



Efecte de l'estrès oxidatiu en les taupaties

Anna Martínez Casals

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Efecte de l'estrès oxidatiu en les taupaties

Anna Martínez Casals

Director de la tesi: **Dr. Isidre Ferrer Abizanda**

Gener 2010



Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Memòria presentada per Anna Martínez Casals, llicenciada en biologia, per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona.

La tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Isidre Ferrer Abizanda en el departament de Patologia i Terapèutica Experimental de la Universitat de Barcelona.

Director
Dr. Isidre Ferrer Abizanda
Professor titular UB

Anna Martínez Casals

*Als meus pares, a la Mari Pau i al meu germà
per la seva ajuda i recolzament incondicionals*

AGRAÏMENTS

És ben curiós,...els agraïments són quasi sempre la primera part que una persona es llegeix quan li cau una tesi a les mans. Suposo que deu ser perquè tothom és conscient que una tesi no només es fa gràcies al doctorant sinó que darrera hi ha tot un engranatge que la fa possible.

Primer de tot agrair a l'Isidre l'oportunitat de fer la tesi en el seu grup, la seva energia positiva i els seus enfocaments constructius en els experiments. Les pel·lícules i els llibres recomanats sempre han estat un encert. Gràcies per les tres parts.

A la Marga i a la Rosi per donar-li caliu al lab, especialment a la Marga per l'ajuda tècnica i també la moral!. A la Núria, al Jesús, al Salva i a la Loli amb qui he resolt dubtes inesperats. A l'Esther Pérez, el Gabriel, la Sandra, el Gerard, l'Anna Gómez, la Laia, l'Anna Janué i el Guido amb els qui s'ha format una família de becaris, compartint moments de tota mena dins i fora del laboratori: gràcies gent!. A les postdoctes que em van rebre a l'arribar al grup, l'Esther Dalfó, la Berta i la Marta Barrachina i a la *carisima* Beatrice amb qui vaig tenir sort de poder coincidir amb ella abans del trasllat a l'altre lab,...gels bidimensionals, riures i no tants riures! A la Judith per la paciència que ha tingut quan vaig entrar en el món *muri* i a la Susanna que sempre ha trobat un moment per ajudar-me. A la nova generació de postdoctes, amb les que he coincidit poc però amb les que he viscut la recta final de la tesi com la Marta Martínez, la Gema, l'Ester Aso i l'Anton.

No puc passar pas per alt els agraïments pels altres labs: la gent del 4145, la Mireia, el Joan, l'Ezequiel i la Laura (gràcies per socòrrem en els meus moments d'hipoglucèmia vespertins), el Jonathan, l'Adriana, l'Artur i l'Anna Priscila. Als "bioquímics", especialment a la Maria José i a la Roser que sempre han tingut un moment pels meus dubtes.

Als amics de la universitat l'Esther, la Gemma, la Sandra, la Ruth, la Mayra, el Juan, el Javi, la Maria José amb els qui fa anys que vaig fent camí i és tot un plaer compartir la vida amb vosaltres. A la Irene i al Carlos que han viscut fil per randa aquesta tesi i que m'han ajudat molt més del que es pensen. A les meves "xatis", on cadascuna m'ha recolzat a la seva manera. A la família Casorran-Kappert que ha viscut algun que altre powerpoint dels meus. A l'Ivan per confiar sempre i tant en mi. A la Blanca per ajudar-me en els meus inicis-inicis en el món del laboratori i per continuar al meu costat. A l'Alba amb qui vaig començar ballant i ara caminem plegades. A la Roser García per la seva visió sempre tan positiva de la vida.

AGRAÏMENTS

Al Frede amb qui he obert una porta nova, on a dins hi he trobat que el pragmatisme i el realisme poden anar de la mà de la imaginació i dels somnis.

A la família per ser com sou i, especialment, al meu germà Sergi MCasals per ajudar-me a posar una cara a aquesta tesi.

I. ÍNDEX	1
II. ABREVIATURES	5
III. INTRODUCCIÓ	9
1. Estrès oxidatiu	11
1.1 <u>BREU HISTÒRIA DELS RADICALS LLIURES</u>	11
1.2 <u>ESTRÈS OXIDATIU I RADICALS LLIURES</u>	12
1.2.1 Definició	12
1.2.2 Classes de radicals lliures	12
1.2.3 Orgànuls generadors de radicals lliures	15
1.2.4 Sistemes antioxidants	16
<i>A. Sistemes enzimàtics</i>	16
<i>B. Sistemes no enzimàtics</i>	18
1.3 <u>CARACTERÍSTIQUES DEL CERVELL</u>	19
1.4 <u>OXIDACIÓ PROTEÏCA</u>	23
1.4.1 Peroxidació lipídica	24
1.4.2 Adductes de lipoxidació (ALEs)	26
1.4.3 Glicoxidació	28
1.4.4 Adductes de glicoxidació (AGEs)	28
1.5 <u>TEIXIT HUMÀ POST MORTEM</u>	29
1.6 <u>ENVELLIMENT</u>	29
2. Malalties neurodegeneratives	30
2.1 <u>TAUPATIES: Tau</u>	35
2.1.1 Malaltia de Steele-Richardson-Olszewski o Paràlisi Supranuclear Progressiva (PSP)	37
<i>A. Clínica</i>	37
<i>B. Característiques neuropatològiques</i>	38
<i>C. Etiologia</i>	40
<i>D. Estrès oxidatiu i PSP</i>	40

2.1.2 Degeneració frontotemporal lobar amb parkinsonisme	
ligada al cromosoma 17 associada a mutacions de la tau	
(DFTL-tau)	40
<i>A. Clínica</i>	42
<i>B. Característiques neuropatològiques</i>	42
<i>C. Etiologia</i>	44
<i>D. Estrès oxidatiu i DFTL-tau</i>	45
2.2 <u>NO TAUPATIES</u>	46
2.2.1 Degeneració frontotemporal lobar amb inclusions de tau	
negatives i d'ubiquitina positives (DFTL-U):	
proteinopatia TDP-43	46
<i>A. Clínica</i>	47
<i>B. Característiques neuropatològiques</i>	47
<i>C. Etiologia</i>	48
2.2.1.1 Degeneració frontotemporal lobar associada a patologia	
de motoneurona i esclerosi lateral amiotròfica (DFTL-ELA)	49
<i>A. Clínica</i>	49
<i>B. Característiques neuropatològiques</i>	50
<i>C. Etiologia</i>	51
<i>D. Estrès oxidatiu i DFTL-U, DFTL-ELA</i>	51
IV. OBJECTIUS	53
V. RESULTATS	57
1. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the	
use of post-mortem brain tissue for molecular studies	61
2. Glycolytic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal	
cortex and oxidative damage of these proteins is increased in	
progressive supranuclear palsy	77

3. Type-dependent oxidative damage in frontotemporal lobar degeneration: cortical astrocytes are targets of oxidative damage	87
4. Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates	105
VI. DISCUSSIÓ	133
VII. CONCLUSIONS	151
VIII. BIBLIOGRAFIA	155

II. ABBREVIATURES

II.ABREVIATURES

- AA** : àcid araquidònic
- AGEs** : adductes de glicoxidació
- AL** : àcid linoleic
- ALEs** : adductes de lipoxidació
- ALN** : α -àcid linolenic
- Arg** : arginina
- BHE** : barrera hematoencefàlica
- CEL** : carboxietil-lisina
- CML** : carboximetil-lisina
- CN** : cabdells neurofibril·lars, NFTs de neurofibrillary tangles
- Cys** : cisteïna
- DHA** : àcid docosahehexanoic
- DFTL** : degeneració frontotemporal lobar
- DFTL-tau** : degeneració frontotemporal lobar amb parkinsonisme lligada al cromosoma 17 associada a mutacions de la tau
- DFTL-U** : degeneració frontotemporal lobar amb inclusions de tau negatives i d'ubiquitina positives
- DFTL-ELA** : degeneració frontotemporal lobar associada a patologia de motoneurona i esclerosi lateral amiotròfica
- ELA** : esclerosi lateral amiotròfica
- FGC-1** : fosfoglicerat cinasa-1
- GFAP** : glial fibrillary acidic protein
- GPx** : glutatió peroxidasa
- GSH** : γ -L-glutamil-L-cisteïnglicina
- His** : histidina
- HNE** : 4-hidroxi-trans-2-nonenal
- Hsps** : heat shock proteins
- LCPUFA** : long-chain polyunsaturated fatty acids
- Lys** : lisina
- MA** : malaltia d'Alzheimer
- MAP** : microtubule-associated phosphoprotein
- MDA** : malondialdehid
- MDA-L** : malondialdehid-lisina
- MH** : malaltia de Huntington
- MP** : malaltia de Parkinson
- ON** : òxid nítric
- ONS** : òxid nítric sintasa
- Prx** : peroxiredoxines

II.ABREVIATURES

Pro : prolina

PSP : paràlisi supranuclear progressiva

PUFA: polyunsaturated fatty acids

RCS : reactive carbonyl species

RNS : reactive nitrogen species

ROS : reactive oxygen species

SLIs : skein-like inclusions

SOD : superòxid dismutasa

TDP-43 : TAR DNA-binding protein-43

Trx : tioredoxina

III. INTRODUCCIÓ

1. Estrès oxidatiu

1.1 BREU HISTÒRIA DELS RADICALS LLIURES

L'origen dels radicals lliures data dels voltants de l'any 1900 on en Moses Gomberg va descobrir per serendipitat una molècula orgànica, anomenant-la trifenilmetil ($C_6H_5)_3C\cdot$ (Fig. 1), formada per un àtom de carboni amb tres enllaços i un electró desaparellat en les seves òrbites de valència (Kauffman GB. 2008). Aquesta descoberta va ser molt impactant ja que anava a contracorrent de les teories de l'època: va ser la primera vegada que es trobava un radical lliure trivalent amb certa estabilitat gràcies a que els tres electrons estan “deslocalitzats” i el centre radical està protegit pels grups fenils (Wentrup C. 2002).

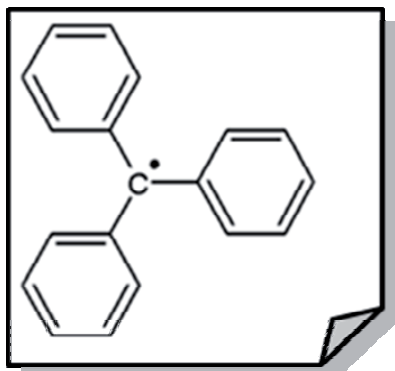


Fig.1 Estructura de la molècula de trifenilmetil, el primer radical lliure que es va definir.

Leonor Michaelis (1946) va descriure la reducció univalent seqüencial de l'oxigen com un mecanisme molecular de quatre passos de transferència d'un electró amb la formació d'un radical superòxid (O_2^-), peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i radical hidroxil ($HO\cdot$) com els intermediaris de la reducció parcial de l'oxigen i amb la formació d'una molècula d' H_2O com el producte final i del procés de reducció total. L'any 1954 Rebeca Gerschman va proposar la *teoria de Gerschman* postulant que els radicals lliures de l'oxigen són el mecanisme comú de les toxicitats de

lesió cel·lular i tissular i, per altra banda, que la toxicitat de l'oxigen és un fenomen continu. Aquesta teoria no va ser acceptada en el seu moment ja que es considerava que els radicals lliures eren massa reactius i tòxics per existir en els sistemes biològics en condicions fisiològiques. Alberto Boveris i Britton Chance (1972-73) van descriure la producció mitocondrial del H_2O_2 en els mitocondris del fetge i del cor com un procés fisiològic modulats per les condicions energètiques de la cèl·lula. Els diferents intermediaris de la reducció parcial de l'oxigen (O_2^- , H_2O_2 i $HO\cdot$) van passar a ser anomenats conjuntament ROS (reactive oxygen species) a favor dels efectes biològics semblants. El concepte de ROS perd en la identificació química de les molècules implicades però li va atribuir una operativitat biològica, mèdica i clínica extraordinària que va afavorir l'establiment del camp de la biologia dels radicals lliures oxidatius (Boveris A. 2005).

III.INTRODUCCIÓ

1.2 ESTRÈS OXIDATIU I RADICALS LLIURES

1.2.1 Definició

Finalment l'any 1985 Helmut Sies va definir el concepte d'estrès oxidatiu com “un desequilibri en el que hi ha un augment d'oxidants o una disminució d'antioxidants en comparació amb la situació definida com a normal”. A partir d'aquesta definició es van crear diferents hipòtesis de l'origen de l'estrès oxidatiu: M. Bergel, basant-se en experiments de rates exposades a determinades infeccions (*Micobacterium leprae* i *Micobacterium tuberculosis*) a les que se'ls hi administraven dietes prooxidants (alt contingut de lípids autoxidables i vaig contingut de vitamina E), va concloure que l'estrès oxidatiu és un desequilibri que permet l'aparició de la malaltia ja que les rates tractades es tornaven més susceptibles. Per altra banda, G. Deucher considerava que les malalties porten a una “perturbació metabòlica” i desencadenen en una situació d'estrès oxidatiu prenent com a referència diferents casos d'hepatitis i de SIDA on els virus estan associats a nivells baixos d'antioxidants en els diferents teixits i en el plasma (Boveris A. 2005).

La importància de l'estrès oxidatiu en les diferents patologies s'ha fet palesa en la gran quantitat d'estudis dedicats a aquest camp. Els radicals lliures han estat directa o indirectament implicats en la patogènesi de diverses malalties neurodegeneratives com per exemple en la malaltia d'Alzheimer (MA) (Markesbery WR. 1999, Markesbery i col. 2007, Marlatt i col. 2008), la malaltia de Parkinson (MP) (Chinta i col. 2008, Danielson i col. 2008), la malaltia de Huntington (MH) (Polidori i col. 1999), l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) (Cleveland DW. 1999) i d'altres patologies neurodegeneratives.

1.2.2 Classes de radicals lliures

En la majoria de cèl·lules aeròbiques la cadena mitocondrial respiratòria és una de les principals fonts generadores de ROS havent-hi, però, d'altres orgànuls productors de molècules reactives (veure apartat 1.2.3). Els nivells moderats de ROS juguen un paper essencial en la modulació de diferents funcions cel·lulars (expressió de gens, transducció de senyals, defensa contra patògens,...) (Dalle-Donne i col. 2005). Per tant, en condicions fisiològiques de la cèl·lula es generen metabòlits potencialment tòxics de l'oxigen en baixes concentracions on les vies productores es poden alterar i augmentar dramàticament els nivells de ROS.

Les principals classes de ROS (Fig.2) inclouen (Dalle-Donne i col. 2005) :

1. **anió superòxid (O_2^-)**, és un producte de vida mitja curta, intermediari en la reducció de l'oxigen a H_2O_2 , formant-se de manera ràpida i espontània en una reacció dependent de pH. La seva inestabilitat en medis aquosos ve donada per la seva ràpida dismutació a H_2O_2 . En condicions normals s'estima que aproximadament sobre l'1% del flux d'electrons mitocondrials comporta la formació d' O_2^- , tot i que si hi han interferències en la cadena de transport d'electrons poden fer augmentar encara més la seva producció (Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield DA. 2006).

2. **peròxid d'hidrogen (H_2O_2)**, té una vida mitja llarga sent un dels productes més abundants amb gran capacitat de travessar fàcilment les membranes cel·lulars. Dins de la cèl·lula l' O_2^- es converteix ràpidament a H_2O_2 gràcies a l'enzim superòxid dismutasa (Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield DA. 2006).

3. **radical hidroxil ($HO\cdot$)**, la vida mitja del $HO\cdot$ és curta actuant normalment en el lloc on s'ha produït. És un dels ROS més reactius per les macromolècules biològiques on aquesta gran reactivitat implica una menor selectivitat, distància de difusió i incapacitat per poder actuar com a missatger cel·lular (Mikkelsen i col. 2003). El grup $HO\cdot$ funciona també com a un mutagen produït per l'exposició de radiacions ionitzants. Pot formar-se a partir de l' O_2^- i del H_2O_2 (reacció d'Haber-Weiss) o per mitjà d'un ió metàl·lic (Fe^{2+} , Fe^{3+}) i del H_2O_2 (reacció de Fenton) (Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield DA. 2006; Alberts B, Bray D, Lewis J. 1996). El HOCl també pot reaccionar ràpidament amb O_2^- i formar grups $HO\cdot$ (Candeias i col. 1993).

4. **àcid hipoclorós (HOCl)**, el H_2O_2 oxida el Cl^- , en una reacció catalitzada per la mieloperoxidasa i l'eosinòfil peroxidasa, per obtenir HOCl (Thomas i col. 1995).

5. **àcid hipobromós (HOBr)**, gràcies a l'acció dels mateixos enzims que participen en la formació de l'HOCl, aquest últim pot oxidar el Br^- (Thomas i col. 1995) o bé pot oxidar-lo el H_2O_2 obtenint HOBr (Henderson i col. 2001).

S'han descrit d'altres tipus de ROS com el radical peroxi ($RO_2\cdot$), el radical alcoxi ($RO\cdot$), el radical hidroperoxil ($HO_2\cdot$), l'oxigen (O_2), l'ozó (O_3).

Per altra banda, les RNS (reactive nitrogen species) són també molècules necessàries fisiològicament per la cèl·lula però a la vegada són potencialment destructives (Mikkelsen i col. 2003). La producció biològica de l'òxid nítric (ON) actua com a un missatger, present en tots els vertebrats, participant en la modulació del flux sanguini, en processos de trombosi i també en l'activitat neural. Paradoxalment la producció d'aquesta mateixa molècula pot arribar a ser altament nociva per les neurones en pocs

III.INTRODUCCIÓ

minuts en determinades patologies, com per exemple en la isquèmia cerebral. L'element clau en la balança entre un estat fisiològic i un altre de patològic radica en la reacció de NO amb O₂ formant molècules oxidants molt potents (peroxinitrit).

Les molècules majoritàries de RNS (Fig.2) són (Dalle-Donne i col. 2005):

1. **òxid nítric (ON)**, s'han descrit tres isoformes diferents d'òxid nítric sintasa (ONS) catalitzadores de la síntesi d'ON: ONS neuronal (ONS_n, ONS-1), ONS induïble (ONS_i, ONS-2) i ONS endotelial (ONS_e, ONS-3) (Stuehr DJ. 1999). Les isoformes ONS_n i ONS_e produeixen quantitats relativament baixes d'ON si es compara amb la tercera ONS, ONS_i, que és la majoritària (Mikkelsen i col. 2003). Com a conseqüència del metabolisme de l'ON les cisteïnes de les proteïnes poden patir modificacions nitroses: l'ON pot formar adductes amb els grups -SH produint grups S-nitrosotols (Hogg N. 2002). ON reacciona amb les ROS i les converteix en derivats redox molt reactius que poden atacar a les proteïnes, als lípids i al DNA (Dalle-Donne i col. 2005).

2. **peroxinitrit (ONOO⁻)**, en condicions fisiològiques existeix en un equilibri ràpid i dinàmic amb el seu àcid conjugat peroxinitrós (ONOOH). Si es produeix un augment en la concentració d'ON en el teixit, s'inicia una competència entre aquesta molècula i l'enzim antioxidant SOD per tal d'eliminar l'O₂ i formar ONOO⁻. La reacció entre O₂ i l'ON es produeix tres cops més ràpidament que amb la superòxid dismutasa (Dalle-Donne i col. 2005).

3. **diòxid de nitrogen (·NO₂)**, aquest radical lliure és molt més reactiu que l'ON. A pH neutre el ONOO⁻ es troba, en part, protonat i aquesta forma protonada (ONOOH) es descomposa, majoritàriament, de manera ràpida a NO₃⁻ (molècula inofensiva) i també forma intermediaris altament reactius com el HO· i el ·NO₂ (Mikkelsen i col. 2003). Per altra banda, el ONOO⁻ reacciona amb el CO₂ per formar radicals carbonats (CO₃^{-·}) i ·NO₂ (Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield DA. 2006).

També s'agrupen com a RNS l'alquil peroxinitrit (ROONO), el triòxid de dinitrogen (N₂O₃), el tetraòxid de dinitrogen (N₂O₄), l'àcid nítrós (HNO₂), el catió nitrosil (NO⁺), l'anió nitrosil (NO⁻), el catió nitroni (NO⁺²).

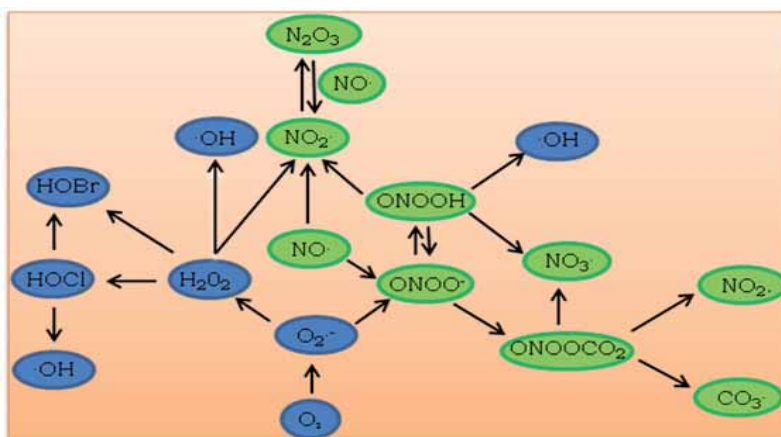


Fig. 2 Esquema representatiu de les diferents classes de ROS, RNS i la relació entre elles. Modificació dels diagrames de (Dalle-Donne i col. 2005, Mikkelsen i col. 2003).

