutathione perossidasi e la catalasi, che non enzimatiche, come glutathione, acido ascorbico, vitamina E. Come detto in precedenza, si parla di stress ossidativo quando le difese antiossidanti cellulari sono insufficienti per mantenere i livelli dei ROS al di sotto della soglia di tossicità, sia a causa di una eccessiva produzione di ROS stessi, che a causa di un calo delle difese antiossidanti, o a causa di entrambi i fenomeni (Schulz et al., 2000).

E' stato suggerito che la perdita del glutathione ed il conseguente danno ossidativo siano degli eventi precoci di segnale nella morte cellulare per apoptosi (Kane et al., 1993; Sato et al., 1995).

Studi su cellule in coltura (Li et al., 1997) hanno fornito una forte evidenza che la perdita di glutathione è responsabile della morte cellulare. Utilizzando dei neuroni corticali immaturi e delle linee cellulari neuronali è stato dimostrato che un calo del livello di glutathione provoca l'attivazione della lipossigenasi 12 neuronale, responsabile a sua volta della produzione di

perossidi, dell'afflusso di Ca^{++} all'interno delle cellule ed infine della morte cellulare. Seguendo la stessa linea di ricerca, utilizzando neuroni dei granuli del cervelletto e cellule PC12 è stato dimostrato che la deplezione diretta del glutathione mitocondriale e citoplasmatico provoca un'aumentata produzione di ROS, una perdita del potenziale mitocondriale transmembrana ed una rapida perdita della funzione mitocondriale. Tuttavia, le cellule che vanno incontro a morte non mostrano i segni tipici dell'apoptosi, indicando che la perdita di glutathione di per sé non provoca necessariamente apoptosi (Wüllner et al., 1999; Seyfried et al., 1999).

Squilibri nell'omeostasi del glutathione sono stati chiamati in causa in diverse patologie neurodegenerative, tra le quali il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) (Schulz et al., 2000).

Lo squilibrio nell'omeostasi del glutathione è stato riscontrato nei neuroni dopaminergici della sostanza nera parte compatta dei malati di Parkinson. I malati presentano stress ossidativo nella zona interessata dalla patologia poiché in essa il contenuto di GSH risulta ridotto del 40-50% rispetto ai controlli, il rapporto GSSG/GSH è molto più elevato, l'attività della γ GT è aumentata selettivamente, la perossidazione lipidica è aumentata come anche il contenuto di ferro, l'attività del complesso I della catena respiratoria è deficitaria (Schulz et al., 2000; Dringen, 2000).

Una forte evidenza dell'implicazione dello stress ossidativo nel morbo di Alzheimer viene dal fatto che il trattamento con antiossidanti (VIT E) ritarda la progressione della patologia nelle forme meno gravi, la perossidazione lipidica è aumentata rispetto ai controlli, l'attività di GPx e GR è più elevata in alcune zone del cervello, mentre l'attività della GST è inferiore (Schulz et al., 2000).

Anche nella sclerosi laterale amiotrofica (ALS) lo stress ossidativo gioca un ruolo determinante nella patogenesi. Infatti un marker della formazione dei perossinitriti è aumentato rispetto ai controlli, marcatori di danno ossidativo a livello di DNA e proteine sono anch'essi aumentati e sono presenti probabili squilibri nell'omeostasi del GSH (Schulz et al., 2000).

5. Glutationilazione delle proteine

Recenti evidenze suggeriscono un ruolo del glutatione nella regolazione della funzionalità proteica attraverso il fenomeno della glutationilazione, che avviene quando si forma un legame covalente e reversibile tra i gruppi tiolici delle proteine ed il glutatione stesso, con formazione di proteine glutationilate (GSS-Pr). Questo evento provoca una modificazione conformazionale delle proteine capace di modularne l'attività (Klatt et Lamas, 2000).

La glutationilazione delle proteine sta assumendo sempre maggior rilievo negli ultimi anni, non solo poichè rappresenta un nuovo meccanismo di modificazione conformazionale delle proteine ma anche perchè sembra avere un ruolo fondamentale in alcuni processi patofisiologici (Cotgreave, 1998; Klatt et Lamas, 2000; Fratelli et al., 2002).

Diverse proteine possiedono residui di cisteina accessibili e, quindi, potenzialmente sensibili alla modulazione redox della loro funzionalità, in relazione ai cambiamenti delle condizioni intra- ed extracellulari. La maggior parte sono enzimi coinvolti nel metabolismo energetico, altre fanno parte delle proteine del citoscheletro ed alcune intervengono nei processi di trascrizione e traduzione (Klatt et al., 1999; Pineda-Molina et al., 2001).

Numerose proteine glutationate sono state identificate anche in condizioni basali e questo, accanto alla regolazione redox, permette di ipotizzare un coinvolgimento della glutationilazione nel "signalling" fisiologico (Fratelli et al., 2002; Lind et al., 2002; Pastore et al., 2003 b).

E' stato attribuito alla S-glutationilazione un ruolo nella stabilizzazione delle proteine extracellulari, un ruolo protettivo nei confronti delle proteine contro l'ossidazione dei residui critici di cisteine ed un ruolo di regolazione dell'attività enzimatica e della trascrizione (Pastore et al., 2003 b).

Il numero crescente di proteine che sono risultate essere glutationilate, sia *in vitro* che *in vivo*, supporta il ruolo della glutationilazione

come evento molecolare chiave nel processo di regolazione redox della funzione proteica nella trasduzione del segnale (Giustarini et al., 2004, Cotgreave and Gerdes, 1998).

Uno dei principali gruppi di proteine che vengono glutationate sono enzimi implicati in diverse vie del metabolismo energetico e dei carboidrati, mentre altre appartengono alla famiglia delle proteine citoscheletriche. Alcune di queste proteine hanno funzioni diverse ma importanti, come la nucleofosmina, una chaperonina implicata nell'assemblaggio delle proteine ribosomiali, la ciclofillina, una chaperonina implicata nella degradazione delle proteine a livello dei ribosomi, e le heat shock proteins HSP60 e HSP70 (Cotgreave and Gerdes, 1998).

Alcune di queste proteine sono soggette a glutationilazione in caso di stress ossidativo e nitrosativo (Klatt and Lamas, 2000). La gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi è la principale proteina soggetta a S-glutationilazione nelle cellule endoteliali sottoposte a trattamento con perossido di idrogeno e nei monociti nel corso dell'esplosione respiratoria endogena (Klatt and Lamas, 2000).

La creatin-chinasi e la glicogeno fosforilasi b sono anch'esse target della glutationilazione nei miociti e nel tessuto cardiaco durante lo stress ossidativo. Anche l'anidrasi carbonica III, la glutatione S-trasferasi, la superossido dismutasi e l'emoglobina vanno incontro a tiolazione nei modelli

cellulari di stress ossidativo. Altre proteine tra le quali la sintetasi degli acidi grassi, l'idrossimetilglutaril CoA reduttasi, l'aldoso reduttasi, L'HIV-1 proteasi e la piccola heat shock protein HSP 25 sono riportate essere possibili bersagli *in vitro* di una glutationilazione redox dipendente (Klatt and Lamas, 2000).

Anche la DNA binding protein c-Jun sembra essere regolata dalla glutationilazione con un meccanismo redox-dipendente (Klatt et al., 1999)

E' probabile che la glutationilazione mitocondriale, dovuta allo stress ossidativo, sia alla base dell'inibizione dell'attività di alcuni enzimi, tra i quali la succinato e l'isocitrato deidrogenasi. Nel Parkinson l'acqua ossigenata derivata dall'attività della monoaminoossidasi inibisce la respirazione mitocondriale glutationando gli enzimi della catena respiratoria (Sofic et al., 1992).

Inoltre, è stato dimostrato che l'anione superossido può glutationare direttamente le proteine grazie ad uno studio che mostra che la S-glutationilazione delle proteine tiroxina fosfatasi (PTPs) modula lo stato fosforilativo nelle cellule e preserva la funzione proteica (Barrett et al., 1999).

Alcune delle proteine che sono soggette alla glutationilazione appartengono alla classe delle proteine del citoscheletro. In particolare, la glutationilazione dell'actina è stata osservata in diversi tipi cellulari in

diverse condizioni di stress ossidativo, ad esempio nelle cellule della mucosa gastrica trattate con acqua ossigenata o diamide, nei macrofagi murini e nei neutrofili umani stimolati con PMA (phorbol myristate acetate) (Chai et al., 1994; Rokutan et al., 1994). Il trattamento con acqua ossigenata è anche responsabile della glutationilazione dell'actina nelle cellule A431 di carcinoma epidermico umano, nelle quali regola la polimerizzazione dell'actina stessa (Wang et al., 2001).

La reversibilità del fenomeno di S-glutathionilazione alla quale va incontro l'actina è stata associata ad un'alterazione dell'organizzazione del citoscheletro delle cellule in risposta allo stress ossidativo. Oltre all'actina è stato dimostrato che nei linfociti T umani sottoposti a stress ossidativo vengono glutathionate anche altre proteine del citoscheletro, tra le quali vimentina, miosina, tropomiosina, cofilina e profilina (Fratelli et al., 2002; Ghezzi et al., 2002).

SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni è stato dimostrato con sempre maggiore evidenza che nella patogenesi di svariate malattie di tipo neurodegenerativo, tra le quali il morbo di Parkinson (PD), l'atassia di Friedreich (AF), l'Alzheimer (AD) e la sclerosi laterale amiotrofica (ALS), possono essere coinvolte la produzione di specie ossigeno reattive (ROS) ed una disfunzione a livello mitocondriale (Schapira, 1999).

Le cellule del cervello umano consumano il 20% dell'ossigeno utilizzato dal corpo, pur costituendo solo il 2% del peso corporeo. Di conseguenza la quantità di specie ossigeno reattive che vengono generate da queste cellule nel corso del metabolismo ossidativo è estremamente elevata. Per questo motivo, sempre più evidenze convergono a favore di un coinvolgimento dello stress ossidativo e della disfunzione mitocondriale nel processo di morte neuronale, fenomeno tipico delle malattie neurodegenerative (Dringen, 2000).

Vista la sensibilità delle cellule nervose al danno ossidativo e poiché il sistema nervoso centrale è uno dei tessuti maggiormente colpiti nell'atassia di Friedreich, la nostra attenzione si è focalizzata sulla ricerca di un'eventuale legame tra lo stress ossidativo e la

patogenesi della neurodegenerazione nel Friedreich. Infatti, la precisa sequenza degli eventi patogenetici che portano alla neurodegenerazione nell'atassia di Friedreich non è ancora stata chiarita. Recenti evidenze suggeriscono che la perdita di fratassina alteri l'omeostasi del ferro intramitochondriale e le funzioni della catena respiratoria, con conseguente aumento della generazione di radicali liberi. Tuttavia, il grado e l'entità dello stress ossidativo, così come il calo della fosforilazione ossidativa mitocondriale a livello del sistema nervoso centrale non sono stati pienamente chiariti.

In particolare, la domanda alla quale ci proponiamo di rispondere è se la glutathionilazione delle proteine intervenga nella patogenesi della neurodegenerazione nell'atassia di Friedreich. La nostra attenzione si è concentrata a livello del midollo spinale dei pazienti, tessuto che normalmente esprime alti livelli di fratassina e che risulta il più affetto neuropatologicamente dalla degenerazione neuronale e dall'assonopatia di tipo "dying-back".

Lo scopo del nostro studio sarà quindi quello di identificare e valutare la funzionalità delle proteine glutathionilate nel sistema nervoso centrale dei pazienti.

PARTE SPERIMENTALE

Campioni umani

I tessuti sono stati ottenuti da autopsie effettuate da 2 a 10 ore post-mortem, da quattro pazienti con atassia di Friedreich.

Il paziente 1 era un uomo deceduto all'età di 47 anni, il paziente 2 era una donna deceduta all'età di 30, il paziente 3 era un uomo deceduto all'età di 24 anni, il paziente 4 era una donna deceduta all'età di 33. Tutti i pazienti rientravano nei criteri diagnostici di Harding per una tipica atassia di Friedreich (Harding, 1981).

La diagnosi è stata geneticamente confermata misurando l'espansione anomala *GAA* nel gene della fratassina. Come controlli abbiamo usato campioni comparabili provenienti da 10 individui di età corrispondente, senza storia di malattie neurologiche e privi di lesioni neuropatologiche all'esame post-mortem. Nessuno dei pazienti usati come controlli ha sofferto di gravi alterazioni respiratorie od altre patologie (come prolungata ipossia, malattie infettive o danno tossico, etc.), che avrebbero potuto provocare stress ossidativo a livello del tessuto in esame.

Il consenso ad utilizzare materiale umano per la ricerca è stato ottenuto dal Comitato Etico Istituzionale.

I campioni utilizzati per gli studi di immunostochimica sono stati fissati in formalina neutra al 10% a temperatura ambiente (RT) per diverse settimane, tagliati ed inclusi in paraffina.

Gli studi di immunostochimica sono stati effettuati su sezioni trasverse di frammenti di midollo cervicale alto e basso e di midollo lombare basso.

Analisi di genetica molecolare

Le espansioni di triplette ripetute *GAA* sono state stimate attraverso una metodologia basata sulla reazione a catena della polimerasi classica (PCR) come descritto in Filla et al., 1996. Brevemente, utilizzando dei primers di oligonucleotidi *GAA-104F*: (5'-3')-GGCTTAAACTTCCCACACGTGTT e *GAA-629R*: (5'-3') AGGACCATCATGGCCCACTT abbiamo amplificato tramite PCR il DNA genomico usando il sistema di PCR Long Template della Boehringer-Mannheim. Le condizioni di PCR erano 94°C per 2 min, 17 cicli a 94°C per 10 s, 68°C per 2 min 30 s seguiti da 20 cicli di 94°C per 10 s, 68°C per 2 min 30 s, con l'aggiunta di 20 s al tempo di estensione per ciclo, ed un'estensione finale a 68° per 10 min. In questo modo si ottiene un prodotto di PCR di (500+3n) paia di basi, dove n è il numero di ripetizioni *GAA*. La dimensione del prodotto di PCR è stata valutata

usando degli standard di dimensioni idonee su un gel di agarosio 0.8% marcato con bromuro di etidio. Le espansioni di triplette ripetute GAA erano 615/681 per il caso 1, 650 per il 2. Per il caso 3 ed il caso 4 non è stato possibile valutare l'espansione delle triplette a causa della scarsità di materiale in nostro possesso.

Immunoistochimica

I campioni di tessuto inclusi in paraffina sono stati tagliati in sezioni spesse 4 μm , depositati su appositi vetrini e messi in stufa almeno 10 minuti a 58°C per far ammorbidire la paraffina. La paraffina è stata rimossa con due passaggi da 15-20 minuti in xilolo. Il campione è stato disidratato lavando per 1-2 minuti prima con EtOH assoluto per due volte, quindi con EtOH 95%, EtOH 70%, dH₂O ed infine con PBS.

Le perossidasi endogene sono state bloccate incubando il tessuto 20 minuti a temperatura ambiente con 90 ml di acqua bidistillata + 10 ml H₂O₂ 30%. Dopo un lavaggio con acqua corrente e PBS i siti aspecifici sono stati saturati per 2 ore a temperatura ambiente con BSA al 5% e Normal Goat Serum (NGS) al 10% in PBS.

I campioni sono stati incubati 1 ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi:

- ab monoclonale (mab) contro il glutatione legato alle proteine (GS-Pro,

diluizione 1:500, incubato 1 h). Il recupero dell'antigene è stato effettuato incubando le sezioni 5 min a 37°C con Proteinasi K (50 µg/ml Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, contenente 2 mM CaCl₂).

- Ab monoclonale (mab) contro la proteina fibrillare acida della glia (GFAP, prediluito, incubato 25 minuti). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in 1 mM EDTA, pH 8 per 40 min a 98° C.
- Ab monoclonale (mab) contro la proteina associata ai microtubuli (MAP2, diluizione 1:100, incubato overnight a 4°C).
- Ab monoclonale (mab) contro la 2',3'- nucleotide ciclico 3'-fospodiesterasi (CNPase, diluizione 1:100 agent + 0,3% Triton X-100, incubato 1 ora). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in 1 mM EDTA, pH 8 per 40 min a 98° C.
- ab monoclonale (mab) contro il C-terminale della β-tubulina umana (tubulina, diluizione 1:1000, incubato 1 h). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in buffer citrato 10 mM, pH 6 per 40 min a 98° C.
- ab monoclonale (mab) contro la catena pesante N-terminale dei neurofilamenti umani (NF-H, diluizione 1:20, incubato 1 h). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in buffer citrato 10 mM, pH 6 per 40 min a 98° C.

- ab monoclonale (mab) contro l'epitopo non fosforilato dei neurofilamenti H (SMI 32, diluizione 1:300, incubato 1 h). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in Tris HCl 50 mM, pH 9, contenente 0.05% Tween 20 per 15 min a 98° C.
- ab monoclonale (mab) contro l'epitopo fosforilato dei neurofilamenti H (SMI 34, diluizione 1:500, incubato 1 h). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in Tris HCl 50 mM, pH 9, contenente 0.05% Tween 20 per 15 min a 98° C.
- ab policlonale (pab) contro la tubulina tirosinata (Tyr-Tub, diluizione 1:500, incubato 1 h). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in 1 mM EDTA, pH 8 per 40 min a 98° C.
- ab policlonale (pab) contro la tubulina de-tirosinata (Glu-Tub, diluizione 1:500, incubato 1 h). Il recupero dell'antigene è stato effettuato bollendo le sezioni in 1 mM EDTA, pH 8 per 40 min a 98° C.

Le sezioni sono state immunomarcate con il complesso avidina-biotina perossidata (ABC); in dettaglio le sezioni sono state lavate con PBS 3 volte per 5 minuti, incubate con il 2° anticorpo biotinilato per 30 minuti, lavate nuovamente con PBS 3 volte per 5' minuti, incubate con streptavidina per ossidasi-coniugata per 30 minuti ed infine lavate con PBS 3 volte per 5 minuti.

I vetrini sono stati rivelati con il cromogeno (1 ml di tampone

contenente H_2O_2 per attivare la DAB+1 goccia di DAB) per 5 minuti e sciacquati con PBS e con dH_2O 1-2 minuti .

La controcolorazione nucleare è stata effettuata con ematossilina di Mayer per 15 secondi. Quindi il tessuto è stato sciacquato prima con H_2O corrente e poi con dH_2O e quindi disidratato per 1-2 minuti con EtOH 70%, EtOH 95%, EtOH assoluto ed infine con xilolo e sigillato con Eukit.

Il controllo negativo è stato effettuato omettendo l'anticorpo primario su alcune sezioni.

La seriatura si è ottenuta effettuando le procedure di immunistoichimica su sezioni rigorosamente consecutive.

Comarcatura in immunofluorescenza per il GSH e l'actina, la vimentina, la β -tubulina ed i neurofilamenti

Le sezioni sono state tagliate al criostato allo spessore di 4 μm , deposte su vetrini a carica positiva e fatte asciugare all'aria per 1 ora. Gli anticorpi primari policlonali anti-actina, anti-vimentina, anti- β -tubulina ed anti-neurofilamenti sono stati diluiti 1:5 in PBS/BSA all'1% e centrifugati per 2 minuti a 10000 rpm. L'incubazione con gli anticorpi primari è stata effettuata overnight a 4°C.

Dopo l'overnight il tessuto è stato sciacquato con PBS/Tween 20 all'1‰ (1 ml di Tween/1 l PBS) 3 volte per 7 minuti, quindi incubato con l'idoneo l'anticorpo secondario coniugato con rodamina (diluito 1:100 in PBS/BSA all'1% e centrifugato per 5 minuti a 1000 rpm) per 1 h a 37°C, infine lavato 3 volte per 7 minuti con PBS/Tween 20 all'1‰.

La seconda marcatura è stata effettuata incubando il tessuto per 1 ora a 37°C con l'anticorpo primario monoclonale anti-GSH diluito 1:10 in PBS/BSA all'1% e centrifugato per 2' a 10000 rpm.

Il tessuto è stato sciacquato con PBS/Tween 20 all'1‰ 3 volte per 7 minuti, quindi incubato con l'anticorpo secondario coniugato con fluoresceina (diluito 1:100 in PBS/BSA all'1% e centrifugato per 5 minuti a 1000 rpm) per 1 ora a 37°C, infine lavato 3 volte per 7 minuti con PBS 1X.

Infine i nuclei sono stati colorati con DAPI diluito 1:1000 per 5 minuti.

Dopo aver lavato 3 volte per 7 minuti con PBS 1X, i vetrini sono stati chiusi con il montante acquoso per la fluorescenza.

Western Blotting

Sul campione da saggiare sono state precedentemente dosate le proteine con il metodo del BCA.

40 μ g di lisato cellulare proveniente da tessuto cerebrale di controllo sono stati addizionati di sample buffer privo di β -mercapto-etanolo e bolliti per 2 minuti, quindi sono stati sottoposti ad un'elettroforesi su un gel al 12% di SDS-poliacrilamide (resolving 12%, stacking 4%) per circa 2 ore a 100 V (voltage costante). Le proteine così separate sono state trasferite overnight a 90 mA costanti su una membrana di nitrocellulosa.

Dopo il trasferimento, la membrana è stata colorata con rosso ponceau per 5 minuti e decolorata più volte con acqua bidistillata, per visualizzare le bande delle proteine. Dopo aver rimosso la colorazione del ponceau con due lavaggi da 10 minuti in TTBS (100 mM Na Cl e 10 mM Tris HCl, pH7.8 contenente 0.1% Tween 20) i siti aspecifici sono stati bloccati incubando la membrana con blocking agent al 5% sciolto in TTBS per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo due lavaggi da 10 minuti con TTBS e due da 10 minuti con TBS (100 mM Na Cl e 10 mM Tris HCl, pH7.8) si è proceduto all'incubazione con anticorpo primario anti Gs-Pro 1:1000 sciolto in TTBS + blocking agent al 3% per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione.

Dopo due lavaggi da 10 minuti con TTBS e due da 10 minuti con TBS la nitrocellulosa è stata incubata con anticorpo secondario sciolto

in TTBS + blocking agent al 2,5 % per 1 ora in agitazione.

La rivelazione è stata effettuata utilizzando la reazione fluorimetrica ECL Immobilon Western (Millipore Corporation) ed impressionando una lastra autoradiografica.

Trattamento con il GSSG

Per quanto riguarda il trattamento con GSSG di lisato cellulare proveniente da tessuto cerebrale di controllo, 40 µg di omogenato sono stati incubati 10 min a 37° C con 1 e 5 mM GSSG e sono stati analizzati in Western Blot, come su riportato.

Per quanto riguarda il trattamento con GSSG di tessuto incluso in paraffina proveniente controlli sani, le sezioni trasverse sono state incubate 15 min a 37° C con GSSG 500 µM e successivamente sottoposte alla procedura di immunistochemica per l'anticorpo anti GS-Pro, come su riportato.

Dosaggio delle proteine.

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato con il metodo BCA, che utilizza una soluzione di acido bicinconinico, il reagente A (1 ml di soluzione contiene acido bicinconinico, carbonato di sodio, sodio tartrato e bicarbonato di sodio in 0.1 N NaOH, pH 11.25) ed una

soluzione si solfato di rame pentaidrato (4%), il reagente B (25 ml di soluzione contengono 4% solfato di rame pentaidrato) da miscelare in proporzione di 50 B : 1 A V/V.

Ad ogni campione sul quale effettuare il dosaggio delle proteine sono stati aggiunti 2 ml della miscela di reattivo così ottenuta ed è stato incubato 30 minuti a 37°C.

La lettura colorimetrica è stata effettuata alla $\lambda=562$ nm in presenza di una curva standard.

Immunoprecipitazione

Sul campione da saggiare sono state dosate le proteine con il metodo del BCA.

500 μ g di lisato cellulare proveniente da tessuto cerebrale di controllo sono stati incubati con 10 μ g di anticorpo anti-actina, anti- β -tubulina e anti- neurofilamenti overnight a 4°C.

Alla soluzione sono quindi stati aggiunti 20 μ l di protein G PLUS Agarose e si proceduto all'incubazione a 4°C per 1 ora su una piattaforma girevole.

I campioni sono stati quindi spinnati a 4°C per 10" ed il pellet così ottenuto lavato con PBS. La procedura è stata ripetuta per altre 3 volte.

Dopo l'ultimo lavaggio i pellets sono stati risospesi nel sample buffer privo di β -mercapto-etanolo per l'elettroforesi, bolliti per 2', centrifugati a 130000 rpm per 2' e caricati su un gel per elettroforesi al 12% di SDS-poliacrilamide per procedere con il western blotting.

Il western blotting è condotto come esemplificato nella specifica sezione; la rivelazione è effettuata con l'anticorpo anti-GS-Pro.

RISULTATI

Cervello, cervelletto e midollo provenienti da dieci controlli sani sono stati processati per l'inclusione in paraffina, tagliati ad uno spessore di 4 μm e sottoposti ad immunistochemica con l'anticorpo anti-glutathione, anticorpo in grado di riconoscere specificatamente la forma del glutathione legato alle proteine (Pr-SSG).

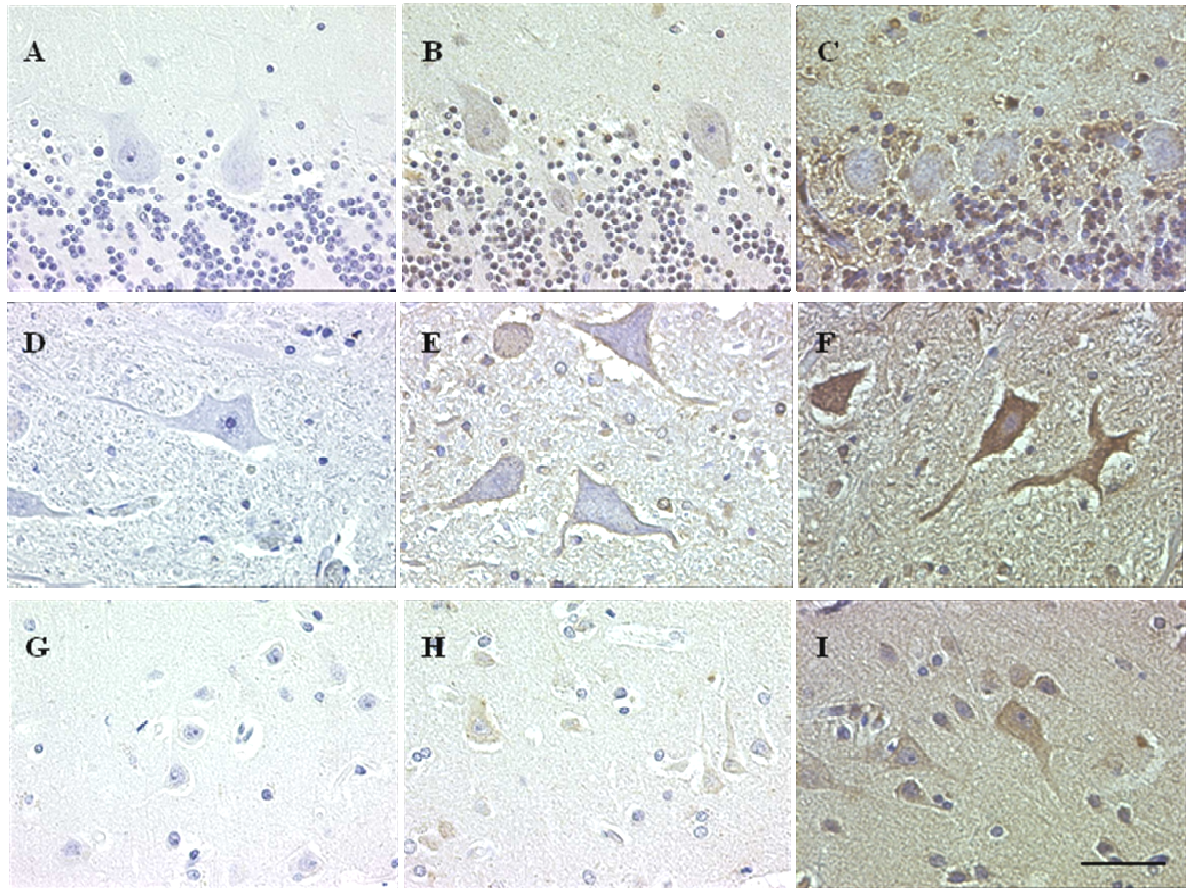
La marcatura da noi ottenuta per le proteine glutathionilate risultava selettiva, poiché, in assenza dell'anticorpo primario, il prodotto di reazione non è visibile in nessuno dei tessuti sottoposto ad immunistochemica (fig. 6 A, D, G).

L'immunomarcatura mostrava una debole immunoreattività a finemente granulare uniformemente distribuita per tutto lo strato molecolare del cervelletto, la sostanza grigia del midollo spinale e tutti gli strati corticali della corteccia frontale (Fig. 6 B, E, H). Un analogo pattern di glutathionilazione costitutiva è stato osservato in tutti i campioni da noi usati come controlli. Il pericarion delle cellule piramidali, delle cellule del Purkinje e dei motoneuroni del midollo spinale mostrava una debole reattività, preferenzialmente situata sotto la membrana plasmatica (Fig. 6 B, E, H; Fig. 7 A, C, E). Nello strato granulare interno del cervelletto, molti glomeruli erano negativi e le cellule dei granuli apparivano come nuclei nudi, mostrando solo

occasionalmente un sottile alone di immunoreattività perinucleare (Fig. 6 B, E, H). Nel citoplasma dei neuroni grandi e di media dimensione a livello dei nuclei mediali e laterali così come nel citoplasma dei neuroni della zona intermediale, del nucleo posteromarginale e della sostanza gelatinosa del midollo spinale era presente una moderata immunoreattività con un pattern granulare (dati non mostrati). Gli oligodendrociti della sostanza bianca solo occasionalmente reagivano (Fig. 7 D) e gli astrociti erano solitamente negativi o debolmente positivi (Fig. 7 F).

Sezioni paraffinate di cervelletto, midollo spinale e corteccia frontale trattate con il proossidante GSSG 500 μ m mostravano un significativo aumento dell'immunoreattività a livello del neuropilo e della sostanza bianca con una forte reattività a livello di neuroni, astrociti e oligodendrociti rispetto ai campioni non trattati (Fig. 6 C, F, I).