1.2.3 Orgànuls generadors de radicals lliures

Els radicals lliures poden originar-se a partir de diferents fonts: tan poden formar-se a partir de factors medi ambientals, dietes, estils de vida com poden ser produïts per l'exposició a radiacions ionitzants o raigs ultraviolats, xocs tèrmics, metalls, pesticides, compostos orgànics tòxics persistents, partícules de l'aire,... (Limon-Pacheco i col. 2009) o poden crear-se *in vivo* en diferents orgànuls cel·lulars.

Pel que fa a aquest últim grup una d'elles, potser la font més important productora de ROS cel·lular, és el **mitocondri** durant la fosforilació oxidativa. Aquest procés es basa en que l'energia d'oxidoreducció de la cadena de transport electrònic del mitocondri, utilitzant el sistema enzimàtic NADH deshidrogenasa, es converteix en un enllaç altament energètic d'ATP. El flux d'electrons dels diferents substrats, a través de proteïnes transferidores d'electrons o per sistemes enzimàtics, resulta en la reducció de quatre electrons de l'oxigen molecular a l'H₂O catalitzada per la citocrom c oxidasa. En aquest procés es generen ROS com a subproductes de les reaccions de transferència d'electrons tals com l'O₂·, HO·, RO₂·, RO·, HO₂·, HOCl, HOBr, O₂ (Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield DA. 2006).

El **peroxisoma** conté un gran nombre d'oxidases que redueixen l'O₂ a H₂O₂, representant una important quantitat del H₂O₂ total de la cèl·lula (Wanders i col. 2006). La catalasa utilitza el H₂O₂ produït per diferents oxidases per oxidar diferents substrats com per exemple el fenol, l'àcid fòrmic, el formaldehid, l'alcohol,...

Un compartiment intracel·lular que juga un important paper en la biosíntesi cel·lular (proteïnes de transmembrana, lípids,...) és el **reticle endoplasmàtic** sent una font generadora de H₂O₂. El reticle endoplasmàtic llis conté diferents enzims necessaris per catalitzar drogues liposolubles i d'altres productes metabòlics

III. INTRODUCCIÓ

perjudicials. Els enzims de les famílies citocrom P450 i b5 estan implicats en la generació d'O₂⁻ i H₂O₂ evitant l'excés de metabòlits i de tòxics (Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield DA. 2006).

El **nucli** està separat del citoplasma per una membrana doble que conté citocrom oxidases i un sistema de transport d'electrons i pel que fa al **citoplasma**, es manté sota condicions reduïdes gràcies a la capacitat redox dels tiols intracel·lulars. Conté enzims solubles com la xantina oxidasa i la flavoproteïna deshidrogenasa que poden generar ROS per diferents reaccions, a més a més existeixen petites molècules com la dopamina, l'epinefrina,... que tenen la capacitat d'autooxidar-se passant a ser una important font de ROS intracel·lular.

Físicament la **membrana plasmàtica** separa el compartiment intracel·lular del medi extracel·lular, generant un potencial de transmembrana a través del qual es forma un pas de protons cap a fora de la membrana i d'electrons que es dirigeixen cap a ella. Aquesta barrera conté NADH oxidoreductases i NADPH oxidases que permeten controlar les bombes de protons, canals iònics, regular el pH,... i també presenta un complex redox (semblant al del mitocondri i al de l'aparell de Golgi) com és el coenzim Q (Skulachev VP. 1996).

1.2.4 Sistemes antioxidants

Halliwell va redefinir recentment el terme d'antioxidant com a "qualsevol substància que retardi, previngui o elimini el dany oxidatiu d'una molècula diana" (Halliwell B. 2007).

La gran diferència en la vida mitja dels oxidants, des dels nanosegons del HO· fins als segons del RO₂, ROONO o bé de l'ON, ajuda a fer una idea de la bateria tan diversa que existeix d'antioxidants (Sies H. 1993). Les cèl·lules del nostre organisme han desenvolupat diferents sistemes i mecanismes per combatre directament les ROS, reparar les lesions oxidatives i restaurar l'homeòstasi de la cèl·lula.

A. Sistemes enzimàtics

S'han descrit diferents sistemes enzimàtics antioxidants tals com la superòxid dismutasa, la catalasa, la glutatió peroxidasa, la tioredoxina i algunes xaperones moleculars que ajuden a prevenir la lesió oxidativa produïda per les ROS.

Les **superòxid dismutases** (SODs) formen una família d'enzims que catalitzen molt eficientment la reacció de dismutació de l'O₂⁻ obtenint oxigen i H₂O₂ com a resultat del procés (McCord i col. 1969, McCord i col. 2005), d'aquesta manera s'evita

la formació d'altres molècules oxidants molt potents com poden ser els peroxinitrits o els HO·. L'activitat d'aquests enzims necessita un metall de transició en el seu lloc actiu per tal de dur a terme el trencament catalític de l'anió superòxid (Culotta i col. 2006). Aquesta família està formada per tres tipus de SODs: la SOD-1/[Cu-Zn] (mutacions de la SOD-1 en un petit percentatge donen lloc a casos familiars d'ELA), la SOD-2/[Mn] i la SOD-3 (Fattman i col. 2001, Gao i col. 2008, Marklund SL. 1984).

Un altre sistema enzimàtic antioxidant és la **catalasa**, un enzim bifuncional on, per una banda, catalitza la degradació de dues molècules de H₂O₂ obtenint dues molècules d'H₂O i O₂ sense la producció de radicals lliures i, per altra banda, metabolitza una gran varietat de substrats tals com l'etanol, el metanol, fenols o nitrits (Oshino i col.1973). Aquest enzim es troba localitzat principalment en la matriu dels peroxisomes però també en el citosol i el nucli. Alguns grups han demostrat la seva presència en el mitocondri de certs òrgans tals com en el cor (Radi i col. 1991) o bé en el fetge (Salvi i col. 2007) protegint contra lesions produïdes per H₂O₂.

La **glutatió peroxidasa** (GPx) comprèn una família de múltiples enzims que catalitzen la reducció de H₂O₂ o hidroperòxids orgànics a H₂O o als corresponents alcohols, utilitzant el glutatió reduït com a donador d'electrons (Dringen R. 2000a, Dringen i col. 2000b).

Una altra família d'enzims amb acció antioxidant correspon a la de la **tioeredoxina** (Trx) que participa en diverses reaccions redox a través de l'oxidació reversible del centre actiu ditiol a disulfid de la Trx. Les proteïnes d'aquest grup comparteixen una seqüència semblant en el lloc actiu -Cys-Xxx-Yyy-Cys- formant-n'he part les Trxs però també la Trx reductasa i les peroxiredoxines (Prx) dependents de Trx. (Mustacich i col. 2000).

Les **Hsps** (heat shock proteins) són proteïnes altament conservades entre espècies que estan constitutivament expressades (representen del 5-10% de les proteïnes totals) en condicions normals. Són necessàries pel creixement i pel manteniment normal de la cèl·lula i protegeixen en situacions de lesions metabòliques i oxidants (Calabrese i col. 2002). Aquestes proteïnes s'activen en situacions de xoc tèrmic (d'aquí el nom de *Heat shock proteins*) però també en front d'alteracions de l'estat redox intracel·lular, exposició a metalls pesats, anàlegs d'aminoàcids, drogues citotòxiques, falta de glucosa, infecció per patògens i teixits lesionats on les xaperones es sobreexpressen. Una de les seves funcions és la de protegir les dianes de les proteïnes cobrint els seus llocs sensibles, en algunes situacions aquest mecanisme no és suficient i persisteix el dany on les xaperones segresten les proteïnes desnaturalitzades fins que són replegades o bé degradades (Papp i col. 2003). Aquests mecanismes estan connectats amb d'altres a través de diferents vies.

III. INTRODUCCIÓ

B. Sistemes no enzimàtics

Per altra banda hi ha d'altres sistemes no-enzimàtics, diferents proteïnes que poden actuar com antioxidants tals com la vitamina E, la vitamina C, la melatonina, la ceruloplasmina, la ferritina, la transferrina, els carotenoides, la bilirubina, l'àcid úric, els flavonoides.

La **vitamina E** és un terme genèric que fa referència a tots els tocoferols, i als seus derivats, que presenten una activitat biològica RRR- α -tocoferol. A la natura, s'han trobat 8 compostos amb aquesta activitat on el que té un efecte antioxidant més eficient és l' α -tocoferol (s'utilitza sovint el terme vitamina E com a sinònim) (Bruun-Jensen i col. 1994). Es pensa que la seva principal funció és protegir als lípids, especialment als PUFA (polyunsaturated fatty acids), en situacions d'estrès oxidatiu prevenint la propagació del dany dels radicals lliures en les membranes biològiques (Traber i col. 1996).

La **vitamina C** (L-àcid ascòrbic) és un dels antioxidants més importants solubles en aigua. La capacitat antioxidant de la vitamina C està relacionada amb la seva estructura única: en condicions fisiològiques de pH existeix com un anió monovalent (ascorbat) podent donar un electró per formar un radical ascorbil (Niki E. 1991, Rice ME. 2000). L'àcid ascòrbic protegeix també de la peroxidació que afecta a les membranes, potenciant l'activitat de l' α -tocoferol (Sies i col. 1995).

La **melatonina** és una hormona pineal que actua com a un potent antioxidant podent travessar fàcilment la barrera que separa el circuit sanguini del cervell i també els diferents compartiments cel·lulars. És capaç d'estimular els enzims antioxidants endògens cel·lulars (actuant com a un antioxidant indirecte) i funciona sinèrgicament amb d'altres (Pappolla i col. 2000).

La **ceruloplasmina** és una proteïna de la fracció α_2 -globulina del sèrum sanguini humà que transporta el 95% del coure a la sang. Actua com una ferroxidasa i protegeix als PUFA de les membranes dels glòbuls vermells de les formes actives dels ROS (Goldstein i col. 1979, Vassiliev i col. 2005). Per altra banda la ceruloplasmina pot controlar els nivells de ferro ferròs (Fe^{2+}) oxidant-lo per produir O_2 i H_2O evitant reaccions perilloses i reactives.

La **ferritina** és una proteïna que emmagatzema una gran quantitat d'àtoms de ferro (4000-4500 àtoms de Fe^{3+}) (Arosio i col. 2002). Al funcionar les ferritines com un magatzem de ferro, detoxifiquen jugant un paper central en l'administració biològica del ferro degut a la insolubilitat del ió fèrric (Fe^{3+}) lliure i a la seva alta toxicitat ja que participa en diverses reaccions ajudant a la formació de ROS molt reactius a través de la via de Fenton (Arosio i col. 2002, Orino i col. 2001, Riederer i col. 1989).

La **transferrina**, la seva principal funció és la del transport de ferro a les cèl·lules en proliferació i, amb els factors de creixement, ajuda també a reduir la concentració de ions Fe^{2+} lliure.

Els **carotenoides** són compostos naturals amb propietats lipofíliques, se n'han identificat més de 500 on el més important és el β -carotè. La majoria dels carotenoides tenen un extens sistema de dobles enllaços conjugats que proporciona l'activitat antioxidant amb capacitat d'inhibir diferents reaccions dels radicals lliures (Hsu i col. 2002, Sies i col. 1995).

La **bilirubina** contribueix en la prevenció de la lesió cel·lular provocada per ROS així com també per RNS. Presenta un grup format per diferents ions de metall que estan quelants en un anell de porfirina. Aquests ions de metalls quelants presenten una gran capacitat de canviar reversiblement l'estat d'oxidació (Fe^{2+} a Fe^{3+} o viceversa) atribuint al compost hemo un efecte molt eficient com a catalitzador biològic (Maines MD. 1988).

En els humans l'**àcid úric** s'excreta com a un producte final del metabolisme de la purina (Schlesinger i col. 2008), pot actuar com a un important antioxidant fisiològic oxidant-se i participant en la inhibició de la peroxidació lipídica (Ames i col. 1981, Davies i col. 1986).

Els **flavonoides** presenten una gran habilitat per dur a terme reaccions de reducció. Les propietats antioxidants dels flavonoides són importants en les dietes animals com a respostes inhibidores de diverses oxidases (per exemple, inhibint 12-lipoxigenasa que és un enzim responsable de l'oxidació dels àcids grassos) (Andersen i col. 2005, Bohm B. 1998).

1.3 CARACTERÍSTIQUES DEL CERVELL

El cervell representa el 2% del pes del cos, consumint el 20% de l'oxigen total corporal la qual cosa el fa un òrgan sensible a l'oxigen i particularment vulnerable a l'estrès oxidatiu (Acker i col. 2004, Adibhatla i col. 2009).

Les membranes biològiques són estructures dinàmiques que generalment estan formades per bicapes de molècules amfipàtiques (fosfolípids) que es mantenen juntes a través d'enllaços no-covalents. En les cèl·lules eucariotes, els lípids de membrana més abundants són els fosfolípids que es distribueixen asimètricament a través de la bicapa formant fines capes semipermeables que limiten totes les cèl·lules. L'estructura del fosfolípid es basa en una molècula de glicerol a la que se li uneixen dues cues d'àcids grassos (apolar o hidrofòbica) i un grup fosfat (polar o hidrofílica) (Fig. 3).

III.INTRODUCCIÓ

Pel que fa a les molècules d'àcids grassos, presenten dues regions característiques: un grup d'àcid carboxílic, ionitzat en solució (COO^-), extremadament hidrofílic i que reacciona fàcilment amb un grup hidroxil o un grup amino d'una altra molècula formant èsters i amides i, per altra banda, una llarga cadena hidrocarbonada hidrofòbica químicament no reactiva. Se n'uneixen dues, de cadenes hidrocarbonades, on una de les cues té un o més dobles enllaços *cis* (és a dir, insaturada) que

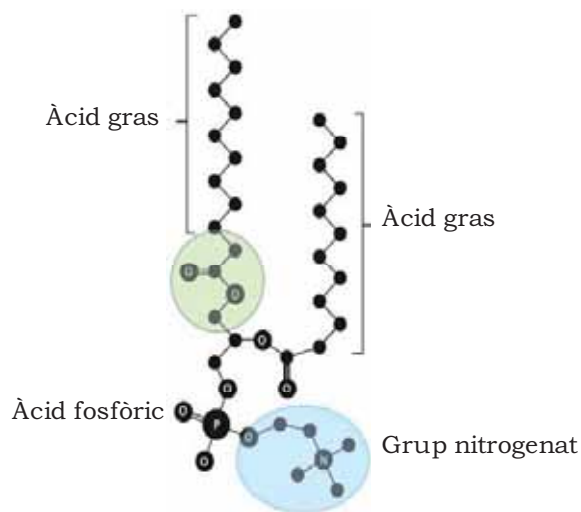


Fig. 3 Esquema d'un fosfolípid: un dels extrems de la molècula de glicerol està esterificat amb l'àcid fosfòric i l'altra part terminal està unida a àcids grassos saturats o monoinsaturats, on en la posició C2 està majoritàriament esterificat a un àcid gras poliinsaturat (Glomset JM. 2006).

que generen curvatura suau a la cadena i l'altra normalment no té dobles enllaços (és a dir, saturada) (Alberts B, Bray D, Lewis J. 1996). Així doncs les cadenes hidrocarbonades poden ser saturades, monosaturades o poliinsaturades variant de 14-22 en el nombre de carbonis. En les cèl·lules eucariotes, la mitjana de la longitud de la cadena de les membranes biològiques es manté sobre 18 àtoms de carboni i la distribució relativa entre àcids grassos saturats i insaturats segueix un ratio de 40:60, respectivament (Pamplona R. 2008). Les diferències de longitud i de grau de saturació entre les cues hidrocarbonades són importants perquè influeixen en la capacitat de les molècules de fosfolípids a l'hora d'empaquetar-se una amb l'altra i, per tant, alterant la fluïdesa de la membrana ja que els glicerolfosfolípids proporcionen estabilitat, fluïdesa i permeabilitat a les membranes neuronals (Alberts B, Bray D, Lewis J. 1996). Per altra banda la molècula de fosfat dels fosfolípids, s'uneix a través d'un enllaç fosfodièster a un grup d'àtoms que normalment contenen nitrogen.

S'han trobat quatre classes de glicerolfosfolípids en les membranes neuronals: els tres primers tipus (1,2-diacil glicerolfosfolípid, 1-alk-1'-enil-2-acil glicerolfosfolípid o plasmalogen i 1-alquil-2-acil glicerolfosfolípid) tenen una estructura de glicerol amb un àcid gras, normalment insaturat, en el C2 i una base de fosfat en el C3 del glicerol unida a una molècula nitrogenada (colina, etanolamina, serina o inositol). El quart grup, esfingomielina, conté ceramida unida a una molècula de fosfocolina a través del

seu grup hidroxil primari (Farooqui i col. 2000, Van Meer i col. 2008). La gran varietat de caps i cadenes alifàtiques permeten l'existència de més de 100 espècies diferents de fosfolípids en les cèl·lules eucariotes: la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol i cardiolípidina així com l'esfingomielina i els glicoesfingolípid són els fosfolípids més importants en els teixits de mamífers (Pamplona R. 2008). En les membranes neurals la distribució de fosfolípids és normalment asimètrica on el glicerolfosfolípid etanolamina i la fosfatidilserina es troben concentrats en la cara interna de la bicapa lipídica i el glicerolfosfolípid colina i l'esfingomielina estan en la cara externa de la bicapa (Farooqui i col. 2000).

Després del teixit adipós, el cervell humà és el segon òrgan que conté més àcids grassos (Bourre JM. 2006). Els lípids constitueixen d'un 50-60% del pes sec d'un cervell adult, on un 35% aproximadament el formen els PUFA de cadena llarga LCPUFA (long-chain polyunsaturated fatty acids) com per exemple l'àcid araquidònic (20:4n-6; AA) i l'àcid docosahexanoic (22:6n-3; DHA) sent àcids grassos essencials (Floyd RA. 1999, Wallis i col. 2002). Aquests LCPUFA són derivats de la biosíntesi dels seus àcids grassos precursors com l'àcid linoleic (18:2n-6; AL) i α -àcid linolenic (18 : 3n-3; ALN) respectivament (Fig. 4), però també es poden obtenir directament de la dieta com per exemple dels ous, el peix o la carn (Brenna i col. 2007, Wainwright PE. 2002). Aquests àcids grassos no s'emmagatzemen ni produeixen energia sinó que participen en l'arquitectura de les membranes cel·lulars. Els PUFA, i els seus derivats, són també coneguts com a àcids grassos omega-6 (ω -6) i omega-3 (ω -3) (Youdim i col. 2000). L'abreviatura de ω -6 i ω -3 dels àcids grassos insaturats indica la posició del primer doble enllaç quan es conta des del carboni metil més distal del final de la cadena d'àcids grassos. Una deficiència simultània d'AL i d'ALN és incompatible amb la vida (Bourre JM. 2006).

Les lipoproteïnes del plasma, formades pel fetge, transporten el DHA ω -3 pel torrent sanguini on algunes molècules travessen la barrera hematoencefàlica (BHE) i s'esterifiquen (Glomset JM. 2006). Aquesta barrera està constituïda per cèl·lules endotelials especialitzades que recobreixen el sistema vascular cerebral i tenen una gran importància en el manteniment de l'homeòstasi de les neurones, de les cèl·lules glials i en el bloqueig de l'accés de substàncies tòxiques endògenes o exògenes. Aquestes cèl·lules endotelials cerebrals conformen una barrera cel·lular entre la sang i l'espai intersticial que permet mantenir estable la composició del líquid intersticial indispensable pel bon funcionament neuronal. La BHE juga un important paper en el control de pas dels PUFA i també en la conversió dels AL i ALN a AA i DHA,

III.INTRODUCCIÓ

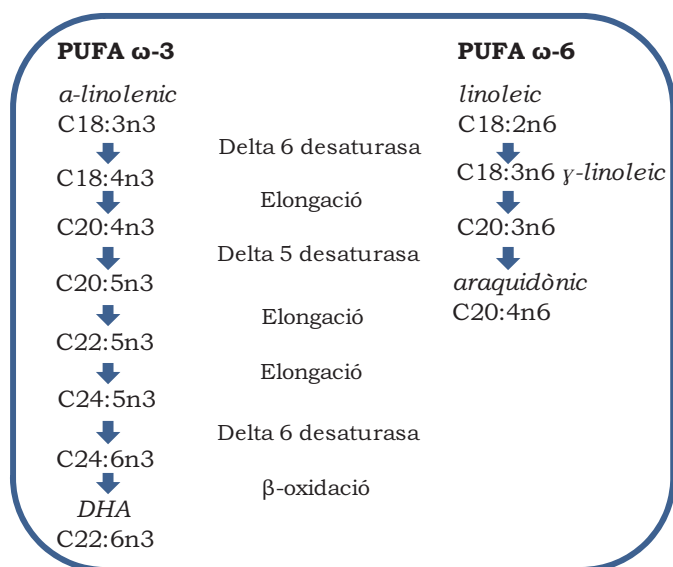


Fig. 4 Metabolisme dels PUFA ω-3 i ω-6 a partir dels seus precursors α-linolenic i linoleic respectivament.

respectivament; sent les cèl·lules endotelials dels vasos petits del cervell riques en AA i DHA. Determinats estudis *in vitro* han revelat que les cèl·lules endotelials dels capil·lars de cervell co-cultivades amb astròcits, en un model de BHE, presenten una composició dels àcids grassos marcadament diferent si es compara amb cèl·lules endotelials no co-cultivades amb astròcits: es va observar un augment d'AA a partir del seu precursor AL, i

modificacions semblants en el cas del DHA a partir del seu precursor (Benistant i col. 1995, Bernoud i col. 1998).

Les membranes cel·lulars presenten una especial susceptibilitat a l'atac produït per ROS deguda a dues característiques inherents: per una banda les propietats físicoquímiques de la bicapa de la membrana, és a dir, l'oxigen i les ROS són més solubles en el fluid de la bicapa lipídica que en el medi aquós per tant les membranes tenen un interior orgànic on l'oxigen té tendència a acumular-se. Les regions orgàniques podrien tenir més ROS que les regions aquoses fent que les membranes lipídiques esdevinguin importants dianes de la lesió oxidativa. La segona propietat està relacionada amb la reactivitat química dels àcids grassos que componen la membrana, en el fet que no tots els residus de PUFA són susceptibles de la mateixa manera a l'oxidació: determinats poliinsaturats i la presència de grups metilè entre dos dobles enllaços són factors que influeixen en la susceptibilitat dels àcids grassos en front de les ROS (Pamplona R. 2008). Aquesta sensibilitat a l'oxidació incrementa exponencialment en funció del nombre de dobles enllaços per molècula d'àcid gras (Fig. 5).

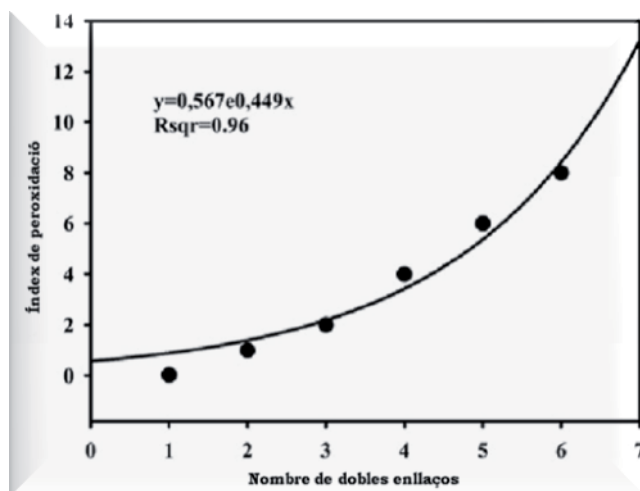


Fig. 5 Susceptibilitat relativa dels PUFA a la peroxidació lipídica en funció del nombre de dobles enllaços. Modificat de (Pamplona R. 2008) però l'original és d'Holman RT (1954).

Les espècies moleculars de fosfoglicèrids que contenen DHA ω -3 esterificat es troben acumulades en la substància gris dels cervells, per altra banda el plasmalogen representa del 80-90% de la classe de glicerofosfolípid etanolamina en la substància blanca i en la mielina i forma part del 50% dels diferents tipus de lípids de tot el cervell (Farooqui i col. 2000).

1.4 OXIDACIÓ PROTEÏCA

Diverses evidències demostren que els ROS i els RNS poden produir modificacions a tota classe de macromolècules tals com a les proteïnes, als lípids, als glúcids i també als àcids nucleics (DNA i RNA)(Stadtman i col. 2003).

Les proteïnes són les dianes més importants dels radicals lliures ja que són els components majoritaris dels sistemes biològics amb una gran rellevància funcional. S'ha estimat que d'un 50-75% dels radicals reactius reaccionen amb les proteïnes i que algunes tenen una vida mitja llarga suggerint que els residus modificats de les proteïnes poden ser considerats com un dels marcadors majoritaris, sensibles de lesió oxidativa en les cèl·lules de mamífers (Dean i col. 1997).

Les espècies reactives poden reaccionar directament amb les proteïnes o bé poden reaccionar amb d'altres molècules com els carbohidrats i els lípids generant productes anomenats RCS (reactive carbonyl species) que poden unir-se a les proteïnes. La carbonilació de proteïnes és una modificació irreversible i irreparable que consisteix en la introducció de derivats carbonílics (aldehids i cetones) en residus nucleofílics dels diferents aminoàcids (Aldini i col. 2007).

III.INTRODUCCIÓ

Les proteïnes poden oxidar-se per diferents vies:

- la lesió oxidativa de les proteïnes pot provenir de l'oxidació directa dels aminoàcids per ROS, RNS i clorurs catalitzada per metalls, generant productes com els semialdehids α -glutàmic (GSA, producte d'oxidació de l'arginina -Arg- i de la prolina -Pro-) i α -aminoadípica (AASA, producte d'oxidació de la Cys) (Requena i col. 2001).
- a través del trencament d'unions peptídiques per vies d' α -amidació (Berlett i col. 1997, Dean i col. 1997).
- les espècies reactives carboníliques produïdes durant la peroxidació lipídica (principalment aldehids α - β insaturats) poden afegir-se a les proteïnes en els residus de Cys, histidina -His- i lisina -Lys- a través de reaccions secundàries. D'aquesta manera es formen els ALEs (advanced lipoxidation end products) (Adibhatla i col. 2009).
- els grups carbonils, generats com a conseqüència de la reacció de residus de sucre en processos de glicació, s'introdueixen en les proteïnes a través de reaccions secundàries d'oxidació amb els residus nucleofílics de determinats aminoàcids generant-se els AGEs (advanced glycation end products) (Thorpe i col. 2003).

Els adductes que provenen de la lipoxidació (ALEs) o bé de la glicoxidació (AGEs) es poden detectar amb anticossos específics que permeten la identificació de les proteïnes modificades. També es pot utilitzar l'anticòs de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que reconeix els grups carbonils associats als aldehids i a les cetones.

1.4.1 Peroxidació lipídica

Una de les conseqüències més importants de la lesió produïda en un teixit pels radicals lliures és la peroxidació lipídica: els radicals lliures, gràcies a la seva estructura i reactivitat (veure apartat 1.1 i 1.2), poden treure un electró d'una molècula d'àcid gras insaturat generant una cadena de reaccions que permeten la formació d'espècies reactives (Forman i col. 2008, Pamplona R. 2008, Spiteller G. 2006).

Les cadenes de PUFA (2 o més dobles enllaços) són molt més fàcils d'atacar pels radicals que les cadenes saturades (sense dobles enllaços) o monosaturades (un doble enllaç) (Fig. 6). Per exemple el DHA, un PUFA ω -3 amb 6 dobles enllaços, és extremadament susceptible a una lesió oxidativa i té 8 cops més tendència a ser atacat que l'AL que només té 2 dobles enllaços.

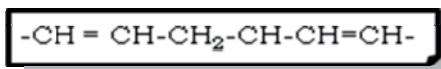


Fig. 6 Els PUFA presenten un o més grup -CH₂ entre dobles enllaços que els hi aporten una major susceptibilitat a ser dianes de la peroxidació lipídica.

Aquest fet ve donat perquè els radicals lliures reactius poden treure àtoms d'hidrogen (un àtom d'hidrogen té només un únic electró que es pot eliminar fàcilment amb una baixa quantitat d'energia que pot provenir de la llum ultraviolada o de la presència de ions metàl·lics com el ferro) de les cadenes de PUFA on aquest hidrogen està unit a un

carboni de la cadena d'àcids grassos per un enllaç covalent, per tant aquest carboni passa a tenir un electró desaparellat sent ara un radical lliure. Aquest procés s'anomena *peroxidació lipídica* i es divideix en diferents passos (Horton i col. 1987, Spiteller G. 2006): **iniciació** (extracció d'un hidrogen del grup -CH₂, activat pel doble enllaç, dels PUFA generant una molècula reactiva), **propagació** (aquest procés es repeteix i es genera una reacció en cadena) i **acabament** (consta de l'eliminació dels radicals lliures acabant així la reacció en cadena). La peroxidació lipídica genera hidroperòxids, com per exemple, endoperòxids els quals es fragmenten per produir una gran varietat d'intermediaris reactius que tenen de 3 a 9 carbonis (Fig. 7) (Horton i col. 1987).

Comparant amb els ROS i els RNS, els aldehids reactius tenen una vida mitja molt més llarga (per exemple, de minuts a hores comparant amb microsegons a nanosegons

per la majoria de radicals lliures). Aquestes estructures poden migrar amb relativa facilitat a través de membranes hidrofòbiques i de medis hidrofílics, extenent-se lluny del seu lloc de producció. En base a aquesta característica, els compostos carbonils poden ser més destructius que els ROS i els RNS. Aquests aldehids poden reaccionar amb proteïnes cel·lulars i tissulars per formar adductes que produeixen disfunció proteïca i alteració de determinades respostes cel·lulars

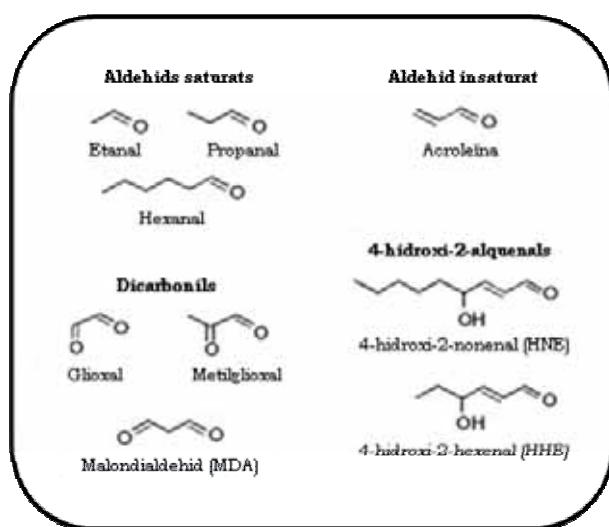


Fig. 7 Diferents classes de molècules reactives produïdes en el procés de la peroxidació lipídica (Negre-Salvayre i col. 2008).

III.INTRODUCCIÓ

(Petersen i col. 2004, Zarkovic K. 2003). L'augment de la peroxidació lipídica modifica la permeabilitat de la membrana així com l'oxidació de proteïnes estructuralment importants, portant aquesta situació a una alteració transmembranal dels ions i dels processos cel·lulars metabòlics (Youdim i col. 2000).

Així doncs les reaccions de lipoxidació comporten canvis estructurals i funcionals en les proteïnes tals com (Pamplona R. 2008):

- alteracions de les propietats fisicoquímiques (canvis de conformació, hidrofobicitat, elasticitat, solubilitat, mobilitat electroforètica,...)
- formació d'unions intra i intermoleculares i també d'agregats
- disminució o inhibició de l'activitat enzimàtica
- alteracions en la degradació proteïca
- alteracions en el tràfic de proteïnes
- modificació de les propietats de la matriu extracel·lular

1.4.2 Adductes de lipoxidació (ALEs)

En base a les seves característiques estructurals els aldehids de cadena curta més reactius, que s'han generat en la peroxidació lipídica, es poden classificar en diferents famílies (Fig. 7) on les més importants són: el grup dels dicarbonils (on principalment s'inclou el malondialdehid -MDA- i el carboximetil-lisina -CML-) i els 4-hidroxi-2-alquenals (l'ALE més representatiu és el 4-hidroxi-trans-2-nonenal -HNE-) (Negre-Salvayre i col. 2008).

Dicarbonils

Pel que fa al MDA, és un dels aldehids més abundant que es forma a partir de la peroxidació lipídica de l'àcid araquidònic, eicosapentanoic o del DHA (Aldini i col. 2007). És molt abundant i es pot unir covalentment a les proteïnes, formant adductes amb els residus de Lys o bé amb les amines que es troben en els caps polars dels fosfolípids, així com la fosfatidilserina o la fosfatidiletanolamina (Uchida K. 2003b). La Lys i l'Arg són els únics aminoàcids que reaccionen amb el MDA sent la Lys (MDA-L) el marcador més sensible pel que fa als canvis en els PUFA. En diferents malalties neurodegeneratives s'han trobat alteracions dels nivells de MDA en les mostres patològiques comparant amb les controls. En el cas de la MA s'han publicat estudis post mortem que han demostrat nivells augmentats de MDA en diferents regions com

per exemple en l'hipocamp i l'amígdala (Lovell i col. 1995), el lòbul temporal, el frontal i l'occipital (Dib i col. 2002).

El CML és un producte de la glicoxidació però més tard també es va descriure per ser un derivat de les reaccions de peroxidació lipídica dels PUFA (Fu i col. 1996) trobant-se augmentat en l'envelliment, en mostres humanes de MA (Pamplona i col. 2005), en l'arterosclerosi i en la diabetes (Ahmed i col. 2009, Basta i col. 2009, Fu i col. 1996).

4-hidroxi-2-alquenals

Els *4-hidroxi-2-alquenals* representen els aldehids específics de la peroxidació lipídica més destacats. L'HNE és conegut per ser un dels aldehids α,β -insaturats més importants produïts durant la peroxidació dels PUFA n-6 (Fig. 8). L'HNE reacciona amb els residus de proteïnes en el següent ordre de reactivitat: Cys >> His > Lys (Doorn i col. 2002), en el cas de la Cys l'HNE es conjuga amb el grup tiol d'aquest aminoàcid sent una diana dels aldehids lipídics en processos de senyalització biològica. L'HNE és relativament estable i pot difondre entre els diferents compartiments subcel·lulars, lluny del lloc on s'ha format, on es relaciona amb diferents proteïnes cel·lulars i propaga el dany oxidatiu com a "segon missatger tòxic" (Petersen i col. 2004). Les modificacions covalents d'aquests residus provoquen la inactivació de diversos enzims tals com la glucosa-6-fosfat dehidrogenasa, la glicerat-3-fosfat-dehidrogenasa, la glutatió S-transferasa, glutatió reductasa, la interleucina 1B, l'aldolasa reductasa,... ("enzims susceptibles a la inactivació per la unió d'HNE") (Uchida K. 2003b). D'altres efectes cel·lulars adversos que s'han descrit, després de l'exposició a l'HNE, inclouen la inhibició del creixement, alteracions en el nivell de glutatió, inhibició de la síntesi proteïca, inhibició del segrest de calci per part dels microsomes,... S'ha observat que l'HNE afegit exògenament a les cèl·lules o generat endògenament en aquestes, s'uneix a les proteïnes i pot afectar a la funcionalitat.

El disseny d'anticossos específics, contra l'HNE unit a la proteïna, ha permès obtenir evidències molt clares de la incidència d'estrès oxidatiu *in vivo*. Utilitzant, en immunohistoquímica, anticossos policlonals es va demostrar per primer cop la presència de proteïnes modificades per HNE en un model d'estrès oxidatiu *in vivo* de rata de carcinogènesi renal, induït per nitrilotriacetat fèrric (Toyokuni i col. 1994).

S'ha vist que, utilitzant el Fe^{2+} o bé el pèptid β -amiloide com a tractament en cultius

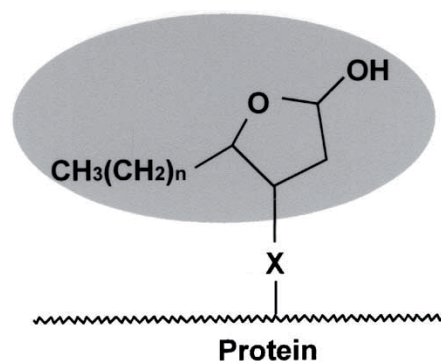


Fig. 8 Estructura de l'HNE unida al residu (X) d'una proteïna (Uchida K. 2003b).

III.INTRODUCCIÓ

cel·lulars de neurones i sinaptosomes, hi ha un gran increment en l'HNE lliure i en l'unit a proteïnes. En cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y es va trobar un augment en la producció intracel·lular de ROS, induït per les prostaglandines classe J₂, acompanyat per l'acumulació de productes de peroxidació lipídica com l'HNE i l'acroleïna (Kondo i col. 2001). En cultius cel·lulars d'hepatòcits de rates RL34 es va trobar que l'HNE pot induir una forta producció intracel·lular de ROS, trobant-se aquest mateix efecte en d'altres tipus cel·lulars tals com les abans comentades SH-SY5Y (Uchida i col. 1999).

1.4.3 Glicoxidació

Les reaccions no-enzimàtiques dels carbohidrats amb les proteïnes han estat un interessant tema durant diverses dècades pel que fa a la bioquímica del menjar i de la nutrició. La dieta és una de les principals fonts externes d'AGEs, sobretot en menjar cuinat amb elevats nivells de carbohidrats, proteïnes i àcids grassos. La formació dels AGEs està potenciada per l'exposició a la calor, incrementant el seu contingut amb la temperatura de cocció i la seva durada (Miyata i col. 1999, Vlassara i col. 2003). El concepte del producte de glicoxidació va ser originàriament introduït per caracteritzar el resultat de les reaccions seqüencials de glicació i d'oxidació (d'aquí el terme *glicoxidació*): aquesta formació està considerada com el resultat de reaccions químiques de segon ordre amb un índex depenent de la concentració de carbohidrats precursors ([CHO], estrès glicatiu "glycative stress") i de ROS ([O₂], estrès oxidatiu) (Miyata i col. 1999, Thorpe i col. 2003).

Hi han múltiples vies per formar AGEs a partir de carbohidrats però, breument, els passos generals de la reacció de Maillard, descrita *in vivo*, es poden resumir: en la primera etapa es forma una base de Schiff i adductes d'Amadori entre els residus dels carbohidrats i els grups amino lliures de la proteïna. L'adducte d'Amadori pateix reorganitzacions no-oxidatives i reaccions d'hidròlisi on en el pas següent, en presència d'ions de metalls de transició, es formen els productes reactius intermediaris. En la segona etapa de la reacció s'uneix el compost carbonil al residu de les proteïna (Lys, Arg,...) formant un ampli ventall d'AGEs (Thorpe i col. 2003).

1.4.4 Adductes de glicoxidació (AGEs)

El grup dels AGEs està format per una important sèrie de molècules reactives (Monnier VM. 2003, Thorpe i col. 2003) . El CML n'és un d'ells, tot i que s'ha comentat que també pot provenir de la peroxidació lipídica, formant-se a partir de diferents classes de carbohidrats, el CEL (carboxietil-lisina) és un altre AGE que prové de la triosa fosfat,...

1.5 TEIXIT HUMÀ POST MORTEM

Els estudis de les malalties neurodegeneratives prenen encara més importància si es poden realitzar en mostres de cervell humà post mortem que en models animals o en experiments *in vitro*. El fet de treballar amb teixit cerebral humà té molts avantatges: s'analitza directament el substrat real de les diferents malalties del sistema nerviós, però també s'han de tenir en compte certs factors que poden alterar el teixit i, conseqüentment, els resultats i les conclusions que se n'obtinguin.

Així doncs hi ha diferents elements que poden interferir (degradant o modificant) en la preservació del DNA, el RNA, les proteïnes i els lípids. Es poden dividir en dos grups en funció de si es donen abans o després de la mort de l'individu:

- *pre mortem*, durada de l'estat agònic, hipòxia o acidosis (podent alterar el pH del teixit), febre, drogues, substàncies tòxiques.
- *post mortem*, el temps que transcorre entre la mort, el processament de la mostra i la seva congelació, un altre factor a tenir en compte és la temperatura del cos, les característiques de les solucions de fixació i del material de congelació.

S'han fet estudis de degradació post mortem per tal de caracteritzar determinades proteïnes (Siewi col. 2004, Wu i col. 2002), observant que són sensibles però de diferent manera i que la temperatura és un factor important a tenir en compte (Ferrer i col. 2007a). Pel que fa al DNA i al RNA, s'han publicat diversos estudis relacionats amb la seva preservació (Ervin i col. 2007, Ferrer i col. 2007b). Ara bé, degut a l'increment cada cop més evident d'estudis relacionats amb l'estrès oxidatiu (utilitzant marcadors de lipoxidació, glicoxidació,...) i, per altra banda, de factors epigenètics (metilació i acetilació de cues d'histones, metilació de gens promotors,...) es fa patent una caracterització d'aquests aspectes en mostres post mortem humanes.

1.6 ENVELLIMENT

L'envelliment és un procés natural que comporta una progressiva davallada de les funcions biològiques, després que l'organisme hagi arribat al seu màxim en la competència reproductiva. Es considera un deteriorament progressiu, funcional i dependent del temps, que condueix cap a la mortalitat (Farooqui i col. 2009). S'han formulat diverses teories per explicar l'envelliment però el mecanismes biològics encara no estan ben establerts.

Com s'ha comentat anteriorment, l'estrès oxidatiu fa referència a conseqüències citotòxiques produïdes per diferents espècies reactives. La lesió oxidativa implica a

III.INTRODUCCIÓ

una sèrie de malalties, tenint un impacte important en el procés d'envelliment del cos.

Les cèl·lules del sistema nerviós estan afectades per l'envelliment (Beckman i col. 1998, Rikans i col. 1997), com les cèl·lules d'altres òrgans, i pateixen un augment en la quantitat de lesions oxidatives de les proteïnes, els lípids i els àcids nucleics (Stadtman ER. 2006) tant com alteracions en l'homeòstasi energètica. En aquest procés de deteriorament, els astròcits generen una gran quantitat d'ON que resulta ser molt perjudicial per les neurones veïnes i pels oligodendròcits. El mecanisme molecular exacte que involucra la lesió neuronal per l'ON encara no es coneix. En models murins d'envelliment (SAMP8) s'observen modificacions carboníliques associades amb l'edat (Nabeshi i col. 2006) i també disminució de l'activitat de la SOD (Alvarez-Garcia i col. 2006). Aquests canvis, que es donen durant l'envelliment normal, es troben accentuats en poblacions de neurones vulnerables en diferents malalties neurodegeneratives (Farooqui i col. 2009, Lowe J. 2003, Mattson i col. 2006).

2. Malalties neurodegeneratives

En les últimes dècades ha augmentat l'atenció de la comunitat científica en el camp de les malalties neurodegeneratives, en general, ja que aquestes tenen un important impacte tant a nivell individual (per exemple, dels propis pacients i de les persones que les cuiden) com de la societat (Lowe J. 2003). Degut al gran increment d'individus als que se'ls hi diagnostica demència, la societat exigeix una major atenció a nivell social i de salut. La prevenció podria ser una oportunitat per disminuir la càrrega d'una sèrie de malalties tan devastadores com costoses (Fratiglioni i col. 2009).