Figura 6

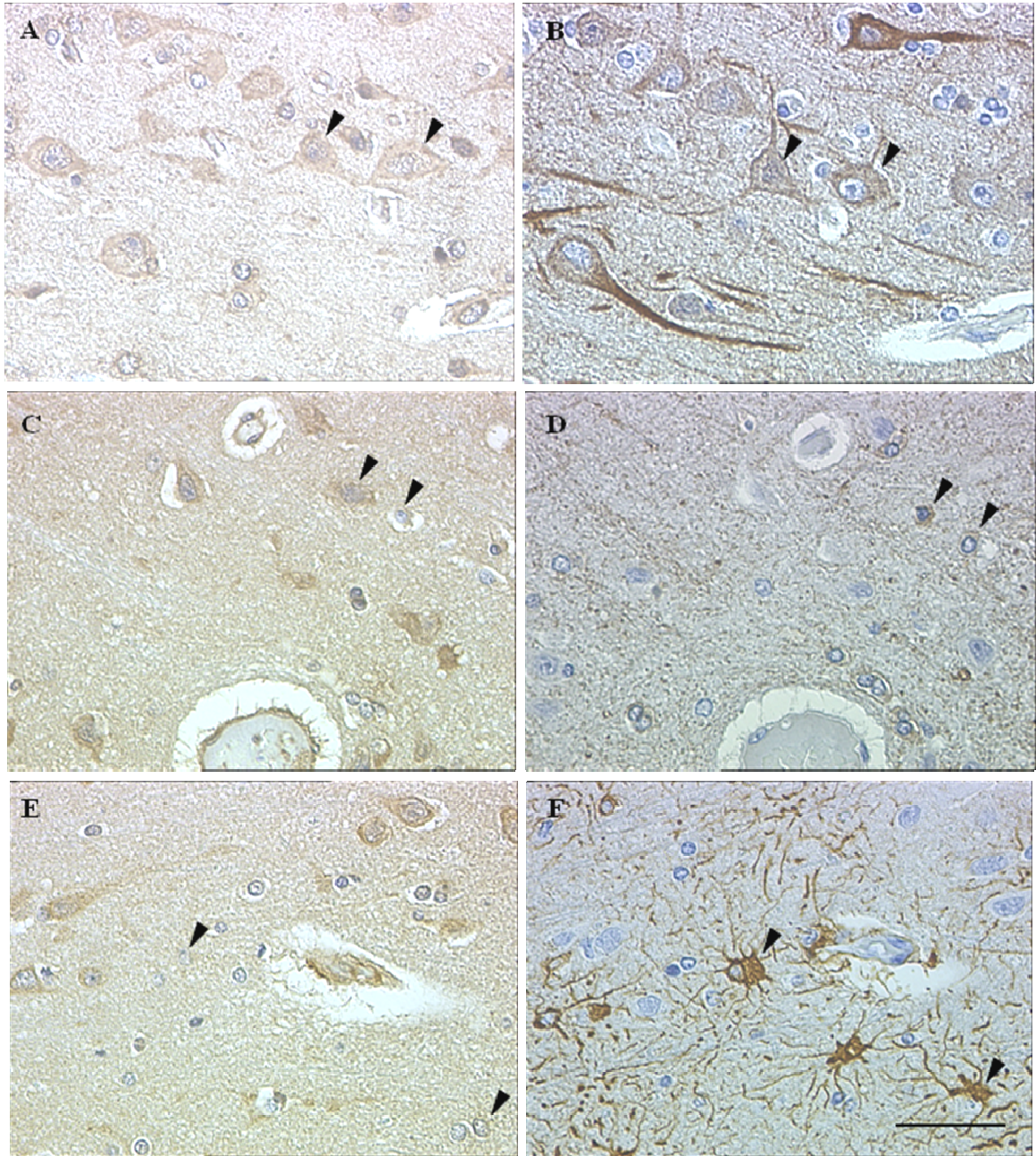


Immunomarcatura per il GS-Pro di sezioni trasverse di cervelletto (B, C), midollo spinale (E, F) e corteccia frontale (H, I) provenienti da controlli sani. Controlli negativi (A, D, G) (barra di ingrandimento = 50 μ m).

L'immunomarcatura effettuata su sezioni seriali di corteccia frontale incubate con l'anticorpo contro il GS-Pro e con anticorpi contro diversi marcatori cellulari come la MAP2 per i neuroni, la CNPasi per gli oligodendrociti e la GFAP per gli astrociti ci hanno consentito di valutare meglio il livello di marcatura dei singoli tipi cellulari, mostrando una chiara reattività dei neuroni (Fig. 7 A, B), una media marcatura degli oligodendrociti (Fig. 7 C, D) ed una debole positività degli astrociti (Fig.

7 E, F).

Figura 7

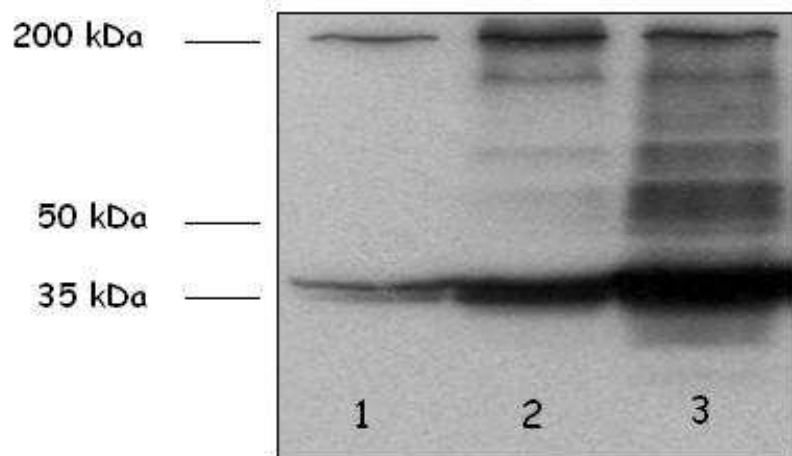


Sezioni seriate di corteccia frontale marcate per l'immunolocalizzazione di GS-Pro (A,C,E), MAP2 (B), CNPasi (D), e GFAP (F). L'immunomarcatura per il GS-Pro appare chiara nei neuroni (A,B, frecce), media negli oligodendrociti (C,D, frecce) e debole negli astrociti (E,F, frecce) (barra di ingrandimento = 50 μ m).

Per valutare quali proteine potessero andare incontro a glutationilazione l'anticorpo monoclonale antiGs-Pro è stato anche utilizzato per indagare lo stato della glutationilazione di un omogenato di cervello umano tramite analisi di western blot (Fig. 8).

Il pattern elettroforetico in condizioni non riducenti ha rivelato una banda prevalente con un peso molecolare apparente di 42 kDa, più altre bande con un peso molecolare apparente di 50 kDa e 200 kDa (Fig. 8, lane 1), che risultano aumentare in intensità proporzionalmente all'aumentare del pro-ossidante GSSG (Fig. 8, lane 2 e 3).

Figura 8



Lane 1: omogenato di controllo rivelato con Ab GS-Pro

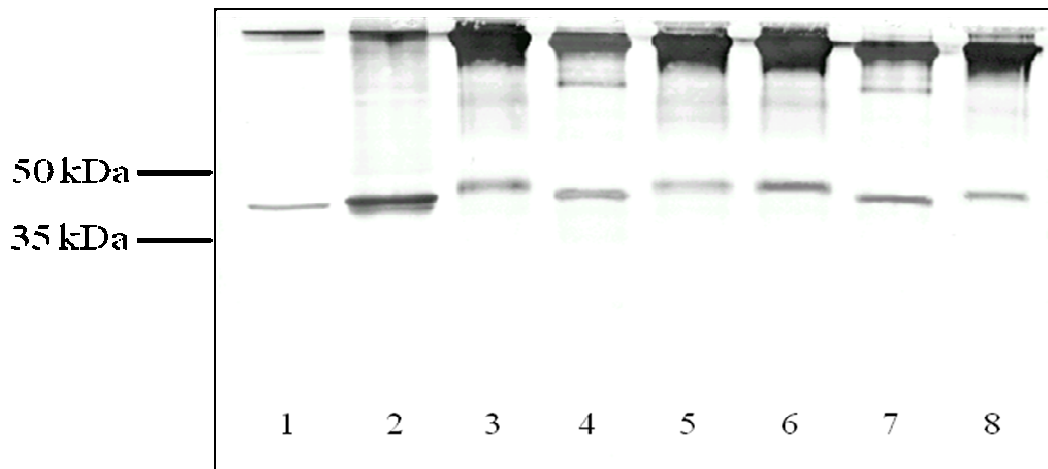
Lane 2: omogenato di controllo trattato con GSSG 1 mM e rivelato con Ab GS-Pro

Lane 3: omogenato di controllo trattato con GSSG 5 mM e rivelato con Ab GS-Pro

Sulla base del peso molecolare rivelato dall'analisi in western blot abbiamo cercato di identificare le proteine costitutivamente glutationate nel SNC umano, testando alcuni anticorpi specifici. Immunoprecipitando omogenati di cervello con anticorpi diretti contro alcune proteine del citoscheletro e rivelandolo con l'anticorpo anti GS-Pro abbiamo identificato l'actina (Fig. 9, lane 3), la β -tubulina (Fig. 9, lane 4) ed i neurofilamenti (NF; Fig. 9, lane 5) come le proteine che vanno prevalentemente incontro alla glutationilazione proteica nel cervello umano.

Dopo trattamento con GSSG l'actina immunoprecipitata (Fig. 9, lane 6), la β -tubulina (Fig. 9, lane 7) ed i NF (Fig. 9, lane 8) mostravano un significativo aumento dell'intensità del segnale dell'anticorpo anti GS-Pro, indicando un aumento della loro glutationilazione in condizioni di stress ossidativo.

Figura 9



Lane 1: omogenato di controllo rivelato con Ab *GS-Pro*

Lane 2: omogenato di controllo trattato con *GSSG* 10 mM e rivelato con Ab *GS-Pro*

Lane 3: omogenato di controllo immunoprecipitato con Ab actina e rivelato con Ab *GS-Pro*

Lane 4: omogenato di controllo immunoprecipitato con Ab β -tubulina e rivelato con Ab *GS-Pro*

Lane 5: omogenato di controllo immunoprecipitato con Ab neurofilamenti e rivelato con Ab *GS-Pro*

Lane 6: omogenato di controllo trattato con *GSSG* 10 mM, immunoprecipitato con Ab actina e rivelato con Ab *GS-Pro*

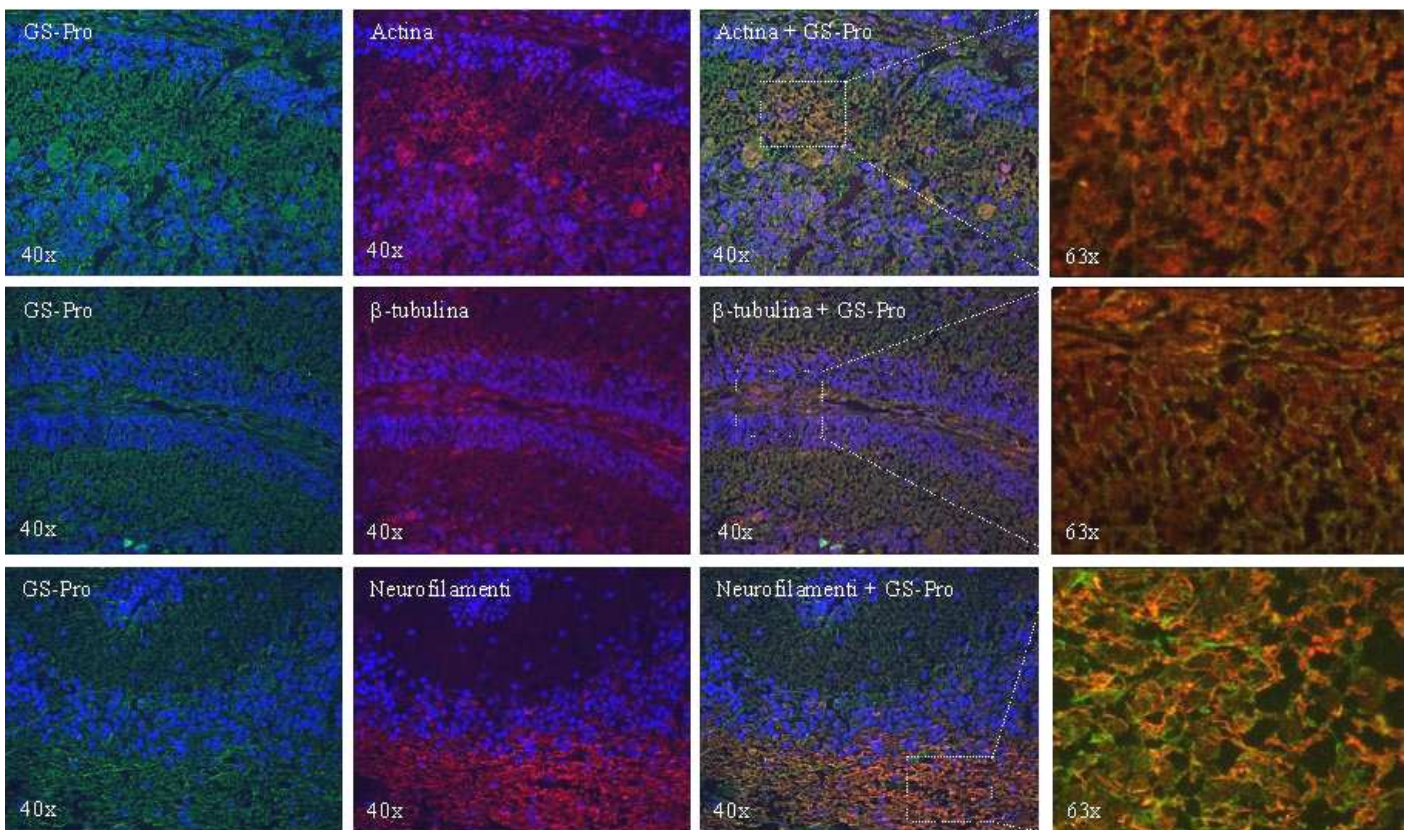
Lane 7: omogenato di controllo trattato con *GSSG* 10 mM, immunoprecipitato con Ab β -tubulina e rivelato con Ab *GS-Pro*

Lane 8: omogenato di controllo trattato con *GSSG* 10 mM, immunoprecipitato con Ab neurofilamenti e rivelato con Ab *GS-Pro*

Per confermare i dati biochimici che mostravano la glutationilazione fisiologica di alcune proteine del citoscheletro nel SNC umano, abbiamo utilizzato delle sezioni congelate di cervelletto per visualizzare simultaneamente i siti di legame per il *GS-Pro* e le proteine identificate con l'analisi di western blot, utilizzando differenti

fluorocromi (Fig. 10). Il pattern merged dell'immunomarcatura con entrambi i fluorocromi indica che la reattività per il GS-Pro colocalizza con actina, β -tubulina e NF, tuttavia una notevole percentuale del segnale del glutatione rimane libero, a dimostrare che anche altre proteine cellulari sono glutationate.

Figura 10

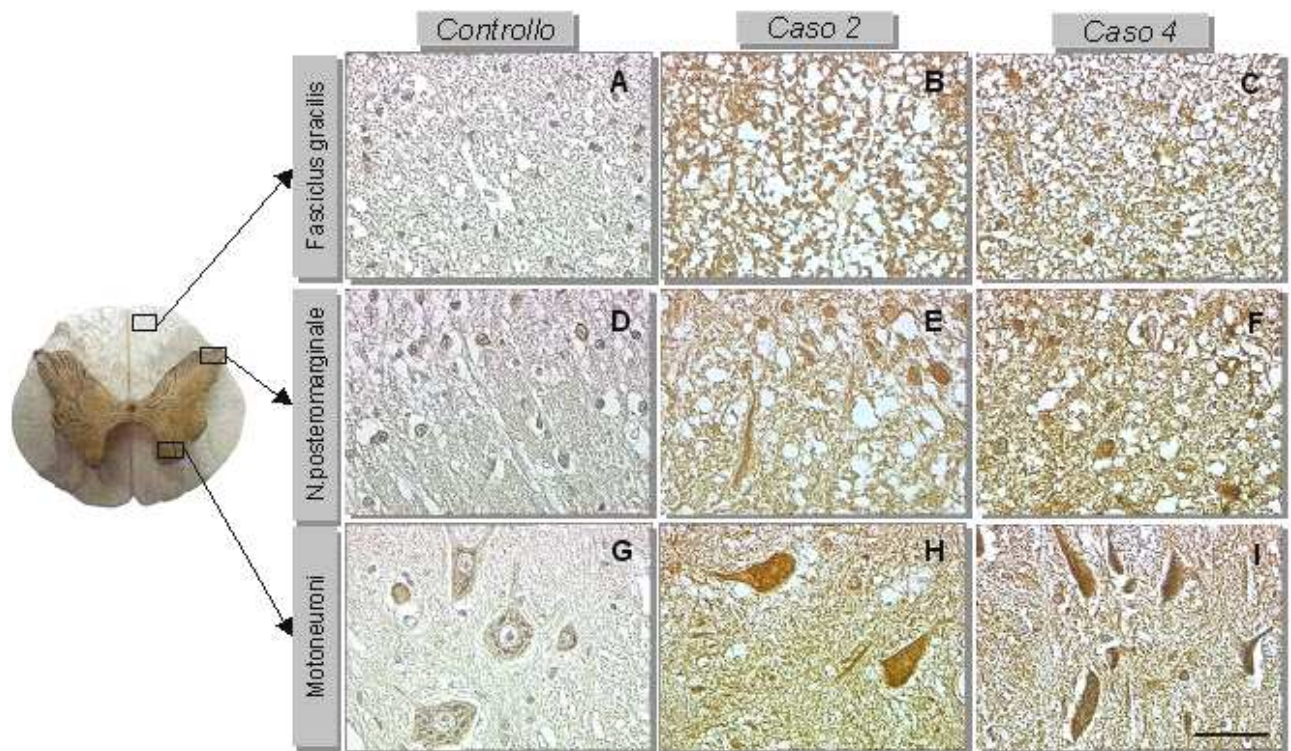


Analisi in immunofluorescenza di criosezioni di cervelletto. Sono stati usati i seguenti fluorocromi: goat anti mouse fluoresceinato per il GS-Pro, goat anti rabbit rodaminato per l'actina, la β -tubulina ed i neurofilamenti, DAPI (4',6-diamono-2-fenilindolo diidrocloride) per i nuclei.

A questo punto la nostra attenzione si è rivolta allo studio del tessuto più coinvolto nell'atassia di Friedreich, il midollo spinale.

Sezioni cervicali e lombari di midollo proveniente da individui di controllo incubate con anticorpo anti GS-Pro mostravano una debole immunoreattività che appariva sotto forma di un pattern granulare nella sostanza grigia così come nelle cellule e nelle fibre della sostanza bianca (Fig. 11 A,D,G). In particolare, la reattività è stata osservata nei larghi motoneuroni somatici delle corna anteriori (Fig. 11 G) e nelle cellule neuronali del nucleo posteromarginale (Fig. 11 D), del nucleo proprio dorsale, del nucleo dorsale di Clarke e del nucleo intermediomediale. Nei pazienti Friedreich l'immunomarcatura mostrava una forte immunoreattività per il GS-Pro (Fig. 11 B, C, E, F, H, I), suggerendo un significativo aumento della glutationilazione proteica in tutti i neuroni della sostanza grigia, in particolare nei motoneuroni delle corna anteriori (Fig. 11 H, I), così come nelle fibre di tutti i tratti spinali (principalmente nelle colonne bianche posteriori e nei tratti spinocerebellari e corticospinali).

Figura 11



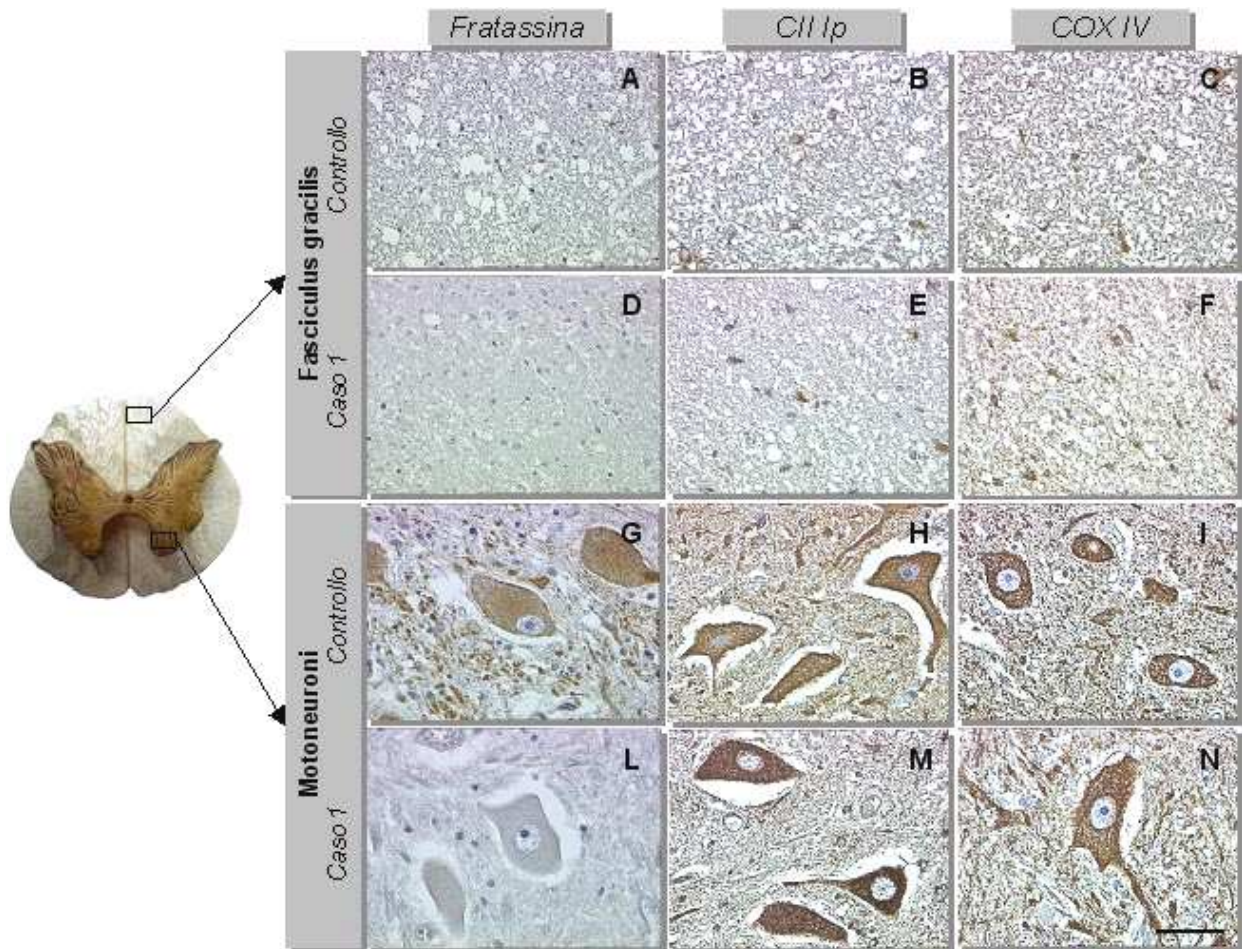
Immunomarcatura per il GS-Pro di sezioni cervicali di midollo spinale provenienti da un controllo e due pazienti a livello del fasciculus gracilis (B, C), del nucleo posteromarginale (E, F) e delle corna anteriori (H, I). (barra di ingrandimento = 50 μ m).

L'immunoreattività per la fratassina era assente o marcatamente ridotta sia nei neuroni della sostanza grigia che in cellule e fibre della sostanza bianca di tutti e quattro i pazienti Friedreich (Fig. 12 D, L) rispetto ai controlli (Fig. 12 A, G).

Sezioni di controlli (Fig. 12 B, H, C, I) e pazienti (Fig. 12 E, M, F, N) non mostravano significative differenze nel pattern di immunomarcatura usando anticorpi contro la subunità II del complesso

II a codifica nucleare (CII Ip) e la subunità IV della citocromo C ossidasi (COX IV) della catena respiratoria mitocondriale.

Figura 12



Immunomarcatura di sezioni cervicali di midollo spinale provenienti da un controllo e un paziente per la localizzazione della fratassina (A, D, G, L) del CII Ip (B, E, H, M) e della COX IV (C, F, I, N) (barra di ingrandimento = 50 μm).

Una normale immunomarcatura è stata individuata sia nei controlli che nei pazienti usando anticorpi che riconoscono la β-tubulina (Fig. 13

A, B, C; Fig. 14 A, B, C) e la catena pesante dei neurofilamenti (NF-H) (Fig. 13 L, M, N; Fig. 14 G, H, I).

Per verificare se l'aumentata glutationilazione proteica riscontrata nei midolli spinali Friedreich potesse interferire negativamente con la polimerizzazione del citoscheletro, come precedentemente dimostrato nei fibroblasti di pazienti Friedreich (Pastore et al., 2003 a), abbiamo utilizzato degli anticorpi in grado di riconoscere subunità specifiche delle proteine citoscheletriche.

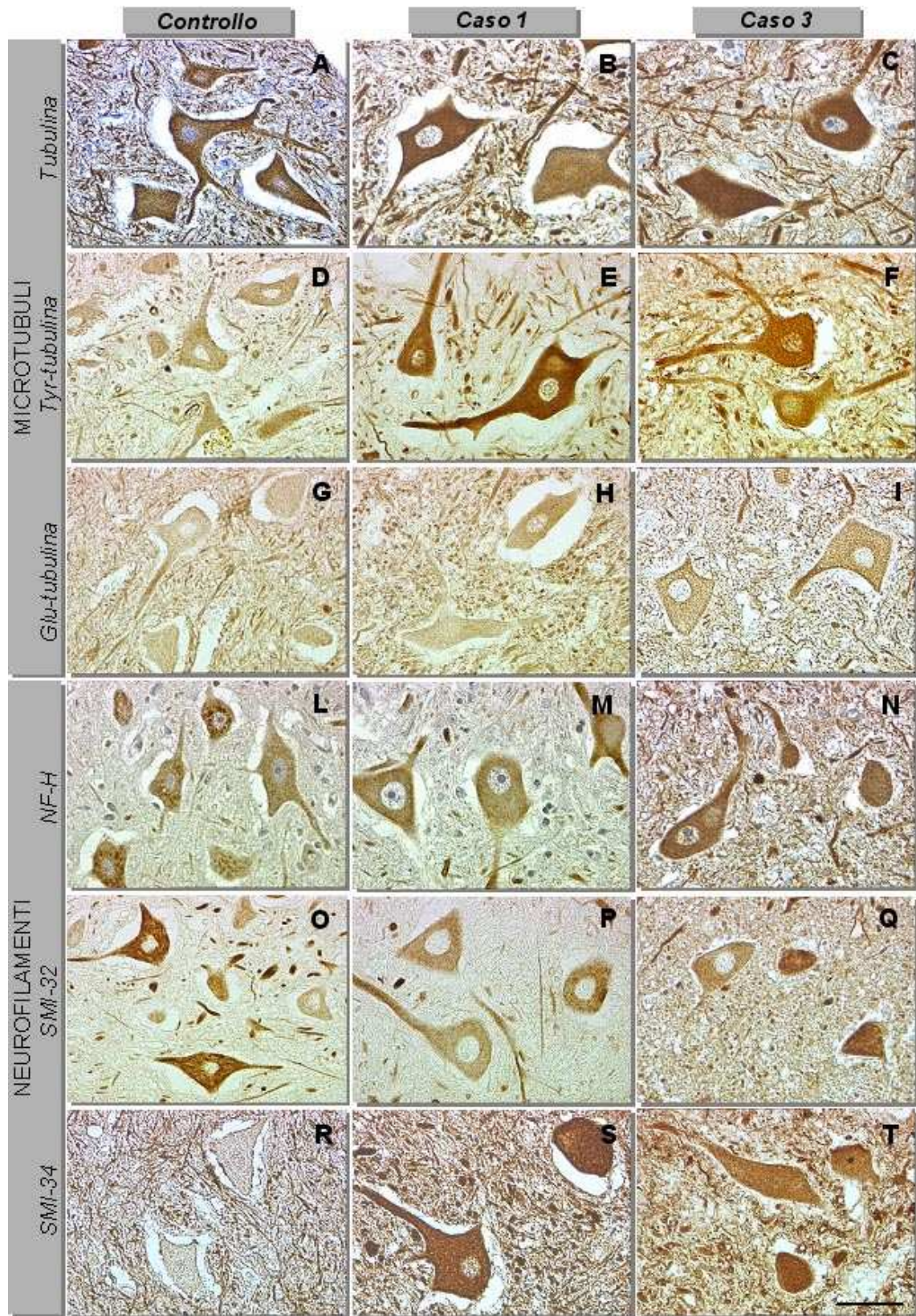
Per valutare la distribuzione della forma stabile e dinamica dei microtubuli, le sezioni sono state incubate con anticorpi che riconoscono la tubulina tirosinata (Tyr-Tub) e la tubulina detirosinata (Glu-Tub), rispettivamente associate alla forma stabile e dinamica dei microtubuli.

Interessantemente nelle corna anteriori di tutti i pazienti Friedreich era presente un forte aumento della marcatura per la Tyr-Tub a livello dei neuroni (Fig. 13 E, F; Fig. 14 E, F). Al contrario, la Glu-Tub nelle stesse cellule mostrava una reattività normale o leggermente aumentata (Fig. 13 H, I). Valutata in maniera complessiva questi risultati suggeriscono un differente livello di polimerizzazione dei microtubuli nei Friedreich, con un significativo aumento del livello del pool della tubulina dinamica, rispetto a quello del pool stabile.

La distribuzione dei NF-H fosforilati è stata indagata usando anticorpi che riconoscono in maniera specifica le forme di NF-H fosforilati (SMI-34) e non-fosforilati (SMI-32). Gli SMI-34 sono normalmente situati negli assoni dei neuroni.