Les malalties neurodegeneratives es caracteritzen per una disfunció progressiva i una pèrdua selectiva de poblacions de neurones i sinapsis en àrees concretes del sistema nerviós (cervell i medul·la espinal), determinant d'aquesta manera la seva clínica (alteracions cognitives, desordres motors o ambdues característiques). Un individu adult presenta una limitada capacitat neurogènica del sistema nerviós, per tant la mort cel·lular neuronal marca una irreversible i catastròfica fase en el procés neurodegeneratiu.

La neurodegeneració està considerada multifactorial, provocada per diferents possibles elements: causes genètiques, medi ambientals, factors endògens relacionats amb l'envelliment, defectes en la degradació proteica per errors en el sistema ubiquitina-proteasoma-autofàgia, formació de radicals lliures donant lloc a situacions d'estrès oxidatiu, alteracions bioenergètiques per la disfuncionalitat del mitocondri,

III.INTRODUCCIÓ

transtorns en l'aparell de Golgi neuronal i en el seu transport, mutacions de les xaperones moleculars, disfunció de les neurotrofines, processos neuroinflamatoris (Forman i col. 2004, Jellinger KA. 2009, Skovronsky i col. 2006). Tots aquests mecanismes estan interrelacionats entre ells formant un cercle viciós que pot comportar la disfunció i la mort cel·lulars però queden pendents d'aclarir les diferents vies moleculars i els seus papers patogènics (Jellinger KA. 2009).

Les diverses classes de malalties neurodegeneratives comparteixen la característica de presentar agregats i dipòsits (extra o intracel·lulars) de proteïnes anormals i/o mal plegades que respresenten els marcadors de les diferents patologies neurodegeneratives, anomenades *proteinopaties* (Fig. 9) (Jellinger KA. 2009).

Malaltia neurodegenerativa	Dipòsits proteïcs	Proteïna tòxica	Població cel·lular afectada	Regió afectada
Alzheimer	Plaques extracel·lulars	β -amiloide	Neurones	Escorça entorinal, hipocamp, amígdala i progressió cap al neocòrtex
	CN intracel·lulars	Tau		
Paràlisi supranuclear progressiva	CN intracel·lulars	Tau	Neurones, astròcits, oligodendròcits	Nuclis subtalàmics, escorça frontal
Pick	Cossos de Pick	Tau	Neurones	Hipocamp, escorça frontal
Degeneració corticobasal	CN	Tau	Neurones, glia	Escorça cerebral, tronc cerebral
Grans argiròfils	Grans argiròfils	Tau	Neurones, glia	Escorça entorinal, hipocamp, amígdala, pot estar afectat l'escorçatemporal
Demència frontotemporal lligada al cr 17 deguda a mutacions de la tau	CN intracel·lulars	Tau	Neurones, glia	Escorça frontal i temporal
Demència frontotemporal Tau-, UB +	Intracel·lulars d'ubiquitina	Ubiquitina	Neurones	Escorça frontal i temporal
Esclerosi lateral amiotròfica	Cossos de Bunina	Citratina C	Neurones	Medulla espinal, escorça motora
	SLIt	Ubiquitina		
Parkinson	Cossos de Lewy	α -sinucleïna	Neurones	Substància negra, locus ceruleus, nuclis del Rafe, pot estar afectada l'escorça frontal
Demència amb cossos de Lewy	Cossos de Lewy	α -sinucleïna	Neurones	Tronc cerebral, escorça cerebral
Atrofia multisistèmica	Cossos de Lewy	α -sinucleïna	Neurones, oligodendròcits	Cerebel, estriat
Huntington	Inclusions nuclears i citoplasmàtiques	Proteïnes que contenen poliglutamina	Neurona	Escorça frontal, estriat, locus ceruleus

Fig.9 Relació de malalties neurodegeneratives en funció de les inclusions. *CN: cabdell neurofibril·lar.

III.INTRODUCCIÓ

El plegament de les proteïnes és una part del procés normal de la síntesi proteïca, indispensable per convertir-les en molècules fisiològicament funcionals i per regular la seva activitat biològica gràcies a l'acció de les xaperones moleculars (Muchowski i col. 2005). La manera que una cadena d'aminoàcids sintetitzada *di novo* es transforma en una proteïna perfectament plegada depèn, en primer lloc, de les propietats intrínseques de la seqüència d'aminoàcids (patró de residus hidrofòbics i polars) i de la influència de l'entorn cel·lular (Dobson CM. 2003). Així doncs, en situacions fisiològiques les cèl·lules mantenen un equilibri entre el plegament, el replegament i la degradació de les proteïnes però un trencament d'aquest equilibri, per un excés de producció proteïca o una disminució de la degradació de les proteïnes anormals, dóna lloc a una situació d'*estrès proteolític* que comporta l'acumulació i l'agregació de proteïnes anormals. Les cèl·lules neuronals són particularment susceptibles als efectes tòxics de les proteïnes mutants o mal plegades (Taylor i col. 2002). Les condicions metabòliques extremes, per un elevat ús d'oxigen i també per un increment en la producció de neurotransmissors, les fa especialment vulnerables a les alteracions relacionades amb l'agregació (Dohm i col. 2008).

La progressiva acumulació de proteïnes intracel·lulars pot donar lloc a: a) síntesi anormal i mal plegament proteïc, b) interacció anormal amb d'altres proteïnes, c) sobreproducció de proteïnes constitutives, d) alteracions en els processos de degradació i de recanvi, e) afectacions en les modificacions post-translacionals de proteïnes sintetitzades *di novo*, f) expressió incorrecta o alteració en l'*splicing* (procés de tall i empalmament), g) activitat insuficient de les xaperones moleculars, h) alteracions en el transport de proteïnes podent arribar a la mort cel·lular de les cèl·lules afectades (Jellinger KA. 2009).

La inherent tendència de les proteïnes a agregar-se ha implicat un desenvolupament forçat dels sistemes de defensa cel·lulars contra les proteïnes anormals (Ross i col. 2005). Així doncs hi ha diversos sistemes per tal de corregir i detectar les proteïnes mal plegades:

- el reticle endoplasmàtic respon davant de proteïnes mal plegades a través de la inducció de xaperones moleculars, podent replegar les proteïnes anormals i transformar-les en no-tòxiques (Jellinger KA. 2009).
- el proteasoma és un complex molecular que pot desplegar proteïnes i processar-les en petits fragments gràcies a la presència d'enzims proteolítics en el seu interior.
- l'autofàgia presenta diferents variants com la macroautofàgia, la microautofàgia i l'autofàgia via xaperones. Les proteïnes citoplasmàtiques solubles, especialment aquelles que tenen un recanvi lent, poden ser degradades per aquestes vies

lisosomals. Aquesta via pot ser activada per estrès oxidatiu o per estrès de nutrients.

- en el moment que les proteïnes anormals i agregades no poden ser replegades o degradades, es presenta una altra alternativa: les cèl·lules poden segrestar els agregats a través del transport dels microtúbuls reunint-los a prop del centríol en el citoplasma. Aquest procés, genera un gran cos d'inclusió visible al microscopi, anomenat *agresoma*. Després de que les proteïnes mal plegades estan acumulades en un agresoma, aleshores estan a punt per la macroautofàgia: la cèl·lula pot raptar una gran porció del seu citoplasma i empaquetar-lo en una estructura unida a la membrana (autofagosoma) que més tard pot ser processada per la cèl·lula (Ross i col. 2004). La macroautofàgia pot eliminar agresomes en cultiu cel·lular.

En general, l'agregació es considera un procés de molts passos que comença quan una proteïna (monòmer) adopta una conformació anormal i hi ha una associació de dues o més proteïnes anormals, o part d'elles, formant dímers i intermediaris oligomèrics. Aquests poden donar lloc a estructures de β -làmina plegada inestables que contenen oligòmers amb una morfologia semblant a les fibrilles. Aquestes estructures fibrillars donen lloc als cossos d'inclusió que tenen tendència a ser altament resistent a la proteòlisi (Fig. 10) (Dohm i col. 2008, Ross i col. 2005). La majoria de les espècies intermèdies són inestables i han estat caracteritzades *in vitro* en funció de les seves unions a determinats colorants i a les seves propietats biofísiques.

Encara que els cossos d'inclusió proteïcs estan normalment associats a característiques patològiques en les malalties neurodegeneratives, hi ha una gran controvèrsia sobre el paper de l'agregació durant la progressió de la malaltia (Bretteville i col. 2008). Diverses evidències associen l'agregació amb la toxicitat però per altra banda hi han altres estudis que indiquen que les proteïnes agregades poden exercir un paper neuroprotector com a una resposta fisiològica a un excés de proteïnes mal plegades (Ross i col. 2005, Taylor i col. 2002). Actualment s'ha proposat que les espècies primerenques en el procés d'agregació són més tòxiques que els cossos d'inclusió o els agregats grans (Ross i col. 2005). Seguint aquesta línia, la mort cel·lular neuronal podria estar principalment produïda per la presència d'intermediaris tòxics oligomèrics mentre que els agregats insolubles visibles, típicament observats en els autòpsies, apareixerien per ser el resultat de processos de detoxificació cel·lular on el sistema UPS ha fallat i les proteïnes són segrestades i compartimentades en inclusions, com els agresomes, amb la finalitat de neuroprotegir (Dohm i col. 2008).

III.INTRODUCCIÓ

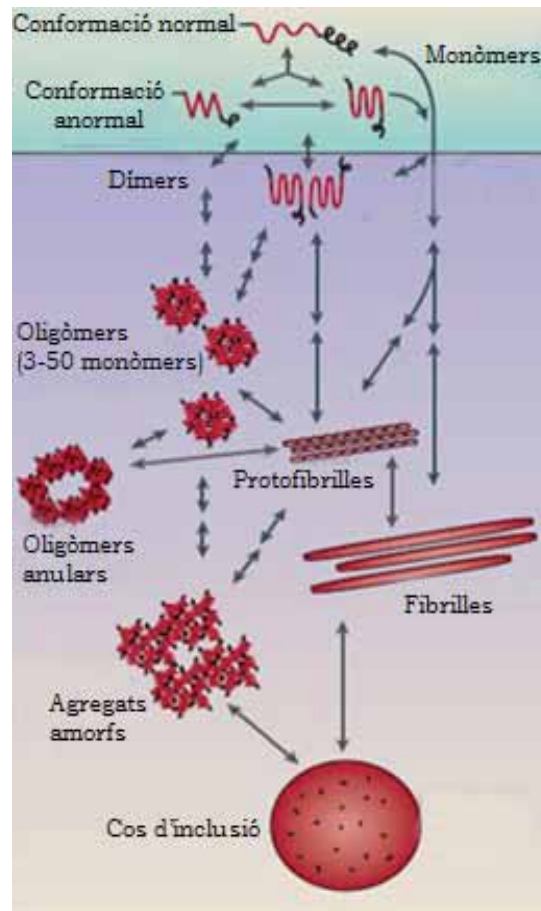


Fig. 10 Esquema de les diferents vies de formació d'agregats proteïcs (Ross i col. 2005).

Les malalties neurodegeneratives es poden classificar en dos grups en funció de la seva:

- *clínica*, efectes fenotípics que poden estar relacionats amb trastorns del moviment (atàxia) o bé amb alteracions de la memòria relacionades amb la demència.
- *neuropatologia molecular*, alteracions conformacionals proteïques i agregació de proteïnes anormals.

El grup basat en les característiques clínicopatològiques implica certes dificultats pel que fa al diagnòstic i a la distinció dels diferents trastorns ja que les malalties neurodegeneratives presenten molta heterogeneïtat i un gran solapament entre elles. Aquest solapament es defineix com la coexistència de característiques clíniques i/o patològiques de més d'un desordre en un mateix individu.

Com a conseqüència, s'ha d'intentar reconsiderar l'actual nosologia i tenir en compte una nova divisió de les malalties neurodegeneratives (Armstrong i col. 2005). Pel que fa al segon grup, cada cop s'estan realitzant més avanços en el camp de la neuropatologia molecular que permeten fer una classificació en funció de la proteïna anormal que s'acumula, representant un clar marcador bioquímic i histomorfològic de les malalties neurodegeneratives (Fig. 11) (Woulfe J. 2008).

<p><u>TAUPATIES</u></p> <p>Alzheimer Grans argidòfils Degeneració corticobasal Demència frontotemporal lligada al cromosoma 17 deguda a mutacions de la tau Pick Paràlisi supranuclear progressiva</p> <p><u>SINUCLEOPATIES</u></p> <p>Parkinson Demència amb cossos de Lewy Atrofia múltiple sistèmica</p> <p><u>PROTEINOPATIES PRIÒNIQUES</u></p> <p>Creutzfeld-Jakob Insomni "fatal/mortal"</p>	<p><u>POLIGLUTAMINOPATIES</u></p> <p>Huntington</p> <p><u>PROTEINOPATIES TDP-43</u></p> <p>Degeneració frontotemporal amb inclusions només d'ubiquitina Esclerosi lateral amiotròfica</p> <p><u>MALALTIES MEDIATEDES PER RNA</u></p> <p>Distròfia miotònica Síndrome del tremolor atàxia associat al X fràgil</p> <p><u>ALTRES</u></p> <p>TDP-43 FTL-D-U negativa Neuroferritinopatia</p>
---	---

Fig. 11 Classificació de les malalties neurodegeneratives en funció de les inclusions proteïques (Woulfe J. 2008).

2.1 **TAUPATIES: Tau**

El grup de les taupaties engloba un conjunt heterogeni de desordres que tenen en comú la presència de dipòsits de la proteïna tau com a principal característica patològica.

La tau és una proteïna MAP (microtubule-associated phosphoprotein) abundant tant en el sistema nerviós central com en el perifèric. La principal funció de tau és establir els microtúbuls: promou l'ensamblatge dels microtúbuls reduint la seva inestabilitat, participa en el manteniment de la morfologia i la integritat neuronal ja que les neurones presenten processos que s'extenen fàcilment a grans distàncies fent d'elles cèl·lules molt asimètriques, està implicada en una sofisticada maquinària de transport que permet a les molècules de senyalització, als factors tròfics i a d'altres constituents cel·lulars essencials viatjar al llarg de l'axó (transport axonal) (Ballatore i col. 2007, Gendron i col. 2009). En condicions normals, la tau es troba en un equilibri d'ensamblatge i de desensamblatge amb els microtúbuls que està controlat per la fosforilació de tau per l'acció de les cinases i les fosfatases; ara bé en condicions

III.INTRODUCCIÓ

patològiques, aquest equilibri es trenca i la proteïna tau s'hiperfosforila provocant un augment anormal dels nivells de tau lliure (no unida) on aquest increment de tau citosòlica comporta canvis conformationals patogènics que afavoreixen l'agregació i la fibrillació de tau (Ballatore i col. 2007, Drewes i col. 1995, Mazanetz i col. 2007).

El gen de la tau es troba en el cromosoma 17q21 amb 16 exons, dels quals 11 codifiquen per les isoformes més importants de la proteïna tau. A través de l'*splicing* alternatiu dels exons 2,3 i 10 del mRNA es formen un grup de 6 isoformes en el cervell humà d'un adult (Billingsley i col. 1997, Tolnay i col. 2003). Tau presenta dominis d'unió als microtúbuls que estan formats per regions d'unió a la tubulina, altament conservades i situades en la meitat C-terminal de la proteïna, havent-hi a continuació una regió rica en prolina i després una regió N-terminal. Les 6 isoformes es diferencien unes de les altres en el número de repeticions d'unió a la tubulina (3R o 4R) i també per la presència o absència d'inserts en la regió N-terminal de la proteïna (Fig. 12) (Ballatore i col. 2007, Gendron i col. 2009). En el cervell sa d'un adult, la proporció de les isoformes de tau 3R i de 4R és d'aproximadament del 50% per cadascuna. Les isoformes tau 4R interaccionen més eficientment amb els microtúbuls que les isoformes tau 3R (Goedert i col. 1990). La proteïna tau anormalment hiperfosforilada es dissocia dels microtúbuls empaquetant-se en fibres de manera molt densa donant lloc a unes estructures anomenades FHE (filaments helicoidals emparellats, PHF de *Paired Helical Filaments*) que per processament proteolític formen oligòmers de tau i agregats insolubles, els CN (cabdells neurofibril·lars, NFTs de neurofibrillary tangles) (Bamburg i col. 2009)

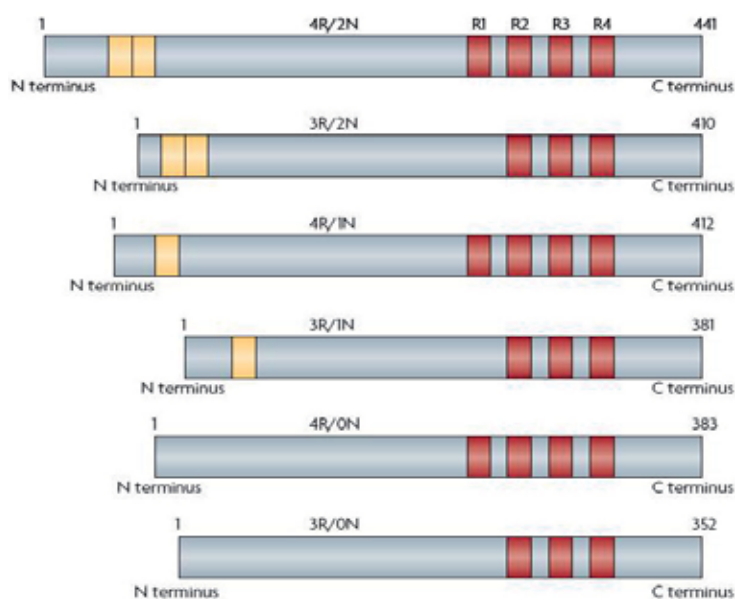


Fig. 12. Les sis isoformes de tau que s'expressen en el cervell d'un adult (Ballatore i col. 2007).

S'han descrit una important llista de cinases implicades en la fosforilació de tau, tant *in vitro* com en models animals i en mostres humanes post mortem, tals com la GSK3β (glycogen synthase kinase 3β), CDK5 (cyclin-dependent kinase 5), ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), MARK (microtubule affinity-regulating kinase), PKA (cAMP-dependent protein kinase), on la MAP p38 (mitogen activated protein) i

la SAPK/JNK (stress-activated protein kinase) estan considerades cinases d'estrès ja que s'activen davant d'estímuls estressants (Hartzler i col. 2002, Shelton i col. 2004, Spittaels i col. 2000). Les proteïnes fosfatases són necessàries per contrarestar els efectes de les proteïnes cinases: diversos estudis han compromès diverses fosfatases en la regulació de la fosforilació de tau com per exemple la PP1, PP2A, PP2B i la PP2C (protein phosphatase) (Liu i col. 2005).

Totes elles defosforilen tau *in vitro* però s'ha suggerit que la PP2A i la PP2B són essencials per la regulació *in vivo* (Billingsley i col. 1997).

2.1.1 Malaltia de Steele-Richardson-Olszewski o Paràlisi Supranuclear Progressiva (PSP)

L'any 1964 tres investigadors de Toronto, John C. Steele, Clifford Richardson i Jerzy Olszewski, van descriure la malaltia de PSP com una "degeneració heterogènia on estan implicats el tronc de l'encèfal, els ganglis basals i el cerebel, amb presència de paràlisi pseudobulbar, mirada vertical, distonia i demència". És una malaltia amb una prevalència de 5-6 casos per cada 100.000 individus on l'edat d'inici de la malaltia està entre els 50-70 anys. L'afectació per sexes és semblant però hi ha un major nombre de defuncions en els homes que en les dones (Santacruz i col. 1998, Schrag, i col. 1999). Té una progressió ràpida i s'estimen de 5-10 anys de supervivència des de l'inici dels símptomes (Albers i col. 2001).

A. Clínica

La PSP es manifesta clínicament per una anormalitat en el moviment dels ulls (concretament al moure la mirada cap avall però quan avança la malaltia afecta a totes les direccions), distonia cervical, síndrome parkinsonià amb presència de rigidesa corporal, pèrdua de l'equilibri i un pas poc ferm, bradicinèsia (lentitud dels moviments voluntaris), caigudes, desinhibició social, disfòria, ansietat i a vegades agitació, irritabilitat, canvis d'humor i de la personalitat, apràxia (incapacitat d'executar determinats gests o moviments, anteriorment apresos, de manera voluntària i d'una manera apropiada) (Litvan i col. 1996, Morris i col. 2002, Rampello i col. 2005). Aquests últims símptomes, d'alteracions importants del comportament i cognitius, són deguts a la disfunció del lòbul frontal així com l'apatia, la depressió i la bradifrenia (activitat mental lenta) estan associades amb un marcat hipometabolisme de la glucosa d'aquest lòbul (Albers i col. 2001). Els pacients diagnosticats de PSP també poden presentar demència, sent un tipus de demència *subcortical* diferent de la

III.INTRODUCCIÓ

cortical: es caracteritza per una alteració de la memòria, amb oblits freqüents però es segueix mantenint la capacitat de gravar nous esdeveniments.

B. Característiques neuropatològiques

Macroscòpicament

A nivell patològic aquest desordre es pot diferenciar de les altres taupaties per l'afectació i l'atrofia de les estructures corticals (lòbul frontal) però també de les subcorticals concretament el tàlam, els nuclis subtalàmics, els ganglis basals, el globus pallidus, la despigmentació de la substància negra, el locus ceruleus, l'estriat, els nuclis basals de Meynert (Albers i col. 2001, Dickson DW. 1999, Hauw JJ. 2003), trobant-se també afectat el complex oculomotor.