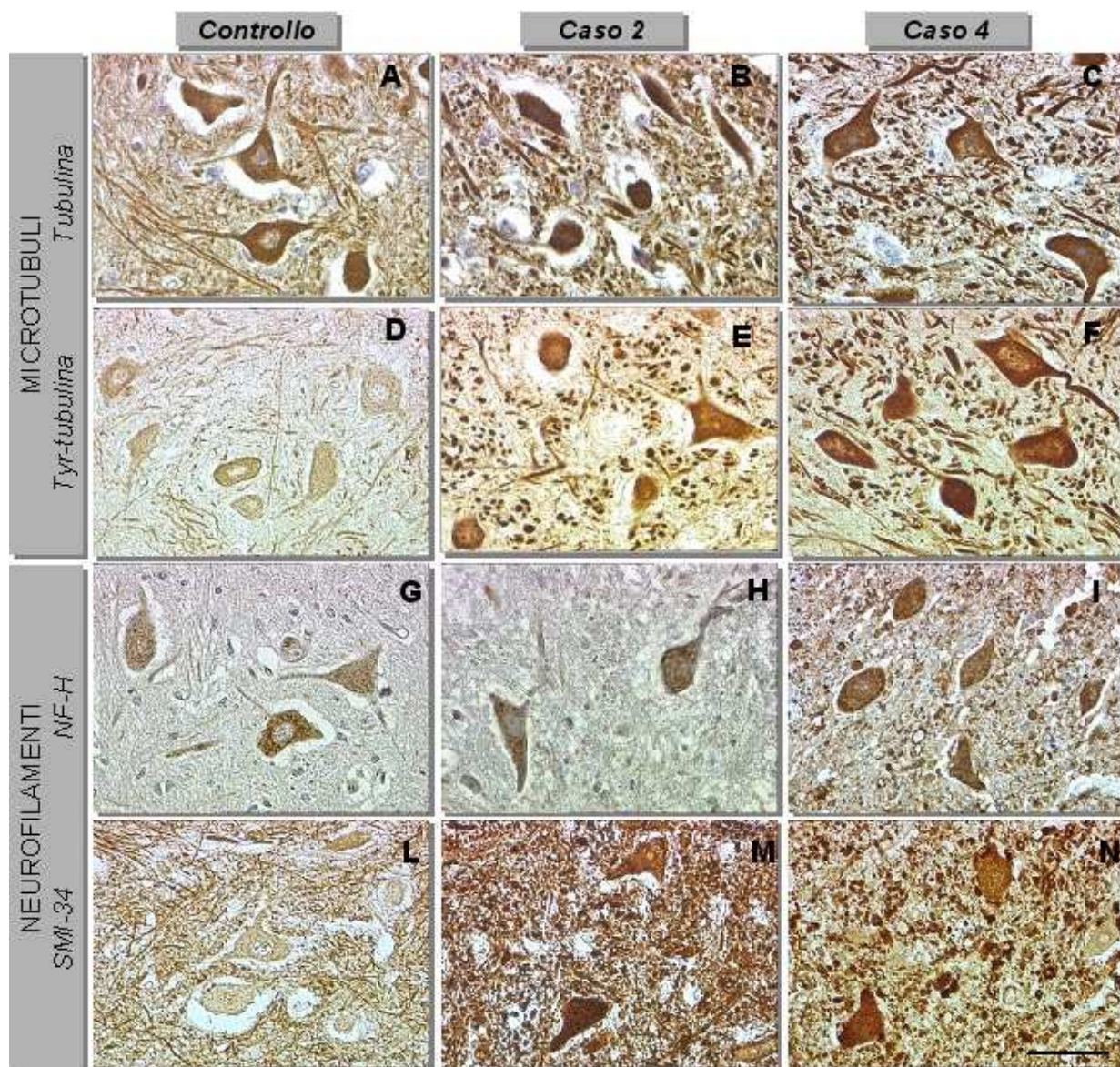
Nelle corna anteriori dei casi Friedreich era visibile un aumento della marcatura neuronale per lo SMI-34, con una distribuzione cellulare del pattern dell'immunoreattività principalmente a livello del pericarion (Fig. 13 S, T; 14 M, N). Nel tessuto di controllo, utilizzando lo stesso anticorpo, non era visibile una marcatura del pericarion significativa (Fig. 13 R; 14 L). Al contrario, l'anticorpo contro lo SMI-32 mostrava un'immunoreattività più debole nei motoneuroni spinali dei casi Friedreich (Fig. 13 P, Q) quando paragonata a quella dei controlli (Fig. 13 O). Questi dati indicano un'anomala distribuzione della forma fosforilata dei NF-H nelle cellule delle corna anteriori dei pazienti Friedreich, con un accumulo patologico a livello del pericarion.

Figura 13



Immunomarcatura di sezioni lombari di midollo spinale provenienti da un controllo e due pazienti per la localizzazione di tubulina (A, B, C), Tyr-tub (D, E, F), Glu-tub (G, H, I), NF-H (L, M, N), SMI-32 (O, P, Q) e SMI-34 (R, S, T) (barra di ingrandimento = 50 μ m).

Figura 14

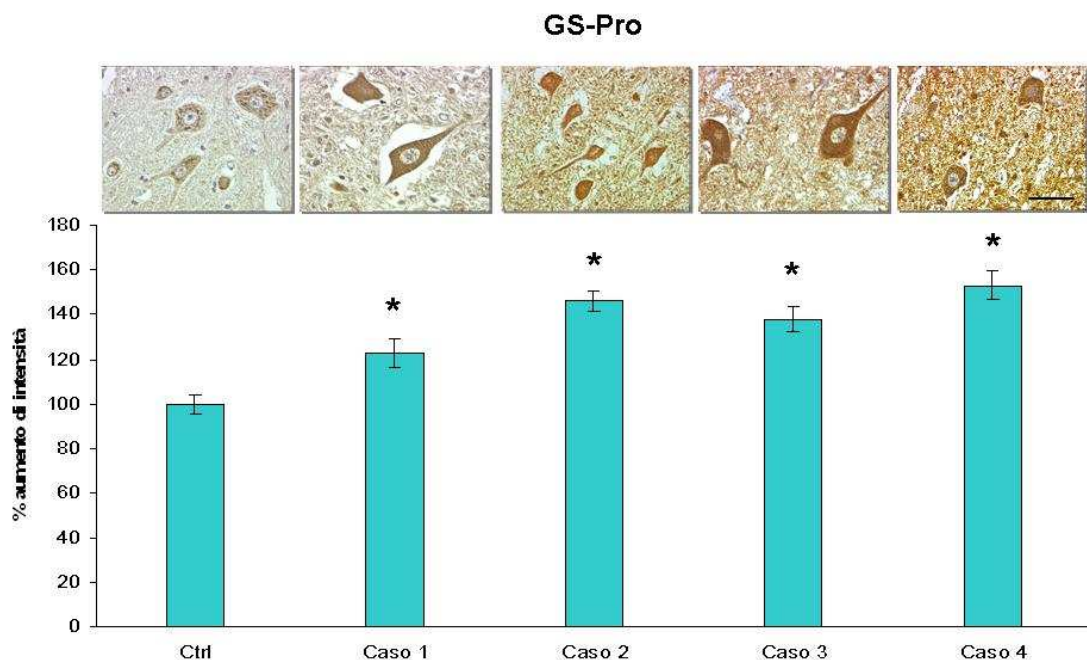


Immunomarcatura di sezioni cervicali di midollo spinale provenienti da un controllo e due pazienti per la localizzazione di tubulina (A, B, C), Tyr-tub (D, E, F), NF-H (G, H, I) e SMI-34 (L, M, N) (barra di ingrandimento = 50 μ m).

Per cercare di quantizzare in maniera più precisa l'accumulo di proteine glutationilate, di Tyr-tubulina e di SMI-34 nei motoneuroni dei pazienti, abbiamo effettuato un'analisi densitometrica.

Come si può vedere in figura 15, in tutti e quattro i casi Friedreich esaminati l'accumulo di proteine glutationilate risultava significativamente maggiore ($n = 3$; $p < 0.005$) rispetto al controllo (controllo $177,33 \pm 7,09$; caso 1 $217,67 \pm 14,22$; caso 2 $258,67 \pm 11,59$; caso 3 $246,00 \pm 14,11$; caso 4 $270,67 \pm 17,01$), con un aumento medio del 40%.

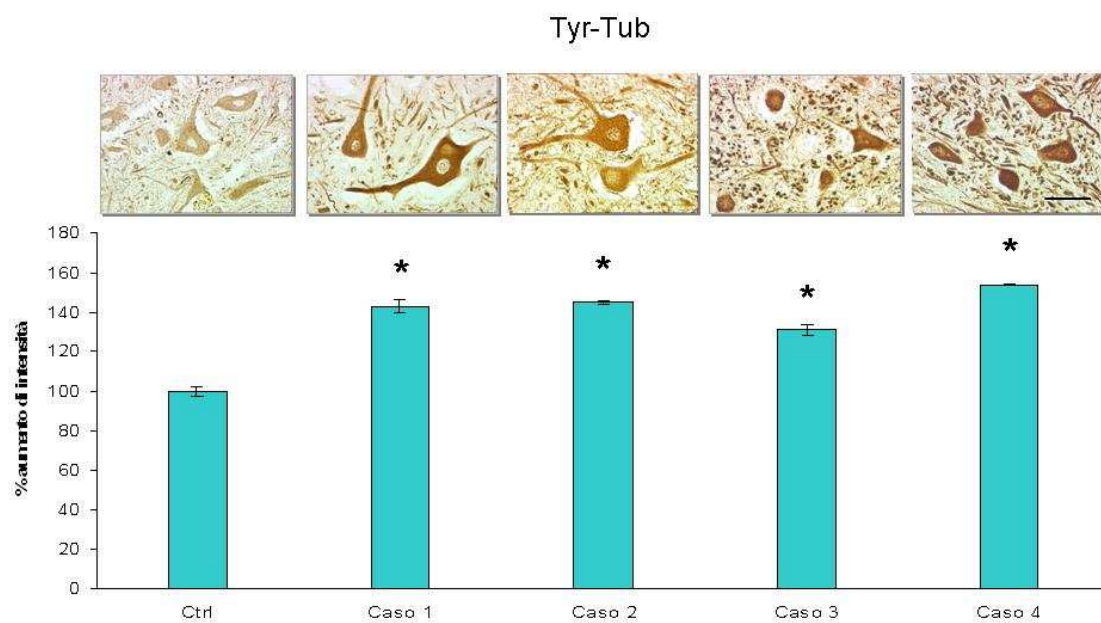
Figura 15



Analisi densitometrica dell'accumulo di proteine glutationilate all'interno dei motoneuroni. In tutti i casi $n = 3$; $p < 0.005$ (barra di ingrandimento = $50 \mu\text{m}$).

Egualemente, in tutti e quattro i casi Friedreich esaminati l'accumulo di Tyr-tubulina (Fig. 15) nei corpi cellulari risultava significativamente maggiore ($n = 3$; $p < 0.005$) rispetto al controllo (controllo $174,33 \pm 4,62$; caso 1 $248,67 \pm 8,50$; caso 2 $253,00 \pm 2,65$; caso 3 $228,67 \pm 6,43$; caso 4 $269,00 \pm 1,00$), con un aumento medio del 43%.

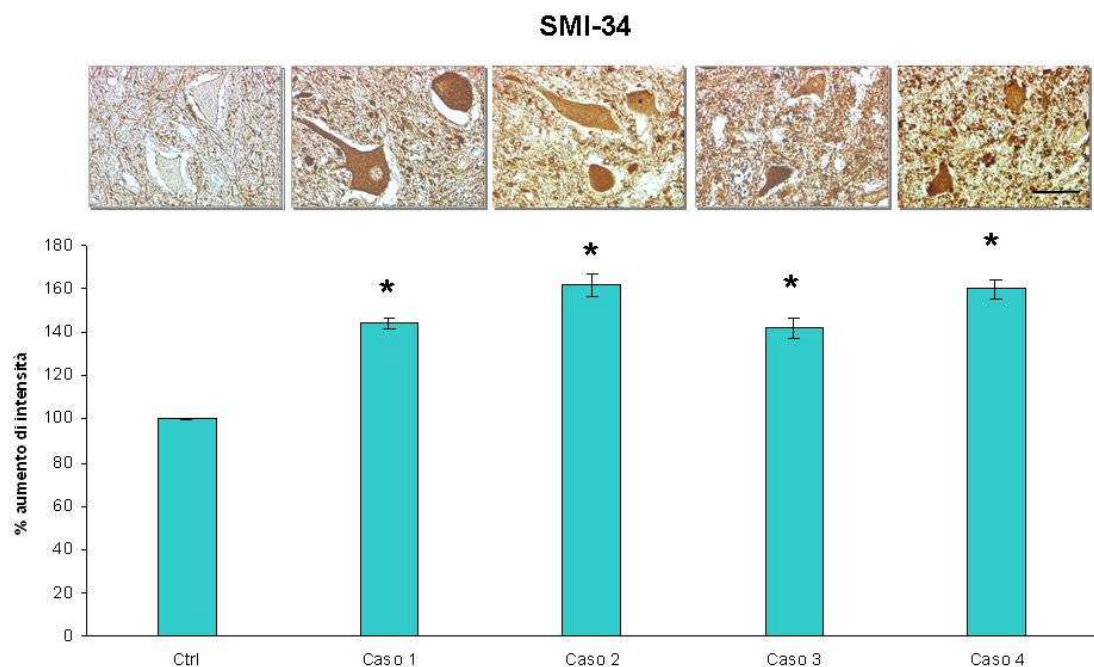
Figura 16



Analisi densitometrica dell'accumulo di Tyr-tub all'interno dei motoneuroni. In tutti i casi $n = 3$ $p < 0.005$ (barra di ingrandimento = $50 \mu\text{m}$).

Infine, anche l'accumulo di SMI-34 (Fig. 17) nei corpi cellulari risulta va significativamente maggiore nei quattro pazienti (n = 3; p < 0.005) rispetto al controllo (controllo 203,00 ± 1,00; caso 1 293,00 ± 6,56; caso 2 329,67 ± 16,92; caso 3 289,00 ± 12,49; caso 4 326,67 ± 14,67), con un aumento medio del 52%.

Figura 17

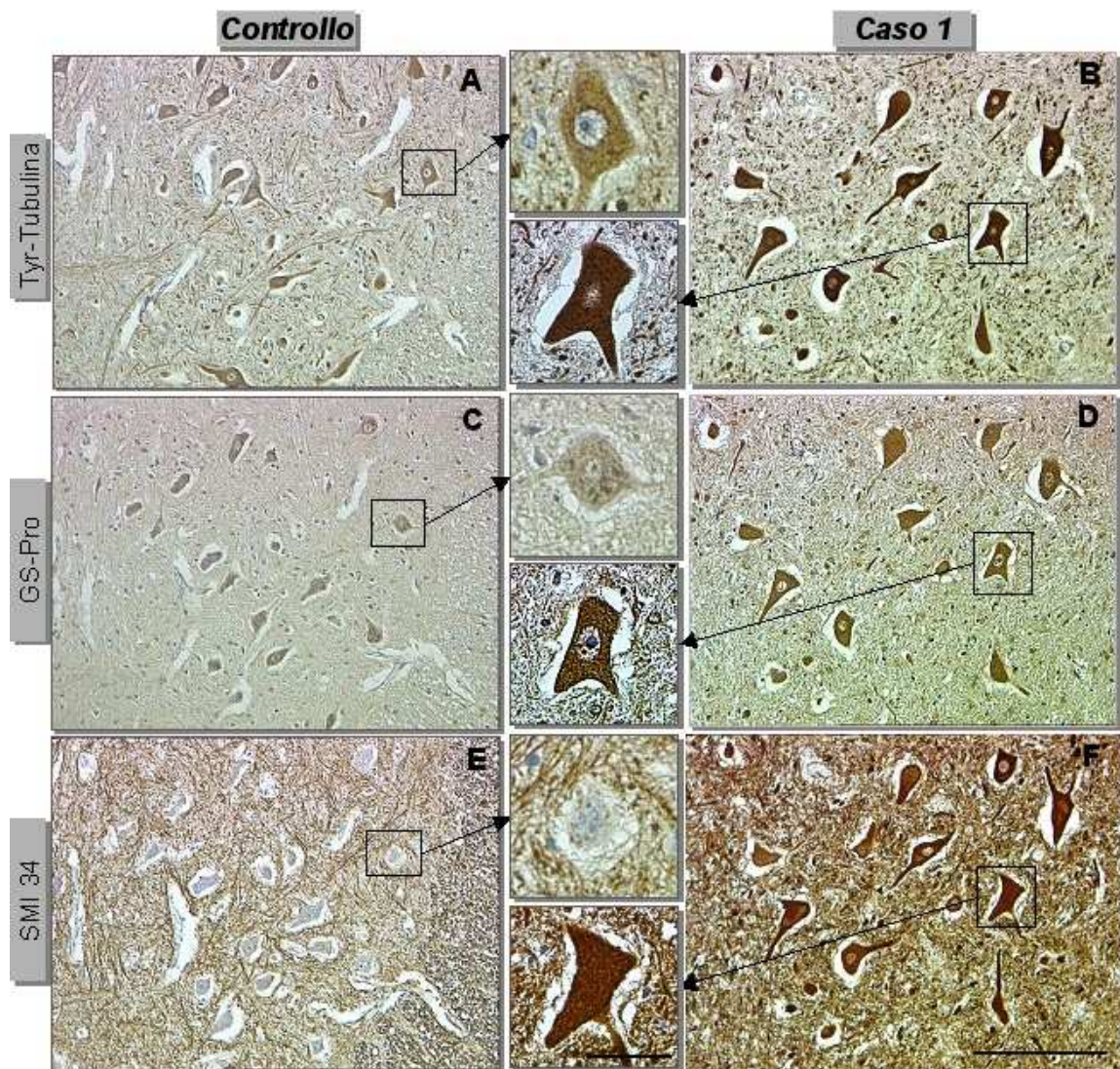


Analisi densitometrica dell'accumulo di SMI-34 all'interno dei motoneuroni. In tutti i casi n = 3 p < 0.005 (barra di ingrandimento = 50 µm).

L'immunomarcatura effettuata su sezioni seriate del midollo spinale di uno dei pazienti ci ha consentito di dimostrare che i motoneuroni che reagivano fortemente con il GS-Pro (Fig. 18 D) erano anche quelli che mostravano un netto aumento dell'immunomarcatura

per Tyr-Tub (Fig. 18 B) e per lo SMI-34 (Fig. 18 F), suggerendo che l'aumento della glutationilazione proteica in queste cellule colocalizza con un'anomala polimerizzazione dei microtubuli ed una patologica distribuzione della forma fosforilata dei NF-H.

Figura 18



Immunomarcatura di sezioni seriate lombari di midollo spinale provenienti da un controllo e un paziente per la localizzazione della Tyr-tub (A, B), GS-Pro (C,D) e SMI-34 (E, F) (barra di ingrandimento foto A, B, C, D, E, F = 200 μ m; barra di ingrandimento riquadri centrali = 50 μ m).

DISCUSSIONE

Si ritiene che ogni singola cellula cerebrale produca più 10^{11} radicali liberi ogni giorno; le cellule del cervello umano consumano il 20% dell'ossigeno utilizzato dal tutto il corpo, pur costituendo solo il 2% del peso corporeo. Di conseguenza, la quantità di specie ossigeno reattive che vengono generate da queste cellule nel corso del metabolismo ossidativo è estremamente elevata (Doraiswamy and Finefrock, 2004; Dringen, 2000). Per questo motivo lo stress ossidativo è chiamato in causa sempre più frequentemente non solo nell'invecchiamento, ma anche nella patogenesi di diverse malattie neurodegenerative, tra le quali il morbo di Parkinson (PD), l'atassia di Friedreich (AF), il morbo di Alzheimer (AD) e la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) (Shapira, 1999).

Nel cervello la fonte principale di ROS sono i mitocondri, la nitrossido sintetasi, la monoamino ossidasi e gli enzimi P450, oltre ai radicali prodotti dall'elevato livello metabolico dei neuroni. E' per questo motivo che le cellule cerebrali sane possiedono elevate concentrazioni di difese antiossidanti (Schulz et al., 2000).

Come detto in precedenza, in condizioni fisiologiche la coppia redox del glutatione (GSH/GSSG) è presente con la forma ridotta

predominante rispetto a quella ossidata. Tuttavia, in presenza di stress ossidativo, l'equilibrio viene spostato a favore della forma ossidata, che si può legare alle proteine e glutationarle (Pastore et al., 2003 b). E' stato dimostrato che nei linfociti T umani sottoposti a stress ossidativo vengono glutationate diverse proteine del citoscheletro, tra le quali actina, vimentina, miosina, tropomiosina, cofilina e profilina (Fratelli et al., 2002; Ghezzi et al., 2002) e nel sangue e nei fibroblasti di pazienti Fiedreich la glutationilazione avviene per l'emoglobina e l'actina (Piemonte et al., 2001; Pastore et al., 2003 a).

Nella prima parte del nostro lavoro abbiamo valutato l'eventuale presenza di proteine glutationate ed il loro pattern di immunoreattività a livello della corteccia cerebrale, del cervelletto e del midollo di controlli sani, poiché in letteratura non esistevano dati a riguardo (Fig. 6; Fig. 7).

Nel sistema nervoso centrale di controlli sani abbiamo dimostrato la presenza di marcatura per le proteine glutationate nella corteccia cerebrale e cerebellare, con un aumento di intensità a livello dei corpi cellulari neuronali, a livello delle cellule del Purkinje e di alcuni dei neuroni dello strato granulare e nel midollo. I nostri dati concordano con il fatto che la glutationilazione è un normale processo fisiologico,

fortemente aumentato dallo stress ossidativo, e la presenza di proteine costitutivamente glutationilate sottolinea il probabile ruolo che questo fenomeno ha nel signaling fisiologico e nella regolazione redox a livello del SNC (Klatt and Lamas, 2000).

Nei neuroni la marcatura per le proteine glutationilate è visibile a livello del citoplasma del corpo cellulare e degli assoni. Dai dati di letteratura risulta che queste cellule sono particolarmente vulnerabili all' H_2O_2 che causa la loro morte per apoptosi in coltura (Whittermore et al., 1995). I livelli di GSH nei neuroni differiscono in base alle condizioni di coltura o alle tecniche di preparazione, quindi la concentrazione del GSH in queste cellule non è stata ancora stabilita con precisione (Dringen, 2000). Il sistema di difesa delle cellule neuronali è rappresentato soprattutto dal glutatione (Desagher et al., 1996); infatti, la somministrazione di H_2O_2 a queste cellule in coltura causa una rapida ossidazione del GSH ed uno squilibrio nel rapporto GSH/GSSG (Dringen et al. 1999).

Un ruolo nella difesa dei neuroni dallo stress ossidativo è giocato anche dalla rete perineuronale. La rete perineuronale è un aggregato di proteine della matrice extracellulare, costituita da proteoglicani, condroitin solfati, tenascina e ialuronano, che forma una struttura reticolare attorno al corpo e ai dendriti prossimali di alcuni neuroni.

Tra le varie funzioni attribuite alla rete perineuronale vi è quella di provvedere al mantenimento dell'omeostasi ionica locale di calcio, potassio e sodio attraverso le sue strutture polianioniche ad elevata carica. Tuttavia, queste componenti possono anche interagire con specie ioniche responsabili della generazione di stress ossidativo, come il ferro, e, attraverso lo scavenging ed il legame con questi ioni, la rete perineuronale può contribuire al mantenimento dell'omeostasi redox, impedendo che i neuroni siano soggetti al danno ossidativo conseguente all'accumulo intracellulare di queste specie ioniche (Morawski et al., 2004).

Negli oligodendrociti la marcatura per le proteine glutationate risulta più debole rispetto ai neuroni, con prevalenza del segnale a livello del citoplasma e con esclusione del nucleo. Gli oligodendrociti sono molto vulnerabili all' H_2O_2 poiché contengono basse concentrazioni di GSH ed un'alta quantità di ferro (Dringen, 2000). E' proprio il ferro uno dei più importanti metalli attivi dal punto di vista redox e capace di facilitare la generazione di radicali liberi (Doraiswamy and Finefrock, 2004).

Gli astrociti sono le uniche cellule del sistema nervoso centrale che, secondo i nostri risultati, non presentano un livello di proteine glutationate basale. Negli astrociti il contenuto di GSH è in un range

che varia tra 16-50 nmol/mg proteina e sono le uniche cellule capaci di rilasciare GSH nel mezzo (Dringen, 2000).

Lo scambio metabolico più attivo tra le cellule del sistema nervoso centrale avviene proprio tra astrociti e neuroni. Gli astrociti hanno un ruolo prominente nella difesa del cervello dai ROS, poiché nel complesso contengono il livello di antiossidanti più elevati rispetto alle altre cellule cerebrali; non a caso i neuroni sono più vulnerabili rispetto ad essi agli insulti ad es. dell' H_2O_2 , in colture isolate (Peuchen et al., 1997). Se, al contrario, si analizzano le co-culture neuroni-astrociti, questi ultimi svolgono un ruolo protettivo rimuovendo i perossidi e salvaguardando i neuroni (Desagher et al., 1996).

Nella corteccia cerebellare abbiamo riscontrato una debole marcatura per le proteine glutationate a livello del neuropilo, delle cellule del Purkinje e di alcuni dei neuroni dello strato granulare. Anche le cellule del cervelletto risentono dello stress ossidativo. Infatti, utilizzando neuroni dei granuli del cervelletto, è stato dimostrato che l'inibizione della sintesi del glutatione mitocondriale e citoplasmatico provoca un'aumentata produzione di ROS, una perdita del potenziale mitocondriale transmembrana ed una rapida perdita della funzione mitocondriale. Tuttavia, le cellule che vanno incontro a morte non mostrano i segni tipici dell'apoptosi, indicando che la perdita di

glutazione di per sè non provoca necessariamente apoptosi (Wüllner et al., 1999; Seyfried et al., 1999).

Per quanto riguarda il midollo, il pattern di colorazione per le proteine glutationate è simile a quello visibile nel cervello e nel cervelletto, con in aggiunta una lieve marcatura a livello dei motoneuroni e delle radici dorsali. E' stato dimostrato che la generazione di ROS che avviene in seguito ad una lesione a livello del midollo spinale di ratto contribuisce al processo secondario di danno a livello del sistema nervoso centrale, ossidando le principali componenti proteiche della cellula e, come è noto, le proteine ossidate sono più soggette alla proteolisi rispetto alle loro forme native (Leski et al., 2001).

Con l'aumento della glutationilazione proteica nel tessuto di controllo in seguito a trattamento con GSSG, riscontrato sia utilizzando tecniche di immunoistochimica che in western blot (Fig. 6; Fig. 8; Fig. 9), abbiamo dimostrato che, in condizioni di stress ossidativo, le proteine del sistema nervoso centrale vanno incontro in maggior misura alla glutationilazione, fenomeno che potrebbe essere utilizzato come un sensore dello stato redox tissutale.

Poichè dai dati di letteratura è noto che nei linfociti T umani sottoposti a stress ossidativo vengono glutationate diverse proteine

del citoscheletro, tra le quali actina, vimentina, miosina, tropomiosina, cofilina e profilina (Fratelli et al., 2002; Ghezzi et al., 2002), abbiamo indagato lo stato di glutationilazione del citoscheletro nei nostri controlli.

La distruzione del citoscheletro è un processo attraverso il quale lo stress ossidativo compromette le funzioni cellulari. Il citoscheletro dà forma alla cellula, ne determina la polarità, ne facilita il movimento, consente l'organizzazione delle membrane rispetto alle altre cellule. Esso è formato da tre principali componenti proteiche filamentose: i microfilamenti, composti da actina, i microtubuli composti da tubulina e i filamenti intermedi, composti da varie proteine tra le quali la vimentina ed i neurofilamenti (Allani et al., 2004).

Attraverso l'immunoprecipitazione (Fig. 9) abbiamo dimostrato che le proteine che vanno prevalentemente incontro alla glutationilazione proteica nel cervello umano sono actina, β -tubulina e NF. Inoltre, il significativo aumento dell'intensità del segnale dell'anticorpo anti GS-Pro sugli immunoprecipitati di campioni trattati con GSSG, indica un aumento della loro glutationilazione in condizioni di stress ossidativo

I nostri dati di immunofluorescenza (Fig. 10) mostrano che il glutatione colocalizza con actina, β -tubulina e neurofilamenti, tuttavia

una notevole percentuale del segnale del glutatione rimane libero, a dimostrare che anche altre proteine cellulari sono glutationate.

Nel sistema nervoso centrale è stato dimostrato che le sostanze pro-ossidanti sono responsabili della degenerazione a livello delle cellule neuronali ed uno dei segni di questa degenerazione è la perdita della morfologia dei neuriti. In neuroni corticali di mammifero dopo trattamento con pro-ossidanti diminuiscono i livelli delle proteine che fanno parte di microtubuli, microfilamenti e filamenti intermedi, in particolare si osserva un calo nei livelli di actina e tubulina ed in misura inferiore di vimentina. Il citoscheletro è fondamentale nella crescita dei neuriti e, poiché lo stress ossidativo fa sì che ne vengono distrutte le componenti proteiche, esso è anche responsabile della perdita dei neuriti stessi (Allani et al., 2004).

L'actina è una delle principali proteine del citoscheletro, con un ruolo fondamentale nella struttura e nelle dinamiche della matrice citoplasmatica. È stato dimostrato che proprio la glutationilazione dell'actina ne consente la polimerizzazione, con il conseguente aumento dell'F-actina. Questa scoperta mostra come la glutationilazione proteica possa essere un meccanismo regolatorio fisiologico di enorme importanza (Wang et al., 2001). Inoltre, *in vitro* è stato dimostrato che l'actina glutationilata ha una capacità di polimerizzazione inferiore

rispetto alla sua forma nativa e che l'allungamento dei filamenti risulta inibito dalla glutathionilazione (Dalle-Donne et al., 2003). Anche nelle cellule di carcinoma epidermico umano (A431) il trattamento con H₂O₂ provoca la glutathioniazione dell'actina e ne regola la polimerizzazione (Wang et al., 2001). Inoltre è stato dimostrato che l'ossidazione dell'actina è implicata in alcune malattie neurodegenerative, come in un modello murino di sclerosi laterale amiotrofica, in cui la degenerazione assonale è dovuta ad un trasporto alterato dei componenti necessari per il mantenimento assonale (Collard et al., 1995). Il livello di actina ossidata è molto più elevato negli estratti cellulari provenienti dal cervello di pazienti affetti da morbo di Alzheimer, dato che suggerisce che il danno causato dallo stress ossidativo possa essere responsabile della degenerazione neuronale presente nei pazienti (Aksenov et al., 2001). Infine, in un nostro recente lavoro (Pastore et al., 2003 a) abbiamo dimostrato che nei fibroblasti dei pazienti con atassia di Friedreich l'equilibrio redox delle cellule è spostato a favore del glutathione legato alle proteine e che l'actina, probabilmente a causa dell'eccesso di ROS causato dall'accumulo di ferro, è glutathionata, fatto che contribuisce ad un disarrangiamento dei filamenti di actina stessa all'interno delle cellule.

I microtubuli si formano dalla polimerizzazione-

depolimerizzazione controllata della tubulina, un eterodimero di subunità α e β da 50 kDa; le proteine associate ai microtubuli (MAP) interagiscono con la superficie dei microtubuli in maniera carica dipendente, aumentano la formazione dei microtubuli e stabilizzano la risultante forma polimerica.

E' stato dimostrato che i perossinitriti (ONOO^-) sono in grado di indurre la formazione di legami disolfuro tra le subunità α e β della tubulina, ossidando alcune delle cisteine presenti sulla proteina ed inibendo la polimerizzazione dei microtubuli. E' probabile che gli agenti cisteina-ossidanti siano dei modulatori fisiologici dell'assemblaggio dei microtubuli *in vivo*; infatti essi potrebbero regolare la polimerizzazione in quanto i disolfidi possono venire ridotti nuovamente grazie agli enzimi tioredoxina reduttasi dipendenti. Tuttavia, diverse cisteine possono venire ossidate senza che la polimerizzazione venga alterata, anche se esistono alcune cisteine critiche per l'assemblaggio dei microtubuli (Landino et al., 2002). Infatti è stato dimostrato che la tubulina di cervello purificata in condizioni fisiologiche presenta un livello basale di cisteine ossidate che ne inibisce la polimerizzazione; tuttavia, esse sono facilmente riducibili e non sono in grado di compromettere la funzione della proteina (Landino et al., 2004 a).