Microscòpicament

És una taupatia 4R, que resulta de l'*splicing* de l'exó 10, (Chambers i col. 1999) (Fig. 13) on la tau hiperfosforilada es troba acumulada en neurones, astròcits i oligodendròcits (Lee i col. 2001).

En el cas de PSP, els agregats de tau positiu formen CNs i pre-cabdells en les neurones distribuïnt-se, com els filaments del neuròpil, per l'estriat, en el globus pallidus, en els nuclis subtalàmics, en els nuclis basals de Meynert podent-se trobar també per l'hipocamp, para-hipocamp i isocòrtex. Aquests CNs tenen un aspecte arrodonit o globós (Fig. 14a) formant inclusions intracitoplasmàtiques arrodonides, a vegades extenent-se per tot el diàmetre de la neurona (Hauw JJ. 2003).

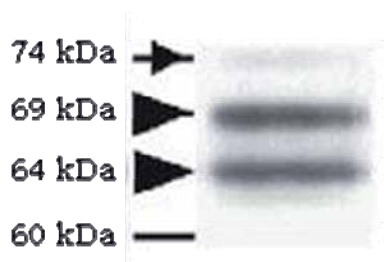


Fig. 13 Gràcies a l'anàlisi per Western blot de fraccions insolubles FHE de pacients amb PSP, utilitzant anticossos contra tau, s'observa la presència de dues bandes molt intenses de 68 i 64 kDa corresponents a isoformes de tau 4R (Sergeant i col. 2005).

A part dels CNs, s'han descrit dos marcadors bioquímics característics de PSP relacionats amb la glia, els cabdells tau positius de la glia:

- un dels més importants fa referència als anomenats astròcits *tufted* (Fig.14b): fibres empaquetades densament de diferents diàmetres que es marquen positivament amb tau en

III.INTRODUCCIÓ

els astròcits. Aquest tipus cel·lular pren forma estrellada i és casi exclusiu d'aquesta malaltia localitzant-se especialment en l'estriat, tàlam, nuclis subtalàmics i a l'escorça frontal (Dickson DW. 1999, Togo i col. 2002). Un altre tipus d'astròcits fibrillars anomenats *thorn-shaped*, amb les mateixes propietats histoquímiques que els astròcits *tufted* però amb processos cel·lulars curts, es poden trobar a PSP però no són específics d'aquesta detectant-se també en d'altres malalties com per exemple en la degeneració corticobasal (DCB) (Hauw JJ. 2003).

- l'altra implica als oligodendròcits, els cossos d'inclusió (Fig. 14c): són inclusions intracitoplasmàtiques oligodendroglials tau positives que rodegen els seus nuclis. Es troben normalment a l'escorça i a prop de la matèria blanca, nuclis subtalàmics, tàlam, substància negra.

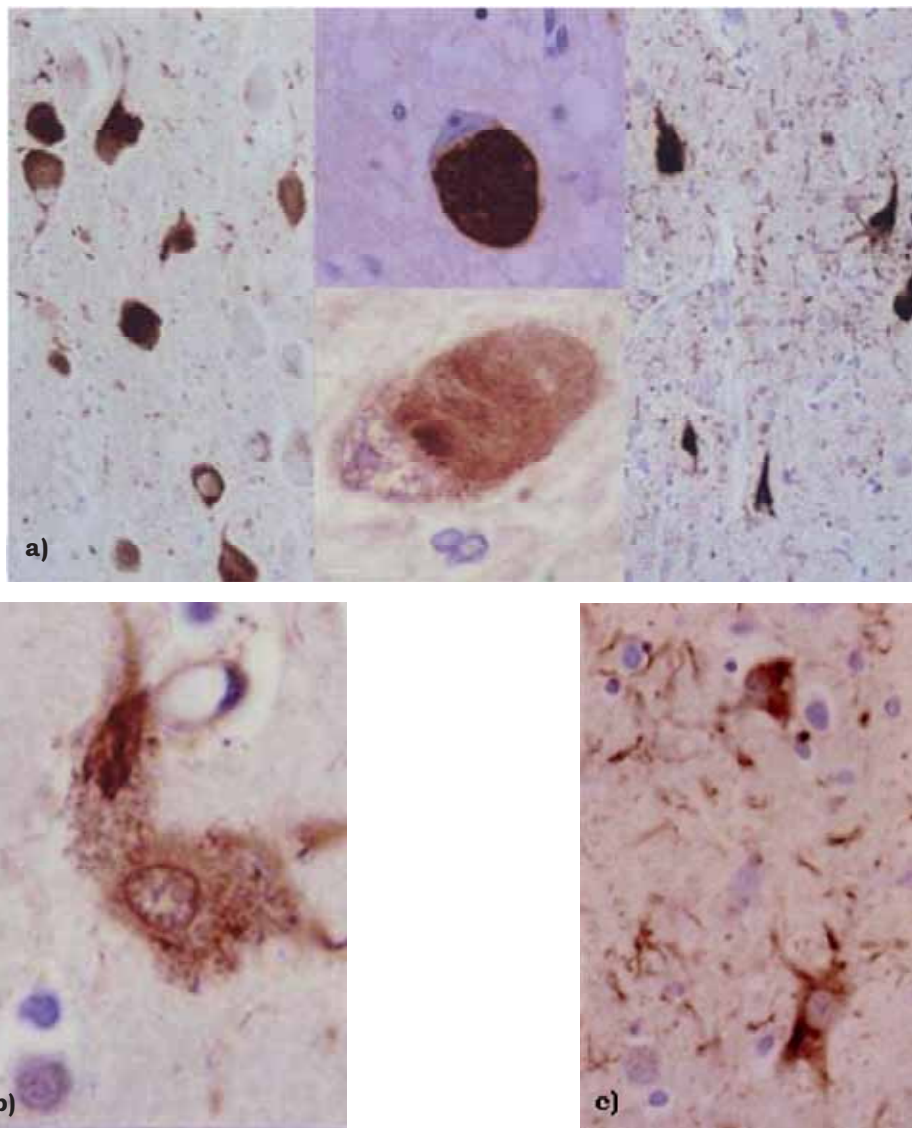


Fig. 14 a) Imatge dels CNs globosos a les neurones; b) s'observen els astròcits *tufted*; c) es marquen els cossos en espiral a la malaltia de PSP.

III.INTRODUCCIÓ

C. Etiologia

L'etiologia de PSP no és coneguda però s'hipotetitzen diferents factors que poden contribuir al seu desenvolupament: genètics, medi ambientals, dany produït per l'estrès oxidatiu, inflamació. Encara que en la majoria de casos de PSP s'ha vist que apareixen esporàdicament, s'han descrit algunes formes genètiques on poden existir patrons dominants autosòmics o bé recessius. La regió cromosòmica de la *MAPT* està formada per dos haplotips, H1 i H2 on en el cas de PSP s'ha trobat una relació amb l'haplotip de tau H1 que està sobrerrepresentat en mostres de pacients comparant amb els controls (Baker i col. 1999, Dickson DW. 1999).

D. Estrès oxidatiu i PSP

L'estrès oxidatiu ha estat descrit com un factor que juga un paper en la patogènesi de PSP, trobant-se marcadors de peroxidació lipídica (MDAL, 4-HNE) augmentats en el nucli subtalàmic, en l'escorça frontal superior i en el mesencèfal (Albers i col. 1999, Albers i col. 2000, Odetti i col. 2000) de mostres post mortem humanes. Els sistemes de defensa antioxidant augmenten la seva expressió com a resposta davant de la producció elevada de radicals lliures, observant-se en casos de PSP un increment dels nivells i de l'activitat de Cu/Zn-SOD i del glutatió total (Aoyama i col. 2006, Cantuti-Castelvetri i col. 2002). S'ha trobat un increment de la concentració de Fe²⁺ en els ganglis basals i també la presència de ferritina en dipòsits de tau hiperfosforilat en mostres de pacients de PSP, suggerint ambdues evidències una possible relació entre l'estrès oxidatiu, la presència de metalls i els agregats de tau (Albers i col. 2001).

2.1.2 Degeneració frontotemporal lobar amb parkinsonisme lligada al cromosoma 17 associada a mutacions de la tau (DFTL-tau)

El conjunt de malalties agrupades com a degeneració frontotemporal lobar (DFTL) representa la tercera causa més comuna de demència, després de la malaltia d'Alzheimer i de la malaltia de cossos de Lewy (Neary i col. 1998). La DFTL agrupa un grup de patologies que tenen en comú l'atrofia bilateral del lòbul frontal i la part anterior del temporal. Les manifestacions clíniques més típiques són una demència semàntica, una afàsia primària progressiva i una demència frontotemporal on aquesta última és la més comú mostrant canvis progressius en la personalitat i en el comportament (Brun i col. 1997, Neary i col. 1998, Neary i col. 2005). Alteracions en el llenguatge i dificultats cognitives també solen detectar-se. Per tal de facilitar el diagnòstic d'un grup tan complex com el de les DFTL el grup de McKhann i col. 2001

va simplificar els criteris englobant l'afàsia progressiva i la demència semàntica dins del terme de demència frontotemporal i proposant 6 característiques clíniques: 1. canvis primerencs i progressius en la personalitat i en el llenguatge; 2. problemes socials; 3. progrés gradual i progressiu; 4. exclusió d'altres causes; 5. els dèficits no passen només durant el *delirium* (estat de confusió agut); 6. exclusió de causes psiquiàtriques, com per exemple la depressió.

L'examen macroscòpic del cervell de pacients amb DFTL mostra una atrofia del lòbul frontal, del temporal o dels dos. En un elevat tant per cent dels casos s'observa l'atrofia dels ganglis basals i també pèrdua de la pigmentació de la substància negra (Cairns i col. 2007a). Pel que fa a nivell microscòpic, la majoria de grups de DFTL presenten una microvacuolització i una pèrdua neuronal de l'escorça cerebral observable gràcies a a tincions d'hematoxilina i eosina. També pot haver-hi pèrdua de mielina de la substància blanca i gliosi astrocitària (Cairns i col, 2007a).

Així doncs aquest conjunt de patologies de DFTL es poden classificar en tres grups, on el primer d'ells presenta inclusions de tau hiperfosforilat com la DFTL amb parkinsonisme lligada al cromosoma 17 associada a mutacions en el gen de la tau - *MAPT* 17q21-q22- (DFTL-tau). El segon està format per la presència d'inclusions d'ubiquitina que són negatives per tau i per l' α -sinucleïna (DFTL-U) i l'últim engloba un grup de casos de DFTL sense característiques neuropatològiques particulars i amb poca incidència.

DFTL-tau va ser definida l'any 1996 en el congrés *International Consensus Conference* a Ann Arbor (Michigan) on es van presentar 13 famílies amb síndromes lligats al cromosoma 17q21-22. Es va acordar que era una malaltia neurodegenerativa autosòmica dominant que presentava tres característiques fonamentals: canvis en el comportament i la personalitat, discapacitats cognitives i símptomes motors. Està causada per mutacions en el gen de la tau sense saber la seva prevalència ni la incidència però havent-se identificat, aproximadament, sobre unes 100 famílies per tot el món amb 38 mutacions diferents de tau (Lowe J. 2003, Wszolek i col. 2006). No hi ha diferència de distribució entre gèneres, trobant-se l'edat d'inici de la malaltia entre els 30 i els 50 anys. El pronòstic i l'índex de la progressió de la patologia varia molt entre diferents pacients, el rang d'esperança de vida pot anar des d'alguns mesos a diferents anys i, en casos excepcionals, es pot allargar fins a 2 dècades.

III.INTRODUCCIÓ

A. Clínica

En els pacients de DFTL-tau s'observen, com a símptomes clínics, canvis en la personalitat i en el comportament (desinhibició, apatia, comportament compulsiu, deixar de banda la higiene personal, agressió verbal o física). A nivell cognitiu, en estadis primerencs, s'observen dificultats en la parla i problemes en les funcions executives mentre que la memòria o l'orientació estan preservats; en estadiatges més avançats de la patologia els pacients poden desenvolupar deteriorament progressiu de la memòria, de l'orientació, ecolalia (repeticions de les frases o paraules pronunciades per l'interlocutor) i finalment pot aparèixer demència i un mutisme del pacient. Pel que fa als símptomes motors, el parkinsonisme a DFTL-tau es caracteritza per bradicinèsia, inestabilitat en la postura, rigidesa i normalment absència de tremolors (Kumar-Singh i col. 2007, Lowe J. 2003, Tsuboi Y. 2006, Wszolek i col. 2006). El fenotip pot variar tant entre famílies que presenten diferents mutacions com dins de famílies que porten la mateixa: a vegades el diagnòstic definitiu necessita una combinació de característiques clíniques, de trets patològics i anàlisis genètics moleculars.

B. Característiques neuropatològiques

Macroscòpicament

S'observa una atrofia dels lòbuls frontal i temporal, podent ser asimètrica, on en etapes avançades de la malaltia l'atrofia està present en diferents graus. Els lòbuls temporal, parietal i occipital estan normalment menys lesionats. Hi ha afectació del nucli caudat, el putamen, el globus pallidus, l'amígdala, l'hipocamp, els nuclis basals, una important pèrdua de pigmentació de la substància negra i del locus ceruleus. L'escorça cerebelar està normalment preservada encara que a vegades es pot veure una lleugera atrofia (Ghetti B, Hutton ML, Wszolek ZK. 2003, Tsuboi Y. 2006).

Microscòpicament

Microscòpicament es detecta una pèrdua neuronal, una gliosi astrocitària i una espongiosi en les capes superficials corticals. Els fenotips neuropatològics varien no només en les característiques morfològiques sinó també en la intensitat i la distribució, on aquesta variabilitat correlaciona amb el tipus de mutació (Spillantini i col. 2000, Tsuboi Y. 2006):

- les mutacions en els exons 1 i 10, com també en l'intró que segueix l'exó 10, estan

associades amb dipòsits de tau a les neurones (predominantment en els axons) i a la glia.

- les que afecten als exons 9, 11, 12 i 13 provoquen dipòsits de tau principalment a les neurones.

S'ha demostrat que aquestes mutacions afecten a la capacitat de tau per unir-se als microtúbuls i a la proporció de les diferents isoformes de tau (Fig. 15). Les mutacions de tau que afecten a l'exó 10, i a l'intró que segueix a l'exó 10, incrementen la proporció de la isoforma 4R (excepte la delK280 que elimina "virtualment" l'exó 10 i augmenta la forma 3R).

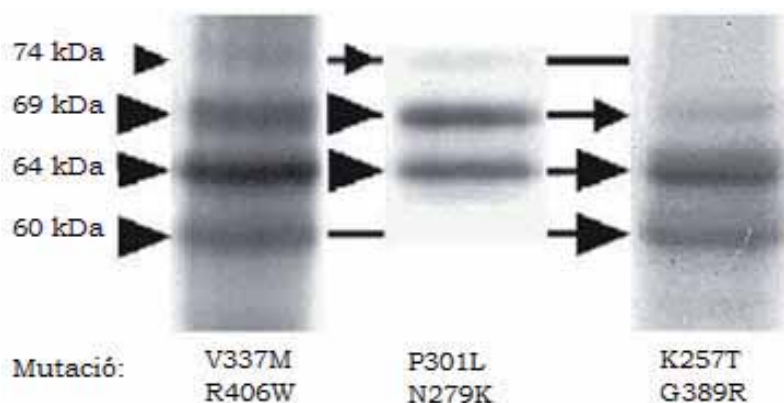


Fig. 15 Diferents patrons electroforètics de la proteïna tau patològica (Sergeant i col. 2005).

Les mutacions més comunes són la P301L i la N279K (localitzades en l'exó 10 donant un patró 4R) representant el 60% dels casos coneguts. En el cas de la P301L (canvi de l'aminoàcid prolina per la leucina en la posició 301), a part dels dipòsits de tau a les neurones, s'han observat neurones balonades a l'escorça i en alguns nuclis subcorticals. A més a més, els astròcits i l'oligodendroglia es troben afectats: els astròcits es troben en el neocòrtex i l'oligodendroglia apareix en forma de cossos en espiral (Ghetti B, Hutton ML, Wszolek ZK. 2003).

Per tant, el marcador neuropatològic de les DFTL-tau és la presència de dipòsits de la proteïna tau en les neurones i també en les cèl·lules glials (Fig.16).

III.INTRODUCCIÓ

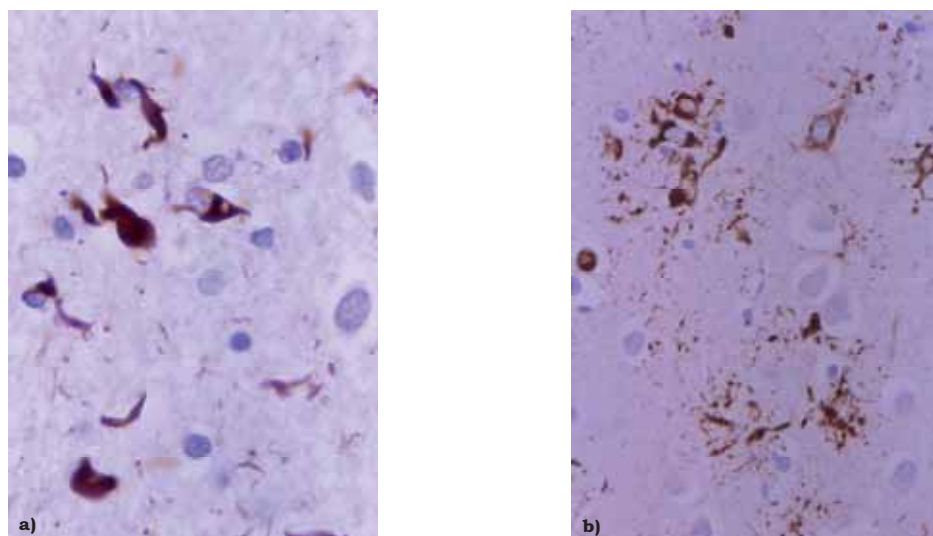


Fig. 16 Imatges dels CNs en una DFTL-tau (mutació P301L) tant en a) les neurones, com en b) la glia.

C. Etiologia

S'han trobat abundants evidències de que mutacions en la MAPT provoquen DFTL-tau (Spillantini i col. 1998, Spillantini i col. 2000). En funció de la localització de la mutació, poden estar implicats diferents mecanismes alterant la proporció de les isoformes de tau o bé produïnt canvis en la capacitat de tau a unir-se als microtúbuls i promoure el seu ensamblatge. En funció d'aquests dos principis, les 38 mutacions del gen de la tau (Fig. 17) es diferencien en dos grans grups (Reed i col. 2001):

- mutacions que afecten a l'*splicing* alternatiu de l'exó 10 on s'han descrit 4 mutacions sense sentit (N279K, P301L, P301S, S305N), una deleció (delK280), dues mutacions de transició que no afecten a la codificació dels aminoàcids (L284L, S305S) i també d'altres mutacions intròniques properes al 5' de l'exó 10. Com s'ha comentat anteriorment, la mutació P301L és la més comuna identificada en, com a mínim, 19 famílies de tot el món involucrant a mutacions familiars holandeses, canadenques i franceses com a les fundadores. Les mutacions afecten només a l'*splicing* alternatiu de l'exó 10 on hi ha un predomini de la isoforma 4R de tau (Mirra i col. 1999, Nasreddine i col. 1999, Tsuboi Y. 2006, Wszolek i col. 2006).
- mutacions sense sentit en els exons 9, 12 i 13 on s'inclouen la I260V, G272V, V337M, G389R, R406W. Les mutacions sense sentit donen lloc a isoformes mutants amb substitució d'aminoàcids amb canvis importants en la càrrega, la hidrofobicitat,... alterant l'estructura secundària de les isoformes de tau que es codifiquen. En estudis *in vitro* de proteïnes recombinants, i en assajos de cèl·lules

transfectades, es va trobar que aquestes mutacions poden provocar una disminució en la interacció i estabilització dels microtúbuls amb la tau, reduint la capacitat d'ensamblatge dels microtúbuls (Barghorn i col. 2000, Dayanandan i col. 1999), incrementant la proporció de tau que no està unida als microtúbuls i augmentant directa o indirectament la tendència de tau no unida per formar filaments. Aquestes mutacions impliquen a exons que s'expressen constitutivament, per tant totes les sis isoformes es troben afectades, bioquímicament s'ha confirmat que presenten tant tau 3R com tau 4R.

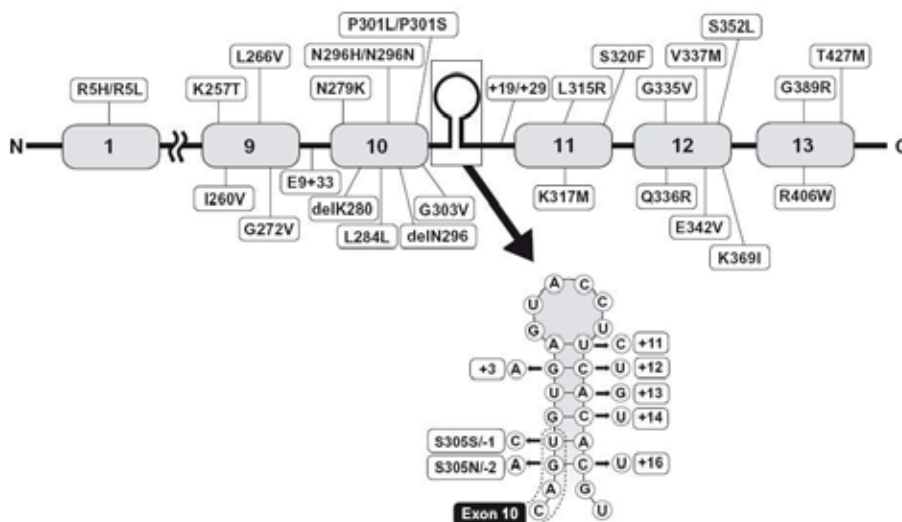


Fig. 17 Representació esquemàtica dels exons i dels introns del gen de la tau, localitzat en el cromosoma 17, on es mostren les diferents mutacions identificades (Tsuboi Y. 2006).