La tubulina è una proteina molto abbondante, arrivando a coprire

ben il 15% del totale delle proteine cellulari del sistema nervoso centrale; l'elevata concentrazione nelle cellule neuronali e la relativa accessibilità di ben 15 delle 20 cisteine che possiede, fanno sì che essa sia un bersaglio dell'attacco da parte dei ROS. È stato dimostrato che, incubando la tubulina in presenza di perossinitriti e glutatione, la sua glutationilazione aumenta ed il livello di ossidazione correla con l'inibizione della polimerizzazione. Inoltre, i disufidi della tubulina sono substrati sia per il sistema della glutaredoxina che per quello della tioredoxina, perciò le cisteine ossidate possono venire rapidamente ridotte da questi sistemi di riparo; in questo modo la tubulina può servire da buffer redox per proteggere dall'ossidazione altri bersagli più sensibili ed un'alterazione nello stato redox di una cellula può regolare lo stato di polimerizzazione dei microtubuli (Landino et al., 2004 a; Landino et al., 2004 b).

Anche le proteine associate ai microtubuli sono un substrato per il sistema della tioredoxina. È stato dimostrato che le cisteine della MAP2 vengono ossidate dall' H_2O_2 e questo fenomeno è responsabile dei cambiamenti nelle cinetiche di polimerizzazione dei microtubuli, poiché la MAP2 ossidata non è più in grado di accelerarne la polimerizzazione, anche se riesce ancora a legarsi ad essi. È probabile che *in vivo* proprio il sistema della tioredoxina, riducendo la MAP2 ossidata, intervenga

nella regolazione della polimerizzazione dei microtubuli (Landino et al., 2004 c; Landino et al., 2004 d).

La generazione di ROS in seguito ad una lesione a livello del midollo spinale di ratto contribuisce al processo secondario di danno a livello del sistema nervoso centrale ossidando le principali componenti proteiche della cellula e le proteine così ossidate sono più soggette alla proteolisi rispetto alle loro forme native. E' stato dimostrato che la lesione midollare provoca un disassemblaggio ed una perdita dei neurofilamenti, fenomeno prontamente rallentato in presenza di sostanze antiossidanti. Proprio il disassemblaggio delle proteine del citoscheletro può essere responsabile della perdita di funzione e della morte cellulare; esiste tuttavia una finestra di tempo entro la quale il fenomeno risulta reversibile (Leski et al., 2001).

Quindi, quanto emerge in letteratura sembra avvalorare i nostri dati, lasciando supporre che la glutattonilazione reversibile di alcune componenti del citoscheletro possa regolare lo stato redox del SNC umano e modulare l'assemblaggio del citoscheletro neuronale, determinando l'integrità e la vitalità cellulare

Tuttavia, sebbene dalla letteratura risulti evidente la presenza di una glutattonilazione basale a livello di moltissime proteine cellulari, è altrettanto evidente che lo stress ossidativo possa alterare il normale

equilibrio fisiologico. Proprio lo stress ossidativo provocato da uno squilibrio nell'omeostasi del ferro, è tra le cause patogenetiche responsabili dello sviluppo della neurodegenerazione nell'atassia di Friedreich, la più comune tra le atassie ereditarie.

La precisa sequenza degli eventi patogenetici del Friedreich rimane ancora poco chiara. Dati recenti suggeriscono che la perdita di fratassina alteri l'equilibrio di ferro intramitocondriale e le funzioni della catena respiratoria mitocondriale con un aumento nella generazione di radicali liberi (Alper and Narayanan, 2003).

Una riduzione dell'attività delle oloproteine mitocondriali contenenti gruppi ferro zolfo, inclusi i complessi I, II e III della catena respiratoria e l'enzima aconitasi che fa parte del ciclo di Krebs, è stata anche riportata nei cardiomiociti di pazienti Friedreich (Bradley et al., 2000; Rotig et al., 1997). Inoltre, studi *in vivo* con ³¹P-MRS e con la spettroscopia muscolare continua nell'infrarosso vicino (continuous near infrared muscle spectroscopy, NIRS) hanno confermato un calo nel metabolismo energetico del tessuto cardiaco e muscolare (Calabrese et al., 2005; Lynch et al., 2002; Vorgerd et al., 2000).

Il ruolo chiave dello stress ossidativo nella patofisiologia della malattia è stato supportato da analisi sperimentali nei pazienti Friedreich (Emond et al., 2000; Schulz et al., 2000) e da evidenze *in*

vivo di un'alterazione degli enzimi antiossidanti e dell'omeostasi del glutatione (Piemonte et al., 2001; Tozzi et al., 2002). Ciò nonostante il grado e l'estensione della citotossicità da radicali liberi, così come l'alterazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale nel SNC, non sono ancora stati pienamente chiariti nel Friedreich.

Nel nostro lavoro sperimentale abbiamo analizzato per la prima volta sia l'espressione che la distribuzione topografica del glutatione legato alle proteine nel midollo spinale ottenuto dalle autopsie di quattro pazienti Friedreich. La nostra attenzione si è rivolta al midollo spinale dei pazienti in quanto è una delle sedi principali della malattia.

Abbiamo dimostrato in tutti e quattro i casi Friedreich un aumento dell'immunoreattività per il GS-Pro sia nei neuroni della sostanza grigia che in cellule e fibre della sostanza bianca, suggerendo un significativo aumento della glutationilazione proteica rispetto ai controlli sani (Fig. 11), pari al 40% (Fig. 15).

Considerando il ruolo che le proteine glutationilate hanno come biomarkers dello stress ossidativo (Giustarini et al., 2004; Sparaco et al., 2006), questi dati indicano chiaramente la presenza di uno stress ossidativo a livello del midollo spinale, molto probabilmente associato alla ridotta espressione di fratassina. Sfortunatamente il piccolo numero di pazienti esaminati e la relativa omogeneità dell'espansione

GAA trovata in tutti i casi non ci ha consentito di stabilire alcuna relazione tra il livello di stress ossidativo cellulare ed il genotipo.

Questi dati, assieme alle evidenze che ci provengono dalla letteratura, ci portano ad associare l'aumento della glutathionilazione proteica oltre il livello fisiologico ad un'alterazione della corretta funzionalità cellulare. Infatti, è noto da dati di letteratura che una deplezione del glutathione ridotto provoca la degenerazione e la morte dei motoneuroni (NSC-34) sia *in vitro* che *in vivo*, in un modello murino di ALS (Chi et al., 2007; Rizzardini et al., 2003)

Come detto in precedenza, i filamenti citoscheletrici sono sensibili agli spostamenti dello stato redox della cellula e possono rappresentare un bersaglio del danno da radicali liberi. Uno dei primi segni di degenerazione a livello delle cellule neuronali è la perdita della morfologia dei neuriti ed uno degli eventi precoci che alterano la struttura dei neuriti è proprio la distruzione del citoscheletro (Bellomo e Mirabelli, 1992).

Precedenti studi *in vitro* hanno mostrato che lo stress ossidativo provoca una disorganizzazione dei microfilamenti di actina in cellule non-neuronali (Banan et al., 2000) e la depolimerizzazione della tubulina nei neuroni (Allani et al., 2004). In particolare, è stato dimostrato che all'aumentare del tempo di esposizione ad una tossina capace di generare

radicali liberi, aumentano la perdita e la depolimerizzazione dei filamenti citoscheletrici appartenenti a microfilamenti, microtubuli e filamenti intermedi (Allani et al., 2004).

Inoltre, l'ossidazione dell'actina è stata riportata anche in alcune malattie umane neurodegenerative, tra le quali la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) (Collard et al., 1995) ed il morbo di Alzheimer (DAT) (Aksenov et al., 2001), ed è stato dimostrato che la glutationilazione dell'actina provoca un'alterazione delle dinamiche dei microfilamenti e delle funzioni del citoscheletro nei fibroblasti dei pazienti con Friedreich (Pastore et al., 2003 a).

L'analisi di diverse proteine citoscheletriche nel midollo spinale dei nostri pazienti Friedreich mostra un'immunomarcatura aumentata nelle corna anteriori per la Tyr-Tub e normale per la Glu-Tub (Fig. 13; Fig. 14), in particolare la Tyr -Tub risulta aumentare in media del 43% rispetto ai controlli (Fig. 16). Poiché nel tessuto nervoso la tubulina detirosinata e tirosinata sono associate rispettivamente ai microtubuli stabili e dinamici, i nostri dati sembrano indicare un significativo aumento del pool dinamico della tubulina rispetto a quello stabile, suggerendo un differente livello di polimerizzazione dei microtubuli nel Friedreich.

I microtubuli sono in equilibrio dinamico con la forma non polimerizzata della tubulina, che può essere modificata da diverse modificazioni post-traduzionali. Una di esse include la reazione di tirosinazione-detirosinazione a livello del C-terminale della subunità α (Contin and Arce, 2000).

La distribuzione delle due forme della tubulina è strettamente regolata nelle varie fasi del differenziamento cellulare. I microtubuli nelle cellule proliferanti sono costituiti principalmente da Tyr-tubulina, mentre nelle differenziate una significativa quantità di microtubuli sono principalmente Glu-tubulina. Inoltre esiste una differente distribuzione topografica delle due forme della tubulina, con una prevalenza della Tyr-tubulina all'interno del corpo cellulare e del cono di crescita, mentre, muovendosi lungo l'assone ed allontanandosi dal corpo cellulare, la forma prevalente è la Glu-tubulina (Contin and Arce, 2000; Brown et al., 1992).

Un corretto assemblaggio dei microtubuli è critico non solo per il mantenimento della corretta struttura e funzionalità cellulare, ma anche per il trasporto dei neurofilamenti dal pericarion all'assone (Francis et al., 2005).

Per la prima volta abbiamo dimostrato che nel Friedreich i motoneuroni presentano un aumento dell'immunoreattività per la forma fosforilata dei NF-H (SMI 34), che in condizioni normali sono

preferenzialmente situati nel pericarion, mentre in questa patologia presentano un'anomala distribuzione (Fig. 13; Fig. 14); l'aumento dell'immunoreattività risulta essere in media pari al 52% rispetto ai controlli (Fig. 17). Fisiologicamente la fosforilazione della subunità pesante dei neurofilamenti da parte di diverse proteine chinasi coinvolge i neurofilamenti dell'assone molto di più di quelli che si trovano nel pericarion (Sternberger and Sternberger, 1983) e regola importanti funzioni dei neurofilamenti come l'assemblaggio, il calibro assonale e l'interazione con le altre componenti del citoscheletro (Grant and Pant, 2000)

L'abbondante presenza di NF-H fosforilati all'interno dei corpi cellulari dei neuroni spinali potrebbe essere spiegata con un'attivazione della chinasi-5 ciclica dipendente (cdk5) per colpa dello stress ossidativo che sussiste localmente. In letteratura è stato ipotizzato che un'iperattivazione della cdk5 ad opera dello stress ossidativo provochi un'iperfosforilazione dei NF-H, inibendone il trasporto assonale e causandone l'accumulo nel pericarion (Shea et al., 2004). Infatti è stato dimostrato che un aumento nel livello di fosforilazione dei neurofilamenti può alterare la conformazione e/o la carica delle braccia laterali, riducendone la velocità di trasporto (Durham, 1992). Questo processo, che alla fine porta alla distruzione del trasporto dei NF dal

pericarion all'assone, è stato dimostrato in modelli transgenici di ALS mutanti per la superossido dismutasi-1 rame/zinco (SOD1) (Nguyen et al., 2001).

L'anomala fosforilazione e l'accumulo all'interno dei neuroni nei NF non è stata riportata solo nella ALS (Sobue et al., 1990), ma anche in altre malattie neurodegenerative come nel morbo di Alzheimer (Sternberger et al., 1985; Wang et al., 2001) e nel morbo di Parkinson (PD) (Pollanen et al., 1994).

L'immunomarcatura da noi effettuata su sezioni seriate del midollo spinale di uno dei pazienti (Fig. 18) ci ha consentito di dimostrare che i motoneuroni che reagiscono fortemente con il GS-Pro sono anche quelli che mostrano un netto aumento dell'immunomarcatura per la Tyr-Tub e per lo SMI-34, suggerendo che l'aumento della glutationilazione proteica in queste cellule colocalizza con un'anomala polimerizzazione dei microtubuli ed una patologica distribuzione della forma fosforilata dei NF-H. Le nostre osservazioni sembrano suggerire un'alterazione a livello del citoscheletro neuronale che potrebbe essere responsabile del fenomeno "dying-back", che caratterizza il pattern di degenerazione dei lunghi tratti assonali nel Friedreich. In particolare, ipotizziamo che l'anomala polimerizzazione dei microtubuli trovata in tutti i nostri casi possa alterare l'interazione di questa componente del

citoscheletro con i principali motori molecolari basati sui microtubuli, come ad esempio chinesina-1 e dineina citoplasmatica (Morfini et al., 2007), provocando la deregolazione del trasporto assonale, fenomeno che potrebbe essere aggravato dall'iperfosforilazione dei NF-H. Un'alterazione di questo processo è cruciale per la funzione e la sopravvivenza neuronale e quindi potrebbe essere responsabile dell'assonopatia "dying-back" (Morfini et al., 2007; Roy et al., 2005). Inoltre, la letteratura recente ha correlato mutazioni nei geni che codificano per i motori molecolari basati sui microtubuli che regolano il trasporto assonale veloce a patologie neurodegenerative come la paraplegia spastica e la SLA (Deluca et al., 2004; Lo Giudice et al., 2006).

Nel presente lavoro abbiamo dimostrato la normale espressione delle due subunità della catena respiratoria mitocondriale (la subunità II del complesso II a codifica nucleare e la subunità IV della COX) nelle cellule delle corna anteriori (Fig. 12), così come nelle aree del midollo spinale che sono solitamente coinvolte nell'atassia di Friedreich, come i tratti spinocerebellari, le colonne posteriori e i tratti corticospinali (dati non mostrati). Una normale immunomarcatura per la proteina a cluster ferro-zolfo della subunità II del complesso II nel midollo spinale sembra suggerire che la mancanza di fratassina non alteri la

biogenesi dei clusters ferro zolfo e, in conseguenza, non alteri la stabilità o l'assemblaggio delle proteine che contengono clusters ferro-zolfo, come ad esempio il complesso succinato-CoQ ossidoreduttasi. Come recentemente dimostrato in YFH1 (Gonzalez-Cabo et al., 2005), la perdita della fratassina sembra piuttosto alterare l'attività dell'SDH, portando alla generazione di radicali superossido ed allo stress ossidativo all'interno dei mitocondri.

Sulla base dei dati ottenuti dai pazienti esaminati, questo studio conferma la presenza di stress ossidativo nel Friedreich e dimostra un'alterazione dell'organizzazione del citoscheletro nelle cellule del midollo spinale, alterazione consistente in un'anomala polimerizzazione dei microtubuli ed in un'irregolare distribuzione dei NF-H fosforilati.

Quindi questi dati, assieme alle evidenze che ci provengono dalla letteratura, ci portano ad associare l'aumento della glutationilazione proteica oltre il normale livello fisiologico ad un'alterazione della corretta funzionalità cellulare. La reversibilità del processo di glutationilazione da noi già dimostrata in vitro sulle cellule provenienti dai pazienti Friedreich (Pastore et al., 2003 a), consente di ipotizzare lo sviluppo di futuri trials terapeutici a base di agenti riducenti ed antiossidanti, nella speranza, se non di invertire il fenomeno, di poterlo almeno rallentare.

BIBLIOGRAFIA

- Aksenov M. Y., Aksenova M. V., Butterfield D. A., Geddes J. W. and Markesbery W. R. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **103**, 373-383.
- Allani P. K., Sum T., Bhansali S. G., Mukherjee S. K. and Sonee M. (2004). A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* **196**, 29-36.
- Alper G., Narayanan V. 2003. Friedreich's ataxia. *Pediatr. Neurol.* **28**, 335-341.
- Banan A., Zhang Y., Losurdo J. and Keshavarzian A. (2000). Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor in human colonic cell line. *Gut* **46**, 830-837.
- Barret W.C., DeGnore J.P., Keng Y.F., Zhang Z.Y., Yim M.B. and Chock P.B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal trasduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **274**, 34543-34546.
- Bellomo G. and Mirabelli F. (1992). Oxidative stress and thecytoskeletal alterations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **663**, 97-109.
- Bidichandani S.I., Ashizawa T. and Patel P.I. (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *American Journal of Human Genetics* **62**, 111-121.
- Bradley J.L., Blake J.C., Chamberlain S., Thomas P.K., Cooper J.M. and Schapira A.H. (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics* **9**, 275-282.
- Brown A., Slaughter T. and Black M.M. (1992). Newly assembled microtubules are concentrated in the proximal and distal regions of growing axons. *J. Cell. Biol.* **119**, 867-82.
- Calabrese V., Lodi R., Tonon C., D'Agata V., Sapienza M., Scapagnini G., Mangiameli A., Pennini G., Giuffrida Stella A.M. and Butterfield D.A. (2005). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* **233**, 145-162.

Campuzano V., Montermini L., Lutz Y., Cova L., Hindelang C., Jiralerspong S., Trottier Y., Kish S.J., Faucheux B., Trouillas P., Authier F.J., Dürr A., Mandel J.L., Vescovi A., Pandolfo M. and Koenig M. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Human Molecular Genetics* **6**, 1771-1780.

Campuzano V., Montermini L., Molto M.D., Pianese L., Cossee M., Cavalcanti F., Monros E., Rodius F., Duclos F., Monticelli A., Zara F., Canizares J., Koutnikova H., Bidichandani S. I., Gellera C., Brice A., Trouillas P., De Michele G., Filla A., De Frutos R., Palau F., Patel P. I., Di Donato S., Mandel J., Coccozza S., Koenig M. and Pandolfo M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427.

Chai Y.C., Ashraf S.S., Rokutan K., Johnston Jr R.B. and Thomas J.A. (1994). S-thiolation of individual human neutropilproteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 273-281.

Chatterjee S., Noack H., Possel H., Keilho G. and Wolf G. (1999). Glutathione levels in primary glial cultures: monochlorobimane provides evidence of cell type specific distribution. *Glia* **27**, 152-161.

Chi L., Ke Y., Luo C., Gozal D. and Liu R. (2007). Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience* **144**, 991-1003.

Collard J. F., Cote F. and Julien J. P. (1995). Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **375**, 12-13.

Contin M.A. and Arce C.A. (2000). Tubulin carboxypeptidase/microtubules association can be detected in the distal region of neural processes. *Neurochemical Research* **25**, 27-36.

Cooper A.J.L. (1997). Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg R.N., Prusiner S.B., DiMauro S., Barchi R.L., Kunk L.M. (Eds.), *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 1195-1230.

Cotgreave I.A. and Gerdes R.G. (1998). Recent trends in glutathione biochemistry. Glutathione-protein interaction: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 1-9.

Dalle-Donne I., Giustarini D., Rossi R., Colombo R. and Milzani A. (2003). Reversible S-glutathionylation of cys³⁷⁴ regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radical Biology & Medicine* **34**, 23-32.

Deluca G.C., Ebers G.C. and Esiri M.M. (2004). The extent of axonal loss in the long tracts in hereditary spastic paraplegia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **30**, 576-84.

Desagher S., Glowinski J. and Premont J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* **16**, 2553-2562.

Doraiswamy P. M. and Finefrock A. E. (2004). Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* **3**, 431-434.

Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology* **62**, 649-671.

Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J.M., Hirrlinger J. and Hamprecht, B. (1999). The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J. Neurochem.* **72**, 2523-2530.

Durham H.D. (1992). An antibody against hyperphosphorylated neurofilament proteins collapses the neurofilament network in motor neurons but not in dorsal root ganglion cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**, 287-97.

Edmond M., Lepage G., Vanasse M. and Pandolfo M. (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1752-3.

Filla A., De Michele G., Cavalcanti F., Pianese L., Monticelli A., Campanella G. and Coccozza S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 554-60.

Francis F., Roy S., Brady S.T. and Black M.M. (2005). Transport of neurofilaments in growing axons requires microtubules but not actin filaments. *J. Neurosci. Res.* **79**, 442-50.

Fratelli M., Demol H., Puype M., Casagrande S., Eberini I., Salmona M., Bonetto V., Mengozzi M., Duffieux F., Miclet E., Bachi A., Vandekerckhove J., Gianazza E. and Ghezzi P. (2002). Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *PNAS* **99**, 3505-3510.

Ghezzi P., Romines B., Fratelli M., Eberini I., Gianazza E., Casagrande S., Laragione T., Mengozzi M., Herzenberg LA. and Herzenberg LA. (2002). Protein glutathionylation: coupling and uncoupling of glutathione to protein thiol groups in lymphocytes under oxidative stress and HIV infection. *Mol. Immunol.* **38**, 773-780.

Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Colombo R. and Dalle-Donne I. (2004). S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med* **8**, 201-212.

Gonzalez-Cabo P., Vazquez-Manrique R.P., Garcia-Gimeno M., Sanz P. and Palau F. (2005). Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet* **14**, 2091-2098.

Grant P. and Pant HC. (2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol.* **29**, 843-872.

Griffith O.W. and Meister A. (1985). Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4668-4672.

Gutterer, J.M., Dringen, R., Hirrlinger, J. and Hamprecht, B. (1999). Purification of glutathione reductase from bovine brain, generation of an antiserum and immunocytochemical localization of the enzyme in neural cells. *J. Neurochem.* **73**, 1422-1430.

Harding AE (1981). Friedreich's ataxia: A clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* **104**, 589-620.

Hayes J.D. and McLellan L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulate defence against oxidative stress. *Free Radical Research* **31**, 273-300.

Jain A., Martensson J., Stole E., Auld P.A.M. and Meister A. (1991). Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1913-1917.

Jauslin M.L., Vertuani S., Durini E., Buzzoni L., Ciliberti N., Verdecchia S., Palozza P., Meier T. and Manfredini S. (2007). Protective effects of Fe-Aox29, a novel antioxidant derived from a molecular combination of idebenone and vitamin E, in immortalized fibroblasts and fibroblasts from patients with Friedreich ataxia. *Mol. Cell. Biochem.* **302**, 79-85.

Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., Örd T. and Bredesen D.E. (1993). BCL-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274-1277.

Kannan R., Mittur A., Bao Y., Tsuruo T. and Kaplowitz N. (1999). GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter. *Journal Neurochemistry* **73**, 390-399.

Kannan R., Yi, J.R., Tang D., Li Y., Zlokovic B.V. and Kaplowitz N. (1996). Evidence for the existence of a sodium-dependent glutathione (GSH) transporter. *Journal Biological Chemistry* **271**, 975-9758.

Klatt P. and Lamas S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathionylation in response to oxidative and nitrosative stress. *Uur. J. Biochem.* **267**, 4928-4944

Klatt P., Molina E.P., De Lacoba M.G., Padilla C.A., Martinez-Galesteo E., Barcena J.A. and Lamas S. (1999). Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathionylation. *FASEB J.* **13**, 1481-1490.

Koutinikova H., Campuzano V., Foury F., Dolle P., Cazzalini O. and Koenig M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nature Genetics* **16**, 345-351.

Landino L. M., Hasan R., McGaw A., Cooley S., Smith A. W., Masselam K. and Kim G. (2002). Peroxynitrite oxidation of tubulin sulfhydryls inhibits microtubule polymerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **398**, 213-220.

Landino L. M., Iwig J. S., Kennet K. L. and Moynihan K. L. (2004 a). Repair of peroxynitrite damage to tubulin by the thiredoxin reductase system. *Free Radical Biology and Medicine* **36**, 497-506.

Landino L. M., Moynihan K. L., Todd J. V. and Kennet K. L. (2004 b). Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **314**, 555-560.

Landino L. M., Robinson S. H., Skreslet T. E. and Cabral D. M. (2004 d). Redox modulation of tau and microtubule-associated protein-2 by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **323**, 112-117.

Landino L. M., Skreslet T. E. and Alston J. A. (2004 c). Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 35101-35105.

Leski M. L., Bao F., Wu L., Quian H., Sun D. and Liu D. (2001). Protein and DNA oxidation in spinal injury: neurofilaments- an oxidation target. *Free Radical Biology & Medicine* **30**, 613-624.

Li Y., Maher P. and Schubert D (1997). A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* **19**, 453-463.

Lind C., Gerdes R., Hamnell Y., Schuppe-Koistinen I., von Löwenhielm H.B., Holmgren A. and Cotgreave I.A. (2002). Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **406**, 229-40.

Lo Giudice M., Neri M., Falco M., Sturnio M., Calzolari E., Di Benedetto D. and Fichera M. (2006). A missense mutation in the coiled-coil domain of the KIF5A gene and late-onset hereditary spastic paraplegia. *Arch. Neurol.* **63**, 284-287.

Lynch D.R., Lech G., Farmer J.M., Balcer L.J., Bank W., Chance B. and Wilson R.B. (2002). Near infrared muscle spectroscopy in patients with Friedreich's ataxia. *Muscle Nerve* **25**, 664- 673.

Martensson J., Lai J.C.K. and Meister A. (1990). High affinity transport of glutathione is part of a multi-component system essential for mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7185-7189.

Meister A., (1991). Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.* **51**, 155-194.

Morawski M., Brückner M. K., Riederer P., Brückner G. and Arendt T. (2004). Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Experimental Neurology* **188**, 309-315.

Morfini G., Pigino G., Opalach K., Serulle Y., Moreira JE., Sugimori M., Llinas R.R. and Brady S.T. (2007). 1-Methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2442-7.

Nguyen M.D., Lariviere R.C. and Julien J.P. (2001). Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* **30**, 135-147.

Oppenheimer D and Esiri M. Disease of the basal ganglia, cerebellum and motor neurons. In: Adams JH, Corsellis J, Duchen LW, editors. *Greenfield's neuropathology*, Ed 5. London: Arnold; 1992. p. 988

Pastore A., Federici G., Bertini E. and Piemonte F. (2003 b). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* **333**, 19-39.

Pastore A., Tozzi G., Gaeta L. M., Bertini E., Serafini V., Di Cesare S., Bonetto V., Casoni F., Carrozzo R., Federici G. and Piemonte F. (2003 a). Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich ataxia. *Journal of Biological Chemistry* **278** (43), 42588-42595.

Peuchen S., Bolanos J. P., Heales S. J. R., Almeida A., Duchen M. R. and Clark J. B. (1997). Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **52**, 261-281.

Piemonte F., Pastore A., Tozzi G., Tagliacozzi D., Santorelli F. M., Carrozzo R., Casali C., Damiano M., Federici G. and Bertini E. (2001). Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur.J. Clin. Invest.* **31**, 1007-1011.

Pineda-Molina E., Klatt P., Vázquez J., Marina A., García de Lacoba M., Pérez-Sala D. and Lamas S. (2001). Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappa B: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* **40**, 14134-42.

Pollanen M.S., Bergeron C. and Weyer L. (1994). Characterization of a shared epitope in cortical Lewy body fibrils and Alzheimer paired helical filaments. *Acta Neuropathol.* **88**, 1-6.

Puccio H. and Koenig M. (2000). Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics* **9**, 887-892.

- Rizzardini M., Lupi M., Bernasconi S., Mangolini A. and Cantoni L. (2003). Mitochondrial dysfunction and death in motor neurons exposed to the glutathione-depleting agent ethacrynic acid. *J. Neurol. Sci.* **207**, 51-8.
- Rokutan K., Johnson R.B. and Kaway K. (1994). Oxidative stress induces S-thiolation of specific proteins in cultured gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.* **266**, G247-254.
- Rotig A., De Lonlay P., Chretien D., Foury F., Koenig M., Sidi D., Munnich A. and Rustin P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature genetics* **17**, 215-217.
- Roy S., Zhang B., Lee V.M. and Trojanowski J.Q. (2005). Axonal transport defect: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* **109**, 5-13.
- Sakamoto N., Chastain P.D., Parniewski P., Ohshima K., Pandolfo M., Griffith J.D. and Wells R.D. (1999). Sticky DNA: self-association properties of long GAA-TTC repeats in R-R-Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Molecular Cell* **3**, 465-475.
- Sato N., Iwata S., Nakamura K., Hori T., Mori K. and Yodoi J. (1995). Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *J. Immunol.* **154**, 3194-3203.
- Schapira A.H.V. (1998). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochimica and Biophysica Acta* **1366**, 225-233.
- Schapira A.H.V. (1999). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochimica and Biophysica Acta* **1410**, 159-170.
- Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J. and Dichgans J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *FEBS* **267**, 4904-4911.
- Seyfried J., Soldner F., Schultz J.B., Klockgether T., Kovar K.A. and Wüllner U. (1999). Differential effects of L-buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on glutathione levels and mitochondrial function in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **264**, 1-4.
- Seznec H., Simon D., Monassier L., Criqui-Filipe P., Gansmuller A., Rustin P., Koenig M. and Puccio H. (2004). Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1017-1024.

Shea T.B., Zheng Y.L., Ortiz D. and Pant H.C. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 increases perikaryal neurofilament phosphorylation and inhibits neurofilament axonal transport in response to oxidative stress. *J. Neurosci. Res.* **76**, 795-800.

Sobue G., Hashizume Y., Yasuda T., Mukai E., Kumagai T., Mitsuma T. and Trojanovski J.Q. (1990). Phosphorylated high molecular weight neurofilament protein in lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases involving ventral horn cells. *Acta Neuropathol.* **79**, 402-408.

Sofic E., Lange K.W., Jellinger K. and Riederer P. (1992). Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **142**, 128-130.

Sparaco M., Gaeta L.M., Tozzi G., Bertini E., Pastore A., Simonati A., Santorelli F.M. and Piemonte F. (2006). Protein glutathionylation in human central nervous system: potential role in redox regulation of neuronal defense against free radicals. *J. Neurosci. Res.* **83**, 256-263.

Sternberger L.A. and Sternberger N.H. (1983). Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6126-6130.

Sternberger N.H., Sternberger L.A. and Ulrich J. (1985). Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4274-4276.

Tozzi G., Nuccetelli M., Lo Bello M., Bernardini S., Bellincampi L., Ballerini S., Gaeta L. M., Casali C., Pastore A., Federici G., Bertini E. and Piemonte F. (2002). Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich ataxia. *Archive of Disease in Childhood* **86**, 376-380.

Vogler M., Schols L., Hardt C., Ristow M., Epplen J.T. and Zange J. (2000). Mitochondrial impairment of human muscle in Friedreich ataxia in vivo. *Neuromuscul. Disord.* **10**, 430-5.

Wang J., Boja E.S., Tan W., Tekle E., Fales H.M., English S., Mielay J.J. and Chock P.B. (2001). Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 47763-47766.

Whittemore, E.R., Loo, D.T., Watt, J.A. and Cotman, C.W. (1995). A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal cultures. *Neuroscience* **67**, 921-932.

Wüllner U., Seyfried J., Groscurth P., Beinroth S., Winter S., Gleichmann M., Heneka M., Löschmann P., Schultz J.B., Weller M. and Klockgether T. (1999). Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* **826**, 53-62.