D. Estrès oxidatiu i DFTL-tau

Hi ha pocs estudis que s'hagin centrat en el paper que té l'estrès oxidatiu en la DFTL-tau. S'han trobat evidències, en mostres de demències frontotemporals, on el ferro es va trobar augmentat (sent important per l'estat redox de la cèl·lula) (Gerst i col. 1999) i, per altra banda, en mostres d'escorça frontal de DFTL-tau hi havia una diferent expressió de proteïnes relacionades amb l'estrès oxidatiu (SOD-2, peroxiredoxin, Hsp-70). Per altra banda s'han generat animals transgènics, com els ratolins que sobreexpressen la mutació de la tau humana P301L, on els ratolins mutats presentaven alteració en l'expressió de proteïnes involucrades en l'estrès oxidatiu (SOD, peroxiredoxin) i també amb proteïnes del metabolisme implicades amb

III.INTRODUCCIÓ

la cadena de respiració mitocondrial trobant-se també augmentats els nivells de H₂O₂ i d'O₂ (David i col. 2005).

2.2 NO TAUPATIES

2.2.1 Degeneració frontotemporal lobar amb inclusions de tau negatives i d'ubiquitina positives (DFTL-U): proteinopatia TDP-43

Fa aproximadament tres anys es va identificar la proteïna TDP-43 (*TAR DNA-binding Protein*) (Neumann i col. 2006) com un dels components majoritaris de les inclusions d'ubiquitina, tant en els casos esporàdics de DFTL-U com en els familiars i també en els esporàdics d'ELA. La TDP-43 és una proteïna de 414 aminoàcids codificada pel gen TARDBP en el cromosoma 1. Està altament conservada amb expressió ubiqüa, localitzada principalment en el nucli en condicions normals i on canvis en la seva distribució afecten a les neurones. La TDP-43 està implicada en la regulació de la transcripció i de l'*splicing* però, estudis recents, l'han relacionat amb d'altres processos cel·lulars com en la biogènesi dels mRNA, l'estabilització del mRNA, regulació de la plasticitat neuronal actuant com a un factor de resposta de l'activitat neuronal (Neumann M. 2009, Wang i col. 2008). Els mecanismes que porten a l'acumulació de la TDP-43 patològica en les inclusions citoplasmàtiques, neurítiques i nuclears no estan gens clars. En aquests desordres la TDP-43 està anormalment fosforilada, ubiquitinada i truncada generant fragments en el C-terminal (Cairns i col. 2007a).

Es va proposar el criteri de proteinopatia TDP-43 per ser reconeguda com la troballa histològica més freqüent en les DFTL-U i amb la idea d'intentar resoldre les vies moleculars que estan relacionades amb la naturalesa de les malalties ubiquitinades (Cairns i col. 2007a).

En aquest segon grup, que forma part del conjunt de DFTL, no s'han trobat dades fiables pel que fa ni a la incidència ni a la prevalència de la DFTL-U però el que es pot afirmar és que representa aproximadament el 50% de les DFTL totals comparant amb les taupaties (sobre un 40%) i amb el tercer grup de DFTL, que està format per casos que no presenten inclusions, sense trets histològics particulars i sent considerats excepcionals (Fig.18).

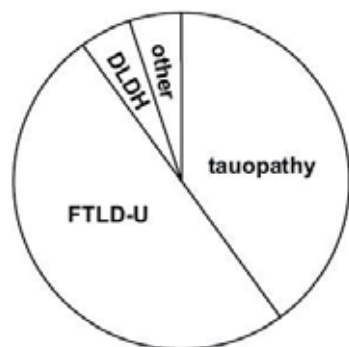


Fig. 18 Els casos de DFTL-U són més comuns que els associats a la patologia de tau (Mackenzie i col. 2007b).

En la distribució per edats no es veuen diferències i es considera que el rang d'edat d'inici de la patologia es troba entre els 53 i els 83 anys (Lowe J. 2003). La durada de la malaltia en la DFTL-U s'estima entre els 4-12 anys.

A. Clínica

La clínica dels pacients amb DFTL-U és la que s'assembla més a les característiques generals del conjunt de DFTL, tals com l'afàsia progressiva, la demència semàntica (els episodis de memòria estan preservats però hi ha una gran incapacitat pel que fa a la memòria semàntica) i amb alteracions del comportament i de la personalitat (desinhibició social) (Arvanitakis Z. 2010, Josepchs i col. 2004, Lowe J. 2003). Godbolt i col. 2005 van realitzar un estudi comparatiu de mostres post mortem diagnosticades amb DFTL-U esporàdica i familiar trobant que les característiques comportamentals eren semblants en els dos grups però pel que fa a la demència semàntica es va veure més associada als casos esporàdics.

B. Característiques neuropatològiques

Macroscòpicament

El pes del cervell està generalment reduït. L'escorça cerebral està atrofiada sent molt severa en el lòbuls frontal i temporal. Els casos associats amb l'afàsia presenten una atrofia asimètrica. L'hipocamp pot estar severament atrofiat i a vegades també s'observa la dels ganglis basals, especialment la del cap del nucli del caudat. La substància negra pot veure's més pàl·lida però el locus ceruleus està normalment preservat (Lowe J. 2003).

III.INTRODUCCIÓ

Microscòpicament

Els casos amb DFTL-U presenten inclusions citoplasmàtiques intraneuronals positives per la ubiquïtina i negatives per la tau i l'α-sinucleïna, localitzades en l'escorça frontal o en el temporal (Fig. 19a). També es poden trobar en les neurites anormals. Un examen de les àrees atrofiades de l'escorça cerebral mostra pèrdua neuronal, microvacuolacions i gliosi astrocitària (Neary i col. 2005). Aquest grup es divideix en diferents subtipus en funció de la localització, la distribució i la predominança de les inclusions d'ubiquïtina en el nucli, el citoplasma i en el neuròpil (Cairns i col. 2007a, Sampathu i col. 2006). S'han descrit inclusions neuronals intranuclears immunoreactives per la ubiquïtina que presenten forma d'ull de gat" localitzant-se a l'escorça cerebral i a l'estriat, característiques de la DFTL-U familiar amb mutació en el gen de la progranulina (Fig. 19b).

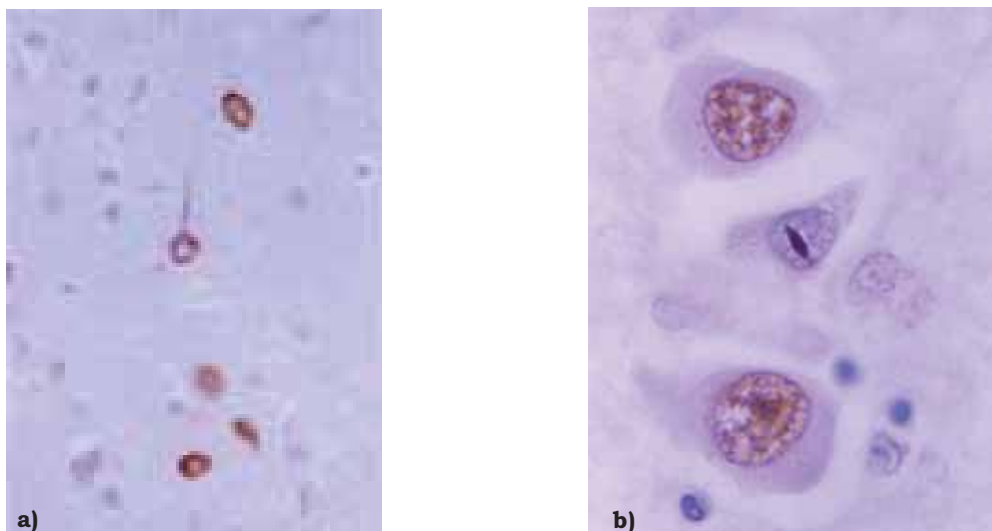


Fig. 19 a) DFTL-U immunoreactiva per la ubiquïtina, b) DFTL-U positiva per la ubiquïtina en forma d'ull de gat", mutació de la progranulina.

C. Etiologia

L'origen de les DFTL-U no està clar, la majoria de casos s'han trobat per ser esporàdics però a partir d'estudis genètics de casos familiars de DFTL-U s'han descrit mutacions en dos gens de diferents cromosomes (9, 17):

- mutació en el gen de la progranulina que està localitzat en el cromosoma 9. La progranulina està molt expressada en factors de creixement que tenen un paper en diversos processos com en el desenvolupament o bé a la inflamació, activant cascades

que controlen la progressió del cicle cel·lular i la motilitat de les cèl·lules. S'expressa en les neurones de l'escorça cerebral, de l'hipocamp i del cerebel produint efectes neurotròfics però encara no s'ha determinat la seva funció normal en les neurones (Gass i col. 2006). La DFTL-U està provocada per mutacions en aquest gen donant lloc a al·lels nulls (haploinsuficiència): la majoria de mutacions identificades en el gen de la progranulina són sense sentit o *frameshift* que donen lloc a codons prematurs d'acabament en la seva seqüència de RNAm (Baker i col. 2006, Skoglund i col. 2009). La identificació de la progranulina va ser particularment interessant ja que es demostrava la coincidència de dos importants gens relacionats amb el mateix fenotip de la malaltia en el cromosoma 17q21-22 17 (encara que aquesta mutació es troba en la mateixa regió cromosomal que el gen de la tau, no s'han trobat mutacions de la tau) (Baker i col. 2006, Kumar-Singh i col. 2007).

- mutació en el gen de la VCP (valosin-containing protein), sent una mutació sense sentit en el cromosoma 9, és un membre del tipus AAA ATPasa (ATPasa associada amb diferents activitats) que actua com una xaperona associada a la degradació de proteïnes en el reticle endoplasmàtic, resposta a l'estrès, mort cel·lular programada, interaccions amb el sistema d'ubiquitina-proteasoma,... (Cairns i col. 2007a).

2.2.1.1 Degeneració frontotemporal lobar associada a patologia de motoneurona i esclerosi lateral amiotròfica (DFTL-ELA)

La prevalència d'aquesta malaltia és de 5 per cada 100.000 individus i el risc de patir ELA augmenta en un ordre de magnitud passats els 60 anys d'edat. El rang d'edat d'inici de la patologia està entre els 39 i els 77 anys. La velocitat de la progressió de la malaltia varia entre individus, podent estar influenciada pel lloc d'inici, però sent normalment ràpida amb una supervivència de només 2-3 anys des del començament dels símptomes (Barber i col. 2009, Lowe J. 2003). Aquesta durada de la malaltia és molt menor que en el cas de les DFTL-U, pot ser per la ràpida progressió de les complicacions mortals que presenta la patologia com la insuficiència respiratòria que apareix com a un símptoma secundari.

A. Clínica

L'ELA té un patró de neurodegeneració amb un síndrome clínic ben definit que normalment es diferencia bé dels altres desordres neurològics. Els casos esporàdics i els familiars són clínicament indistingibles, la identificació dels genètics no és fàcil i es necessita un historial familiar ben documentat.

III.INTRODUCCIÓ

En l'ELA predominantment estan afectades les motoneurons (les superiors i les inferiors): clínicament s'observa un progressiu debilitament de la musculatura que s'atrofia i, finalment, porta a la mort del pacient per una insuficiència respiratòria. L'associació entre la demència i l'ELA va ser observada a finals del 1800 i a partir d'aleshores ha estat molt provada per diferents grups. S'han descrit canvis en les funcions del lòbul frontal (anormalitats cognitives, disfunció del llenguatge, alteracions de la personalitat, planificació, organització) (Lomen-Hoerth C i col. 2003). Hi ha un important solapament patològic entre els casos de DFTL-ELA i de la ELA pura clínicament i la demència frontotemporal (Mackenzie IR. 2007a).

B. Característiques neuropatològiques

Macroscòpicament

En les autòpsies dels pacients amb ELA es veu una important atrofia muscular, afectant també al diafragma, i una gran reducció del greix subcutani. La medul·la espinal, macroscòpicament, està atrofiada com també estan afectades les seves ramificacions cervicals i lumbar. La neuropatologia de la ELA clàssica està caracteritzada per una degeneració de les motoneurons de l'escorça motora (tant la motoneurona inferior com la superior), del tronc encefàlic i de la medul·la espinal. Els canvis macroscòpics en el cervell són semblants als de la DFTL-U. L'atrofia cortical és menys marcada en aquests casos que en els que presenten DFTL sense afectació per ELA, sent aquesta atrofia normalment frontal. L'estriat està menys afectat que en la DFTL sola (Lowe J. 2003, Neary i col. 2005).

Microscòpicament

Neuropatològicament es caracteritza per la pèrdua de neurones motores (tant la motoneurona inferior com la superior) i la presència de gliosi. S'observen unes inclusions d'ubiquitina positives (no immunoreactives per tau ni per α -sinucleïna) en les motoneurons anomenades SLIs (skein-like inclusions) característiques d'aquesta patologia (Fig. 20). Les inclusions també es troben en neurones de l'escorça frontal, temporal, entorinal, en les neurones hipocampals del girus dentat i a l'amígdala (Kawashima i col. 1998). Una de les proteïnes majoritàries que s'ha trobat en les inclusions d'ubiquitina en mostres de DFTL-ELA és la TDP-43 (Neuman i col. 2006). La distribució dels canvis microscòpics i les característiques microscòpiques en la substància blanca i en la gris són les mateixes que en la DFTL. També es poden

trobar els cossos de Burina (on la proteïna agregada és la cistatina C) característics de la malaltia d'ELA.

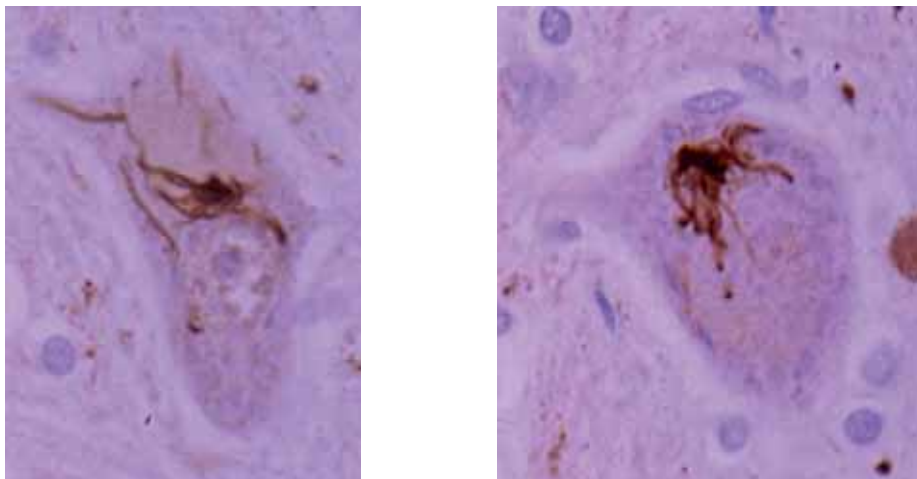


Fig. 20 Imatges d'una DFTL-ELA on es marca positivament la ubiquitina en el citoplasma neuronal.

C. Etiologia

Tot i que fa sobre uns 150 anys que es va descriure aquesta malaltia, s'han proposat una gran varietat d'hipòtesis pel que fa a la seva patogènesi com l'excitotoxicitat glutaminèrgica, la lesió oxidativa, defectes en el transport axonal pel mal funcionament de la xarxa de neurofilaments,...Aproximadament entre un 5-10% dels casos d'ELA són familiars, associats a una gran varietat de locis cromosomals independents, i d'aquests es calcula que d'un 10-20% està relacionat amb la SOD-1 de la que s'han descrit unes 110 mutacions. També s'estan detectant d'altres gens que poden estar implicat com el FUS, la TDP-43, CHMP2B, l'angiogenina, relacionats amb el cromosoma 9 (Barber i col. 2009). Pel que fa als casos esporàdics no se sap la causa de la malaltia, però, tot i que originàriament l'ELA es va descriure com una patologia exclusiva de motoneurona, sobre un 50% dels pacients diagnosticats presenten deficiències cognitives, concretament en les funcions executives (DFTL-ELA) (Forman i col. 2004, Jackson i col. 1996, Lowe J. 2003).

D. Estrès oxidatiu i DFTL-U, DFTL-ELA

Pel que fa als estudis en casos de DFTL-U, no hi ha treballs que s'hagin centrat en el paper del dany oxidatiu.

III.INTRODUCCIÓ

Diversos estudis patològics han demostrat evidències de l'augment de l'estrès oxidatiu en l'ELA, centrant-se però en les ELAs familiars causades per la mutació de SOD-1 (tant en mostres humanes com desenvolupant models de ratolins transgènics per la SOD-1 que permeten mimetitzar la patologia humana).

En el cas de l'ELA esporàdica els treballs per determinar l'efecte de l'estrès oxidatiu no són tant abundants. Els nivells de carbonils proteics es van detectar augmentats, així com els de 8-OHdG, en la medul·la espinal i en l'escorça motora de casos d'ELA esporàdics (Ferrante i col. 1997). També es va trobar un increment dels nivells de 3-nitrotirosina a la medul·la espinal (Beal i col. 1997). Gràcies a estudis immunohistoquímics de les motoneurons de la medul·la espinal i de les cèl·lules glials, es va observar un increment de la immunoreactivitat dels marcadors de peroxidació lipídica i de glicoxidació proteïca en els patològics comparant amb els controls (Shibata i col. 2001). D'altres estudis també van corroborar aquest increment en el líquid cefaloraquídi de mostres patològiques utilitzant el 8-OHdG i l'HNE (Smith i col. 1998). Ilieva i col. 2007 van utilitzar tècniques d'espectrometria de masses per tal de determinar la lesió oxidativa proteïca: es va detectar un augment d'aquesta en la medul·la espinal i també en l'escorça frontal d'ELA esporàdics. També van demostrar la presència d'estrès de reticle endoplasmàtic (augment de xaperones de reticle), alteracions en la funcionalitat mitocondrial (complex I i III) i canvis en la composició dels àcids grassos (Ilieva i col. 2007). Encara que els presents estudis han analitzat l'escorça frontal per veure quin és l'efecte de l'estrès oxidatiu, no s'han realitzat estudis per determinar quin és l'impacte en les proteïnes en mostres de pacients diagnosticats amb DFTL-ELA.

IV. OBJECTIUS

IV.OBJECTIUS

1. Estudiar les modificacions en el RNA i en les proteïnes que poden patir les mostres de teixit de cervell humà per causa de factors post mortem.

2. Investigar la presència d'estrès oxidatiu en les proteïnes a la malaltia de paràlisi supranuclear progressiva (PSP) comparant amb mostres de controls. Per altra banda, identificar les proteïnes que resultin ser les possibles dianes d'oxidació.

3. Caracteritzar l'escorça frontal de mostres de les diferents classes de degeneració frontotemporal lobar (DFTL), concretament la DFTL amb parkinsonisme lligada al cromosoma 17 associada a mutacions de la tau -DFTL-tau-, la DFTL amb inclusions positives per la ubiquitina -DLFT-U- i la DLFT associada a patologia de motoneurona i esclerosi lateral amiotròfica -DFTL-ELA-, en el camp de l'estrès oxidatiu i identificar les proteïnes que siguin la diana dels diferents adductes d'oxidació.

4. Fer una revisió de les proteïnes modificades (oxidació, nitració) en les diferents malalties neurodegeneratives, tant en mostres humanes com en models animals i cultius cel·lulars, i de la metodologia de proteòmica redox utilitzada.

V. RESULTATS

ARTICLES PUBLICATS

1. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies

Isidre Ferrer, Anna Martínez, Susana Boluda, Piero Parchi, Marta Barrachina.

Cell Tissue Bank. 2008 Sep;9(3):181-94. Epub 2008 Jun 10. Review.

2. Glycolitic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal cortex and oxidative damage of these proteins is increased in progressive supranuclear palsy

A. Martínez, E. Dalfó, G. Muntané, I. Ferrer.

J Neural Transm. 2008;115(1):59-66. Epub 2007 Aug 21.

3. Type-Dependent Oxidative Damage in Frontotemporal Lobar Degeneration: Cortical Astrocytes Are Targets of Oxidative Damage

Anna Martínez, Margarita Carmona, Manuel Portero-Otin, Alba Naudí,

Reinald Pamplona, Isidre Ferrer.

J Neuropathol Exp Neurol. 2008 Dec;67(12):1122-36. Erratum in: *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Jan;68(1):112.

4. Protein Targets of Oxidative Damage in Human Neurodegenerative Diseases with Abnormal Protein Aggregates

Anna Martínez, Manuel Portero-Otin, Reinald Pamplona, Isidre Ferrer.

Brain Pathol. 2009 Aug 6. [Epub ahead of print].

1. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies

Isidre Ferrer, Anna Martinez, Susana Boluda, Piero Parchi, Marta Barrachina.

Cell Tissue Bank. 2008 Sep;9(3):181-94. Epub 2008 Jun 10. Review.

Els bancs de teixit, en aquest cas del sistema nerviós, representen el centre d'unió entre el generós donatiu del teixit i els laboratoris d'investigació per tal de poder augmentar el coneixement de les malalties neurodegeneratives, intentar detectar noves dianes de diagnòstic i poder dissenyar noves estratègies terapèutiques.

Per tal de poder treballar amb la certesa de que els resultats obtinguts no estan relacionats amb alteracions del teixit no vinculades amb la patologia, és necessari saber les limitacions i les possibles millores en la metodologia utilitzada. Hi han diferents factors que poden interferir en la preservació del DNA, el RNA, les proteïnes i els lípids: pre mortem (estat agònic, pH) i post mortem (temps de retardament post mortem, temperatura d'emmagatzemar la mostra, material d'extracció del teixit).

Per tal de saber la qualitat del DNA i del RNA l'ús del bioanalyzer (valors del RIN) és molt més sensible que no els gels d'agarosa. A nivell de RNA, a través d'estudis del temps de retardament post mortem i de la temperatura, es va veure que hi havia diferència en el valor del RIN en diferents regions del cervell d'un mateix individu. Pel que fa a les proteïnes, es van analitzar les modificacions d'oxidació i de nitració per western blot en diferents temps de retardament post mortem de teixit humà. Amb els diferents anticossos utilitzats, en general, es va observar que les diferents bandes es mantenien estables fins a les 20h i que a partir d'aquest moment hi havia variacions en el marcatge.

Així doncs és important caracteritzar els diferents factors (pre i post mortem) que poden modificar les diverses molècules (DNA, RNA, proteïnes) per tal de poder reduir aquestes variables i saber fins a quin punt poden o no influir en els experiments que es volen realitzar i en els respectius resultats.

Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies

Isidre Ferrer · Anna Martinez · Susana Boluda ·
Piero Parchi · Marta Barrachina

Received: 10 February 2008 / Accepted: 18 May 2008 / Published online: 10 June 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract Brain banks are facilities providing an interface between generous donation of nervous tissues and research laboratories devoted to increase our understanding of the diseases of the nervous system, discover new diagnostic targets, and develop new strategies. Considering this crucial role, it is important to learn about the suitabilities, limitations and proper handling of individual brain samples for particular studies. Several factors may interfere with preservation of DNA, RNA, proteins and lipids, and, therefore, special care must be taken first to detect sub-optimally preserved tissues and second to provide adequate material for each specific purpose. Basic aspects related with DNA, RNA and protein preservation include agonal state, post-mortem delay, temperature of storage and procedures of tissue preservation. Examination of DNA and RNA preservation is best done by using bioanalyzer technologies instead of less sensitive methods such as agarose gels.

Adequate RNA preservation is mandatory in RNA microarray studies and adequate controls are necessary for proper PCR validation. Like for RNA, the preservation of proteins is not homogeneous since some molecules are more vulnerable than others. This aspect is crucial in the study of proteins including expression levels and possible post-translational modifications. Similarly, the reliability of functional and enzymatic studies in human post-mortem brain largely depends on protein preservation. Much less is known about other aspects, such as the effects of putative deleterious factors on epigenetic events such as methylation of CpGs in gene promoters, nucleosome preservation, histone modifications, and conservation of microRNA species. Most brains are appropriate for morphological approaches but not all brains are useful for certain biochemical and molecular studies.

Keywords DNA · RNA · Protein · Post-mortem delay · Brain bank · Oxidation · Epigenetics

I. Ferrer (✉) · A. Martinez · S. Boluda · M. Barrachina
Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica,
IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat
de Barcelona, carrer Feixa LLarga sn, 08907 Hospitalet de
LLobregat, Spain
e-mail: 8082ifa@comb.cat

I. Ferrer · A. Martinez · S. Boluda · M. Barrachina
CIBERNED, Barcelona, Spain

P. Parchi
Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di
Bologna, Bologna, Italy

Introduction

Brain banks have been created to obtain, classify, preserve and distribute nervous system tissue specimens and biological samples for research of diseases of the nervous system under very precise ethical settings. Brain banks are located worldwide and they have been proved to be excellent platforms and

facilities contributing significantly to improve our understanding of neurological disorders. Moreover, methodological protocols are geared to provide optimal tissue for research under established ethical and legal regulations (Tourtellotte et al. 1993; Bird and Vonsattel 1993; Daniel and Lees 1993; Newcombe and Cuzner 1993; Esiri 1993; Hulette et al. 1997; Morgello et al. 2001; Sarris et al. 2002; Niwa 2002; Haroutunian and Davis 2002; Hulette 2003; Murphy and Ravina 2003; Webster 2006; Nagatsu and Sawada 2007; Schmidt et al. 2007; Ravid 2008).

Yet human brain banks are mainly based on nervous tissue obtained after death and, therefore, several factors may interfere with tissue and molecular preservation of these samples. Some factors are related with pre-mortem events such as prolonged agonal state, hypoxia, acidosis, fever and seizures. Others are related with long post-mortem delay between death and sample processing for storage and fixation, temperature of the corpse, characteristics of the fixative solutions and processing of frozen material. Finally, a third group of factors seems unpredictable at the moment, and concerns unexpected variations from case to case or from region to region from the same brain, despite similar pre-mortem and post-mortem conditions. All these factors are of major concern in brain banks. Yet it is still difficult to predict adequate or inappropriate conditions for DNA, RNA and protein preservation solely on the basis of these parameters.

Several specific focused studies have dealt with the vulnerability of DNA, RNA and proteins in post-mortem samples (Wu et al. 2002; Ma et al. 2003; Hilbig et al. 2004; Kovács et al. 2005; Bazinet et al. 2005). However, more comprehensive analyses are often necessary to offer a wider perspective on the impact of deleterious factors on tissue degradation. Similarly, informations are needed on methods to detect degradation and on practical procedures to minimize pitfalls occurring when working with human post-mortem brain tissues. In this line, several studies have been undertaken, many of them within the scope of the European Brain Bank Network (BrainNet II), to identify possibilities and limitations of human brain tissues for DNA, RNA and protein studies, as well as to define methods that may improve tissue preservation and processing. The present review includes an update of general information and the result of personal experience in the management of samples for

molecular studies that may be useful for future research based on human post-mortem tissue obtained from brain banks and brain collections.

DNA preservation

DNA is relatively resistant to post-mortem degradation under appropriate conditions. This property is valuable in forensic pathology and paleontology, allowing limited genetic studies in tissues maintained for thousand of years (Marotta and Rollo 2002; Konomi et al. 2002; Paabo et al. 2004; Calacal et al. 2005; Luciani et al. 2006). However, DNA is vulnerable to degradation in liquid solutions, particularly fixatives used for tissue preservation in current pathological practice.

It is the general belief that frozen material, even when stored for years, is suitable for DNA studies (Krajick 2002; Rollo et al. 2006). Sub-optimal DNA preservation or even massive degradation, however, can be expected in tissues stored in formalin at room temperature for months or years (Koppelstaetter et al. 2005; Kunkle et al. 2006; Miething et al. 2006). This is mainly due to the progressive acidification of formalin into formic acid. The use of buffered formalin stabilizes the solution for a longer time than non-buffered formalin. Periodical renewal of the buffered fixative solution in samples stored for months or years reduces the deleterious effects of old formalin. Several studies have recently appeared with methods aimed to obtain the fixation of tissues with less damage to nucleic acids and to optimize DNA extraction and evaluation (Panaro et al. 2000; Coura et al. 2005; Kline et al. 2005; Rivero et al. 2006; Stanta et al. 2006). DNA preservation in paraffin blocks is variable but probably dependent on the type of fixative solution and on the length of time of tissue storage in the fixative before paraffin embedding.

A study by the European Brain Bank Network was recently carried out in order to: (1) compare DNA preservation in frozen, formalin-fixed and paraffin-embedded tissues stored for different periods; (2) study point mutations and triplet expansions in frozen, formalin-fixed and paraffin-embedded material stored for variable periods, and using different fixative solutions; (3) compare different methods to optimize DNA extraction and DNA amplification from sub-optimally preserved brain tissue (Ferrer et al. 2007a).

The study confirmed that DNA preservation is good and suitable for genetic studies in samples stored at -80°C for several years. Fresh-frozen tissue is the optimal method to preserve banked brain tissue for DNA recovery. The Alzheimer Disease Centres in the United States, as well as other brain banks in North America, Europe, Japan and Australia, already employ a system of storing both fresh-frozen and fixed tissue. The use of this model, in the context of a multi-institutional program for the banking of brain tissue, is further emphasized.

Acceptable results were also obtained in paraffin blocks provided that these blocks were produced after short fixation times in 4% buffered formalin. Sub-optimal or bad results occur in buffered formalin-fixed tissues stored for long periods. The shorter the time of buffered formalin fixation, the better the DNA preservation. Blocks produced up to one month after buffered formalin fixation are consistent with good DNA preservation, whereas DNA quality is sub-optimal or bad in samples from paraffin blocks produced several months or years after fixation. An additional key factor for short periods is the fixative solution itself: 4% buffered-formalin is better than 10% non-buffered formalin for DNA preservation. Formic acid treatment previous to paraffin embedding, as usually employed in the study of prion diseases, has devastating effects on DNA preservation unless the time of exposure is very short and it is followed by washing. Unfortunately, material stored for years in formalin is probably no longer suitable to study mutations. Therefore, production of paraffin blocks after a short buffered formalin fixation is strongly recommended.

Regarding protocols for DNA extraction, the best and most reproducible results were obtained in frozen, paraffin-embedded and formalin-fixed samples using the QIAmp Micro Qiagen method. GenomiphiTM and TaKaRa ExtagTM can be used in paraffin blocks and in cases fixed in formalin in which QIAmp Micro Qiagen failed Ferrer et al. 2007a).

Is formalin-fixed paraffin-embedded tissue suitable for the study of polymorphisms?

Randomized parallel studies of mutations and CAG repeats in frozen, formalin-fixed and formalin-fixed paraffin-embedded tissues have shown optimal

preservation in frozen tissue. However DNA preservation in formalin-fixed samples stored for long periods of time in formalin are more than sub-optimal. Formalin-fixed samples for short periods embedded in paraffin can be used although the preservation of DNA cannot be guaranteed Ferrer et al. 2007a).

Therefore, similar observations can be expected in the study of DNA polymorphisms. The study of *PRNP* codon 129, a methionine valine transition that has a critical role in the susceptibility and phenotypic expression of human prion diseases, was carried out in cases affected with prion disease from which frozen as well as formalin-fixed and formalin-fixed paraffin-embedded samples were available. DNA was extracted from de-waxed tissue sections or formalin-fixed brain using the Quiagen Kit for DNA extraction, whereas DNA from frozen samples was extracted with phenol-chloroform or with the Quiagen Kit. Studies carried out in two laboratories with different samples resulted in similar conclusions. In one laboratory, the identification of the exact polymorphism occurred in 3 of 7 formalin-fixed, formic acid-treated and paraffin-embedded tissue sections, and in 3 (2 of them different cases) of 7 tissue sections formalin-fixed for not less than one year. Comparison was made with frozen post-mortem brain tissue samples or with blood cells of the same individuals. In the other laboratory, the polymorphism was identified in 4 of 6 prion disease cases embedded in paraffin. Study of *PRNP* codon 129 was also examined in non-prion demented cases. The polymorphism was identified in 6 of 8 embedded cases and in 4 of 5 formalin-fixed cases. Good results were obtained only in cases with a very short fixation time; furthermore, results were more reliable in cases with better tissue preservation at autopsy. These results point to difficulties in the interpretation of polymorphisms in non-frozen post-mortem human brain and they are in line with previous studies (Kunkle et al. 2006) concluding that polymorphism determination on brain tissues fixed in formalin should not be encouraged.

Methylation of gene promoters

Beta-amyloid deposition in the form of amyloid (neuritic and diffuse) plaques, and tau hyperphosphorylation forming neurofibrillary tangles, neuropil

threads and aberrant neurites in neuritic plaques, are the major pathological substrates in cases with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease (AD). Amyloid plaque formation is a complex phenomenon which involves the cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by distinct secretase complexes, including presenilin 1 (PS1) and beta-site APP cleavage enzyme 1 (BACE-1). The expression of PS1 and BACE is regulated by methylation of their corresponding gene promoters (Fuso et al. 2005; Scarpa et al. 2006; Cavallaro et al. 2006). Reduced levels of methylcytosine in APP gene promoter have been observed in ageing and AD brains (Rogaev et al. 1994; West et al. 1995; Tohgi et al. 1999a). Moreover, the tau gene promoter is methylated with age, which, in turn, down-regulates its transcription activity (Tohgi et al. 1999b). These findings suggest that gene promoter methylation has a role in the expression of proteins related with the pathogenesis of AD and other neurodegenerative diseases. Regional differences in the methylation of gene promoters are crucial in the nervous system and they may account for region-specific functional specializations (Ladd-Acosta et al. 2007). However, it is not known whether post-mortem delay has any effect on the methylation of gene promoters.

Histone tail methylation and acetylation

Methylation and other covalent modifications of nucleosome core histones are key regulators of chromatin structure and function, including epigenetic control of gene expression. Little is known about the regulation of histone modifications at specific genomic loci in the human brain. High levels of histone 3-methyl-arginine-17, H3meR17, are associated with down-regulated metabolic gene expression in the prefrontal cortex of a subset of patients with schizophrenia (Akbarian et al. 2005). Differential gene expression patterns in prefrontal and cerebellar cortices are reflected by similar differences in H3-lysine 4 methylation in ionotropic and metabotropic glutamate receptor gene promoters (Stadler et al. 2005). These findings suggest that histone lysine methylation at gene promoters is involved in developmental regulation and maintenance of region-specific expression patterns of ionotropic and metabotropic glutamate receptors.

Preservation of methylation histone residues with post-mortem delay has recently been reported. The bulk of nucleosomal DNA remains attached to histones during the first 30 h after death. Immunoprecipitation with antibodies against methylated histones was at least 10-fold more effective in unfixed, micrococcal nuclease-digested samples, in comparison to extracts prepared by fixation and sonication. Moreover, histone methylation differences across various genomic sites were maintained within a wide range of autolysis times and tissue pHs (Huang et al. 2006).

Regarding possible effects of post-mortem delay on histone tail acetylation, it is worth pointing out that acetylation of histones may be triggered by hypoxia inherent to the post-mortem state of the tissue, as it also happens in the vicinity of infarcts. In this line, pharmacological inhibition of histone deacetylases increases histone acetylation and triggers pharmacological preconditioning effects against myocardial ischemic injury, and reduces ischemic injury in the rat and mouse brains (Ren et al. 2004; Faraco et al. 2006; Zhao et al. 2007). Further analysis is, however, necessary to determine whether histone tail acetylation as well as other covalent modifications described in histone tails, such as phosphorylation, are stable with post-mortem delay.

RNA preservation

Although some studies have suggested stability of human post-mortem brain RNA (Leonard et al. 1993; Cummings et al. 2001; Yasojima et al. 2001), many others have shown that RNA integrity is largely dependent on several factors, including the agonal state, hypoxia, and the post-mortem delay between death and tissue processing, among others (Yates et al. 1990; Ross et al. 1992; Harrison et al. 1995; Preece and Cairns 2003; Li et al. 2004; Tomita et al. 2004; Miller et al. 2004). Immediate immersion of the sample in Trizol reagent is currently used in many laboratories in order to improve RNA preservation. Hepes glutamic acid buffer-mediated organic solvent protection effect (HOPE) fixation has also been used successfully (Witchell et al. 2007).

Recent studies have emphasized that post-mortem delay and the pH of ventricular fluid are not predictive of RNA preservation (Ervin et al. 2007).

Although this may be true as a general consideration, different factors make RNA studies in post-mortem brain one of the most difficult scenarios because of unpredictable RNA suboptimal preservation. Furthermore, it is necessary to stress that agarose gels are not the best tools to analyze RNA preservation. Fine bioanalyzer and RNA microarray studies have been demonstrated to be more robust methods for checking RNA preservation.

Our first attempt to disclose RNA modifications related with post-mortem delay was to use RNA microarrays of the same human brain samples frozen at 2 h, or stored at 4°C or at room temperature for variable periods up to 24 h, and then frozen. The expression of several RNAs was reduced with post-mortem delay and this effect was dependent on the temperature of storage. In addition, the expression of a small number of RNAs was increased with post-mortem delay. These findings made it clear that RNAs were susceptible to post-mortem delay and temperature of storage, and therefore that measures must be taken to minimize artefacts (Buesa et al. 2004).

A second study was designed to learn about regional brain variations and methods to detect and minimize errors derived from differential mRNA degradation (Barrachina et al. 2006). None the cases initially included in that study had prolonged agonal state, pyrexia, hypoxia, coma or seizures; the post-mortem delay was between 2 and 16 h; and the pH of the cerebral tissue was between 6 and 7. Although agarose gel electrophoresis has generally been utilized in the past to reveal RNA smears in RNA isolated samples, this method is not sensitive enough when compared with modern technologies such as the Agilent 2100 BioAnalyzer. Parallel studies have demonstrated that apparent preserved RNA as observed in agarose gels turns to be of sub-optimal quality when analyzed with the bioanalyzer. Quality of RNA is categorized according to the RIN value. RIN values lower than 7 are usually considered not adequate for mRNA studies. However, RIN values between 6 and 7 may be still accepted depending on the specific mRNA. Not all mRNAs have the same vulnerability to degradation. As shown in Table 1, the study of the series revealed that (1) RIN values were not related with post-mortem interval between death and tissue processing; (2) Even with relatively short post-mortem delays, several brains showed

Table 1 RIN values of extracted mRNA from frozen post-mortem brain samples stored at -80°C for variable periods (no more than two years)

	p-m Delay	Frontal cortex	Gyrus cinguli	Amygdala	PD Braak	AD Braak
01		6.6	5.6	6.2	5, 6	0/0
02		6.4	5.9	6.1	5, 6	0/0
03		6.5	5.3	6.7	5, 6	0/A
04		3.8	3.6	4.2	5, 6	0
05		6.5	4.7	5.9	5, 6	0
06		3.1	2.2	2.8	5, 6	0
07		8.6	6.3	7.3	5, 6	0
08		8.0	7.4	8.0	5, 6	0
09		6.3	5.3	7.2	5, 6	0
10		8.3	7.3	9.0	5, 6	III/0
11		8.8	7.3	7.1	5, 6	II/0
12		6.1	5.3	7.2	5, 6	III/B
13		7.9	6.3	6.2	5, 6	III/B
14		5.6	4.8	5.2	5, 6	II/B
15		6.7	5.4	5.9	5, 6	II/0
16		8.1	8.2	7.8	5, 6	II/0
17		8.7	7.5	7.3	5, 6	III/0
18		6.3	4.6	4.8	5, 6	I/0
19		5.1	4.9	3.9	5, 6	II/C
20		7.1	3.6	7.3	5, 6	III/C
21		3.8	3.6	4.2	5, 6	II/C
22		9.3	8.2	8.2	3, 4	0/0
23		8.8	7.7	7.9	3, 4	0/0
24		8.6	7.8	8.3	3, 4	0/0
25		8.0	6.8	7.0	3, 4	0/0
26		7.4	6.7	6.3	3, 4	0/0

PD Braak indicates the stage of Parkinson's disease-related pathology staging according to Braak et al. 2003; AD Braak indicates the stage of neurofibrillary tangle (Roman numbers) and β -amyloid burden (senile plaques; letters) following the nomenclature of Braak and Braak 1999. Note that: (1) RIN values are not related with post-mortem interval between death and tissue processing; (2) Even with relatively short post-mortem delays, several brains show RIN values below the standards suitable for mRNA studies; (3) RIN values may vary from one region to another in the same brain; and (4) Usually, only a percentage (about 40% in the present series) of frozen samples is optimal for adequate mRNA studies (RIN values higher than 7: highlighted in bold)

values below the standards suitable for mRNA studies; (3) RIN values varied from one region to another in the same brain.

Since the reasons for these individual variations are not known, examination of RNA preservation

must be carried out in every individual subject of RNA expression studies.

Commonly used endogenous controls belong to the group of so-called “housekeeping” genes which ideally are constitutively expressed by all cell types and which are not affected by disease. For example, there is a certain concern regarding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression as a suitable endogenous control in the study of degenerative diseases of the nervous system because GAPDH protein is implicated in apoptosis and neurodegeneration (Tatton et al. 2000). In the same line, mRNA expression levels of β -actin and other genes regulating the expression of cytoskeletal proteins α - and β -tubulins might be considered sub-optimal controls, as β -actin and α - and β -tubulins might be down-regulated in degenerative diseases of the nervous system. Yet, mRNAs of β -actin, cyclophilin and GAPDH show little fluctuation among several CNS tissues and disease models (Medhurst et al. 2000). β -glucuronidase and β -actin have proved to be good endogenous controls because their expression levels show a small variation across a representative number of control and disease cases (Barrachina et al. 2006). However, RNA samples with RIN < 6 show reduced β -actin mRNA levels, whereas β -glucuronidase mRNA levels are not affected by RNA degradation (Barrachina et al. 2006).

Normalisation to total RNA concentration has been proposed when comparing tissue biopsies obtained from different individuals (Tricarico et al. 2002). However, human post-mortem brain presents a more complex scenario, as the individual study of each sample for RNA degradation is essential in control and diseased cases. Finally, normalisation with a particular control must also be monitored because RNAs are differentially degraded with post-mortem delay. For example, levels of superoxide dismutase 1 (SOD1) and metalloproteinase domain 22 (ADAM22) were apparently not modified when normalised with β -actin. Yet their expression levels were reduced with post-mortem delay when values were normalised with β -glucuronidase (Barrachina et al. 2006). For practical purposes, several putative housekeeping genes should be examined in parallel in order to obtain the correct normalization in the very specific scenario of study.

A third approach to increase our understanding on RNA preservation in the post-mortem brain has been

the study of brain RNA in experimental animals. Not only the post-mortem delay is reduced, as the samples are immediately processed for RNA preservation, but there is also no agonal state in this particular condition. RNA preservation is optimal under these conditions.

microRNA preservation

The study of microRNAs in diseases of the nervous system is very recent and only a few studies have been published, focused on schizophrenia (Burmistrova et al. 2007; Perkins et al. 2007; Hansen et al. 2007), Alzheimer’s disease (Lukiw 2007) and Parkinson’s disease (Kim et al. 2007). Study of microRNAs as regulators of RNA transcription is crucial in neurodegenerative diseases (Rogaev 2005; Hébert and de Stropper 2007; Nelson and Keller 2007). In contrast to RNAs, microRNAs are small molecules thought to be resistant to post-mortem artefacts and even to fixation. However, the in-vivo half-lives of specific microRNAs are not known, and their high uridine plus adenine content and their single-stranded structure when not complexed to target mRNA make them potentially labile to degradation (Lukiw 2007). Therefore, further studies are needed to clarify specific stability of microRNAs in post-mortem brain.

Brain protein preservation largely depends on the post-mortem delay and the post-mortem temperature of storage

The effects of post-mortem delay on protein preservation largely depend on the temperature of storage. This aspect has been studied by processing the same original brain sample with artificial accumulative post-mortem delay at various temperatures. Samples of the frontal cortex of cases were obtained at autopsy two hours after death. Part of the sample was immediately frozen at -80°C , whereas additional parts of the same sample were stored at room temperature, at 4°C or at 1°C for variable periods up to 48 h, and then frozen at -80°C . Consecutive samples of the same case were processed for gel electrophoresis and Western blotting using different

antibodies to selected proteins. Similar samples were also processed for bidimensional gel electrophoresis, in-gel digestion and mass spectrometry to pick up proteins which were differentially expressed over time Ferrer et al. 2007b).

Results in the first paradigm showed variable vulnerability among proteins. Some were vulnerable to degradation whereas others were relatively resistant. Among resistant proteins were subunits of the 20S and 19S proteasome, β -actin and active p38 kinase. Among vulnerable proteins were synaptic proteins (rab3a, rabphilin, α -synuclein), kinases (mitogen-activated protein kinases, stress activated protein kinases, cyclin-dependent kinase 5), trophic factors and trophic factor receptors, and β -tubulin.

The effect of the temperature of storage was remarkable. The majority of proteins analyzed in samples stored at room temperature showed marked protein degradation at 24 h. In contrast, most proteins in samples stored at 1°C were preserved at 48 h.

Since corpses are rarely or never stored at 1°C, it may be assumed that, even in the best scenarios of body storage at 4°C, cumulative protein degradation with post-mortem delay will be the rule. Preservation is worse with increased post-mortem delay at room temperature.

These observations have important implications. Gel electrophoresis and Western blotting applied to human post-mortem brains may produce tricky results depending on multiple factors: protein degradation might be not the same in all the samples examined, degradation may vary depending on the protein.

In addition, certain results have to be interpreted with caution. For example, degradation of soluble, normal α -synuclein is rather visible with post-mortem delay. However, α -synuclein aggregates are very resistant to degradation related with post-mortem delay. This may explain why Lewy bodies and neurites in Parkinson's disease and related disorders and in multiple system atrophy can be visualized by immunohistochemistry in tissue sections with poor tissue preservation albeit in the absence of the typical synaptic pattern of α -synuclein in the neuropil in contrast with optimally-preserved tissue sections. The present findings also confirm previous observations on the variable vulnerability of synaptic proteins by immunohistochemistry (Liu and Brun 1995) and Western blotting (Siew et al. 2004). Synaptophysin

is a resistant protein whereas synucleins, rabphilin, syntaxins and rab3a are not.

Similarly, tau is rapidly dephosphorylated in normal conditions, and dephosphorylation of normal tau occurs a few minutes after death because of the activity of phosphatases and calpain (Sorimachi et al. 1996). However, hyper-phosphorylated tau, as in Alzheimer's disease and tauopathies, is resistant to degradation. Therefore, neurofibrillary tangles, grains, astrocytic inclusions and coiled bodies can still be visualized in suboptimally preserved post-mortem tissue sections.

Bidimensional gel electrophoresis and mass spectrometry permit the discovery of variations in their expression levels of unexpected proteins. By using this approach, additional proteins were identified as vulnerable to post-mortem delay. Several proteins are vulnerable to post-mortem delay, including α -synuclein, β -synuclein, peroxiredoxin, ATP synthase and superoxide dismutase 1. Others are resistant, including several related with the energy metabolism such as glycogen 3-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase and aldolase A.

The use of bidimensional gels has confirmed the degradation of certain proteins with post-mortem delay, but has also permitted the identification of spots whose density increases with post-mortem delay (Crecelius et al. 2008). This is an unexpected and important finding as it might imply increased synthesis, reduced normal degradation or appearance of fragmented proteins. It must be admitted that little is known about these putative settings.

The reasons for selective preservation are not known and we have not found groups of specific proteins clustering in relation to families or functions, perhaps with the exception of members of the proteasome complex, proteases and cathepsin (Compaine et al. 1995).

In the same line, the effects of post-mortem delay (between 5 and 21 h) in the expression levels of G-proteins in human prefrontal cortex are variable depending on the protein. Under the same conditions, $G\alpha$ -i1, $G\alpha$ -i2, $G\alpha$ -S and $G\beta$ are stable whereas $G\alpha$ -q and $G\alpha$ -o are vulnerable to post-mortem delay (Li et al. 1996). Similarly, delay in tissue processing after death results in variable modifications in the expression levels of microtubule-associated proteins tau, MAP2, MAP1B and MAP5 in rat hippocampus (Schwab et al. 1994; Irving et al. 1997).

Effects of post-mortem delay on post-translational modifications of proteins

Protein tau phosphorylation

The identification of hyper-phosphorylated tau bands in sarkosyl-insoluble fractions allows to distinguish between different sporadic and familial tauopathies. Therefore, it is important to know whether and to what extent hyper-phosphorylated tau is modified with post-mortem delay. Previous studies have shown that the profile of hyperphosphorylated tau in sarkosyl-insoluble fractions in AD is characterized by 3 bands of 60 kDa, 64 kDa and 68 kDa, together with a small band of 74 kDa. In addition, several bands of lower molecular weight, representing truncated tau, are commonly observed. Enzymes involved in tau truncation are calpains, caspase 3 and 6 and thrombin (Gamblin et al. 2003; García-Sierra et al. 2003; Arai et al. 2005). Characterization of truncated tau may be approached by using specific antibodies to selected regions of tau, including the C-terminal, the N-terminal regions or distinct regions in-between.

Antibodies to tau-13 and N-terminal tau, which are directed to the N-terminal region, detect some bands between 60 and 36 kDa. Three of them, of about 50, 45 and 32 kDa, are better detected with tau-13. Antibodies to specific phosphorylation sites tau212 and tau214, which are directed to the core of tau protein, detect several bands between 60 and 2 kDa. Antibodies to phosphor-tau396 and tau422, both directed to the C-terminal domain, detect bands between 60 kDa and 24 kDa. A band of about 22 kDa is visualized only with C-terminal-directed antibodies (Santpere et al. 2006).

The effects of post-mortem delay in the phospho-tau band pattern in AD were examined using the same approach as for the other proteins.

The triplet of 68, 64 and 60 kDa is well preserved in samples stored at 4°C during the first 24 h. Decreased density and less resolution are found at 48 h. However, the typical pattern fades at 24 h in samples stored at room temperature and is no longer visible in samples with 48 h of post-mortem delay. In relation with the bands of lower molecular weight, the density of the bands is reduced at 24 h in samples stored at 4°C and is barely observed in samples stored at room temperature for the same time period (Santpere et al. 2006).

Protein oxidation and nitration

Oxidative stress and oxidative damage of proteins are major components in the pathogenesis of most diseases of the nervous system (Choi et al. 2005; Butterfield et al. 2006; Nunomura et al. 2006; Korolainen et al. 2006; Michel et al. 2007; Ilieva et al. 2007). Markers of lipoxidative and glycoxidative damage are currently used to reveal specific adducts on Western blots. Antibodies to malondialdehyde-lysine (MDA-L), hydroxynonenal (HNE) are used as lipoxidation markers; antibodies to advanced glycation end products (AGE), N-carboxymethyl-lysine (CML) and N-carboxyethyl-lysine (CEL) are employed as glycoxidation markers. Antibodies to nitrotyrosine (N-Tyr) are used as markers of nitration.

Samples of the frontal cortex from patients with AD have been subjected to progressive artificial post-mortem delay and examined in parallel with monodimensional gel electrophoresis and Western blotting by using several oxidation and nitration markers.

Although the pattern of bands differs from one case to another, as expected, depending on the stage of the disease, MDA-L, HNE, CEL and CML antibodies recognize several bands between 40 kDa and 120 kDa. The density and distribution of the bands is maintained during the first 8 h, but the density of selected bands increases or decreases from 20 h onwards (Fig. 1). This probably means that proteins are targets of oxidation during the post-mortem delay at the same time as other proteins degrade with post-mortem delay.

Similar results are observed with anti-N-Tyr antibodies. Nitration of certain proteins, as derived from increased density of bands, is found in some cases at 20 h of post-mortem delay onwards.

This observation has practical implications as studies of protein oxidative/nitrosative damage in post-mortem human brain can be hampered by a delayed interval between death and tissue processing.

The effects of post-mortem delay on protein function

The study of enzymatic activities preservation in the post-mortem brain with neurodegenerative diseases is of interest but challenging since enzymatic activities are affected by post-mortem delay (Garro et al.

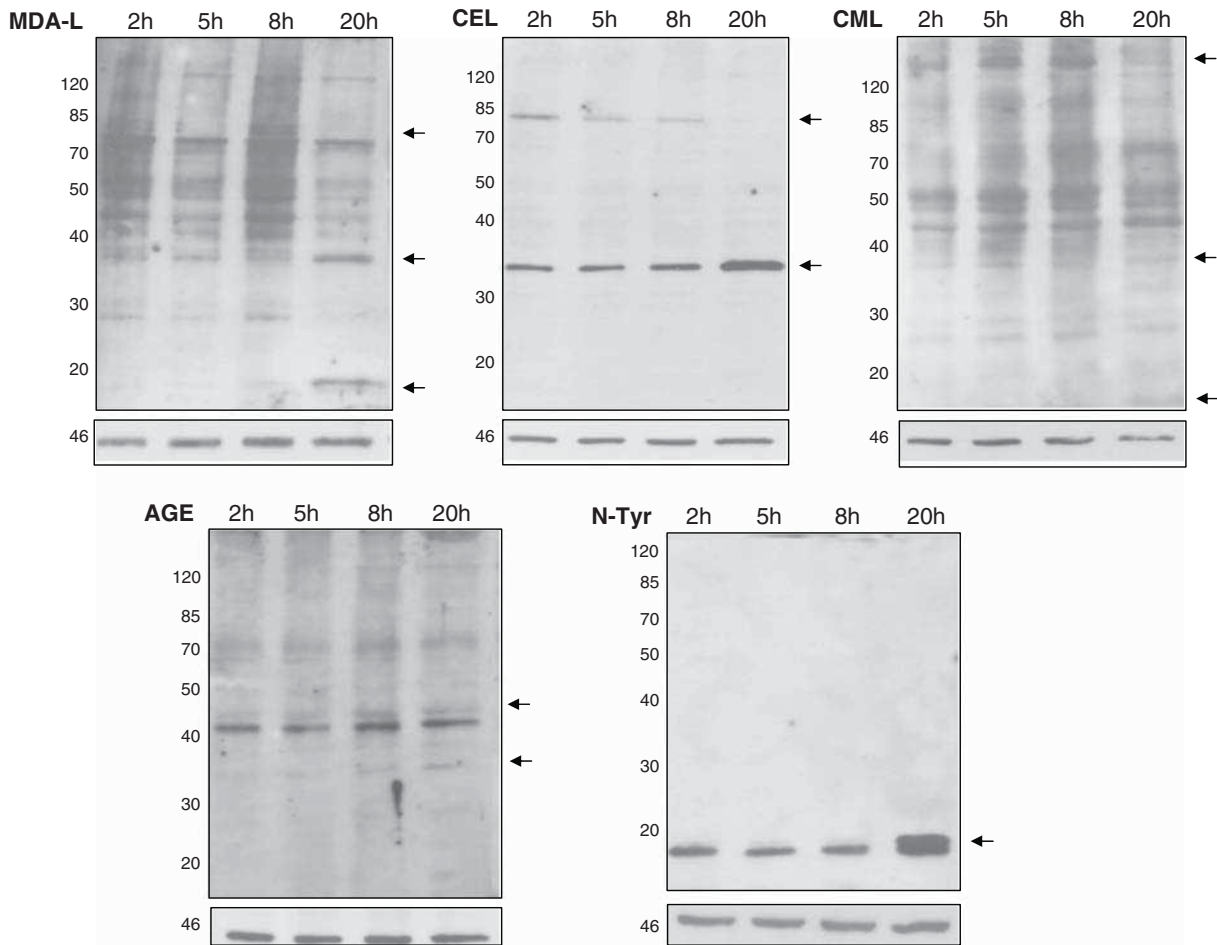


Fig. 1 Gel electrophoresis and Western blots to oxidative (MDA-L, CEL, CML, AGE) and nitrosative (N-Tyr) markers of the same sample from the frontal cortex frozen at 2 h after death or stored at room temperature after 5, 8 and 20 h and

then frozen at -80°C until use. Modification of the band profile patterns are seen at 20 h. These changes are represented either by reduced expression or by increased expression of selected bands (arrows)

2004). Metabolic functions are influenced by a number of factors, but mainly depend on the preservation of protein involved in a particular pathway. Thus, it makes sense to first study the profile of degradation with post-mortem delay of the proteins under study. Once it is established that protein levels are stable within a particular range of post-mortem delay, metabolic studies can be carried out with certain confidence in tissue samples keeping such strict conditions.

Proteasomal activities have been analyzed in the brains of cases with Huntington’s disease (Diaz-Hernández et al. 2003). Activation of the RAS-MAP kinase pathway which is implicated in tau hyperphosphorylation has been shown in Alzheimer’s

disease (Ferrer et al. 2001). Immunoprecipitated active stress-activated protein kinase (SAPK/JNK), p38 kinase and glycogen synthase kinase-3 β from sarkosyl-insoluble fractions of the frontal cortex in Alzheimer’s disease and Pick’s disease have the capacity to phosphorylate recombinant tau in vitro, thus indicating the presence of active tau kinases in AD and other tauopathies (Puig et al. 2004; Ferrer et al. 2005). Combined studies of receptor binding, RNA and protein expression and enzymatic activities allowed the demonstration of impaired metabotropic glutamate receptor/phospholipase C signalling pathway in the frontal cortex in Dementia with Lewy bodies, AD and Pick’s disease (Dalfó et al. 2004a, b, c; Albasanz et al. 2005; Dalfó et al. 2005). A similar

approach has identified up-regulation and activation of adenosine receptor 1 and adenosine receptor 2A in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease and Pick's disease, respectively (Albasanz et al. 2006; Rodríguez et al. 2006).

Similar levels of a particular protein do not necessarily mean, however, that there are similar properties in normal and diseased conditions. Pro-NGF extracted from the brain of AD cases induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR (Pedraza et al. 2005). Yet pro-NGF from AD and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis (Podlesniy et al. 2006).

Protein interactions

Several studies have shown abnormal protein interactions in disease states. These abnormalities may have functional implications. As an example, abnormal α -synuclein interaction with the synaptic protein rab3a is found in vulnerable regions in Lewy body diseases and multiple system atrophy (Dalfó et al. 2004b; Dalfó and Ferrer 2005). Similar abnormal interaction occurs in A30P α -synuclein transgenic mice bearing the 30 mutation (Dalfó et al. 2004c). This abnormal interaction may interfere with synaptic vesicle traffic and docking. Functional studies have shown retarded synaptic transmission in the hippocampus in the same transgenic mice (Steidl et al. 2003).

In spite of these findings, little is known about the effects of pre-mortem and post-mortem events on protein-protein interactions, and studies are necessary to elucidate these points. Not only may protein interactions be modified with post-mortem delay, but also transcription factors may translocate from the nucleus to the cytoplasm in the setting of delayed post-mortem tissue processing (Boutillier et al. 2007).

Concluding comments

Human post-mortem brain tissue is invaluable for the study of human diseases of the nervous system. Brain banks are facilities providing an interface for generous donation of nervous tissues and research in an attempt to increase our understanding of diseases of

the nervous system as well as to discover new diagnostic targets for the diagnosis of diseases and to procure new strategies to prevent, delay the course of and cure neurological and mental diseases. Correct management of brain banks is mandatory in all this process (Bell et al. 2008). Although every donated brain is a unique piece of information and subject of study, strict measures should be taken to understand the potentialities and limitations of post-mortem brain tissue for specific studies. Pre-mortem and post-mortem factors may interfere with molecular studies, and erroneous conclusions might be drawn as a consequence of disregarding possible sources of pitfalls and artefacts. Not all post-mortem tissues are suitable for DNA, RNA and protein studies; nor are all tissues appropriate for determinate functional or enzymatic assays. Special care must be taken to consider these circumstances when dealing with human post-mortem brain tissue for research.

Acknowledgements This work was supported by the European Commission under the Sixth Framework Programme (BrainNet Europe II, LSHM-CT-2004-503039; and INDABIP). We thank T. Yohannan for editorial help. Brain samples were obtained from the Institute of Neuropathology and Brain Bank following the guidelines and approval of the local ethics committees.

References

- Akbarian S, Ruehl MG, Bliven E, Luiz LA, Peranelli AC, Baker SP et al (2005) Chromatin alterations associated with down-regulated metabolic gene expression in the pre-frontal cortex of subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 62:829–840. doi:10.1001/archpsyc.62.8.829
- Albasanz JL, Dalfó E, Ferrer I, Martín M (2005) Impaired metabotropic glutamate receptor/phospholipase C signaling pathway in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies correlates with stage of Alzheimer's disease-related changes. *Neurobiol Dis* 20:685–693. doi:10.1016/j.nbd.2005.05.001
- Albasanz JL, Rodríguez A, Ferrer I, Martín M (2006) Adenosine A2A receptors are up-regulated in Pick's disease frontal cortex. *Brain Pathol* 16:249–255. doi: 10.1111/j.1750-3639.2006.00026.x
- Arai T, Guo J, McGeer P (2005) Proteolysis of non-phosphorylated and phosphorylated tau by thrombin. *J Biol Chem* 280:5145–5153. doi:10.1074/jbc.M409234200
- Barrachina M, Castaño E, Ferrer I (2006) TaqMan PCR assay in the control of RNA normalization in human post-mortem brain tissue. *Neurochem Int* 49:276–284. doi: 10.1016/j.neuint.2006.01.018
- Bazinnet RP, Lee HJ, Felder CC, Porter AC, Rapoport SI, Rosenberger TA (2005) Rapid high-energy microwave

- fixation is required to determine the anandamine (N-arachidonylethanolamine) concentration of rat brain. *Neurochem Res* 30:597–601. doi:10.1007/s11064-005-2746-5
- Bell JE, Alafuzoff I, Al-Sarraj S, Arzberger T, Bogdanovic N, Budka H, Dexter DT, Falkai P, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman SM, Giaccone G, Huitinga I, Ironside JW, Klioueva N, Kovacs GG, Meyronet D, Palkovits M, Parchi P, Patsouris E, Reynolds R, Riederer P, Roggendorf W, Seilhean D, Schmitt A, Schmitz P, Streichenberger N, Schwakber A, Kretschmar H (2008) Management of a 21st century brain bank: experience in the BrainNet Europe Consortium. *Acta Neuropathol* 115:497–507
- Bird ED, Vonsattel JP (1993) The development of a brain bank. *J Neural Transm* 39:17–23
- Boutillier S, Lannes B, Buée L, DELacourte A, Rouaux C, Mohr M, Bellocq JP, Sellal F, Larmet Y, Boutillier AL, Loeffler JP (2007) Sp3 and Sp4 transcription factor levels are increased in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 4:413–423. doi:10.1159/000107701
- Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: Peters A, Morrison JH (eds) *Cerebral cortex*, vol 14: neurodegenerative and age-related changes in structure and function of cerebral cortex. Kluwer Academic/Plenum Press, New York, pp 475–512
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197–211. doi:10.1016/S0197-4580(02)00065-9
- Buesa C, Maes T, Subirada F, Barrachina M, Ferrer I (2004) DNA chip technology in brain banks: confronting a degrading world. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1003–1014
- Burmistrova OA, Golstov AY, Abramova LI, Kaleda VG, Orlova VA, Rogaev EI (2007) MicroRNA in schizophrenia: genetic and expression analysis of miR-130b (22q11). *Biochemistry* 72:578–582
- Butterfield DA, Poon HF, Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB et al (2006) Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 22:223–232. doi:10.1016/j.nbd.2005.11.002
- Calacal GC, Delfin FC, Tan MM, Roewer L, Magtanong DL, Lara MC et al (2005) Identification of exhumed remains of fire tragedy victims using conventional methods and autosomal/Y-chromosomal short tandem repeat DNA profiling. *Am J Forensic Med Pathol* 26:285–291. doi:10.1097/01.paf.0000177338.21951.82
- Cavallaro RA, Fuso A, D'Anselmi F, Seminara L, Scarpa S (2006) The effect of S-adenosylmethionine on CNS gene expression studied by cDNA microarray analysis. *J Alzheimers Dis* 9:415–419
- Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L (2005) Oxidative modifications and aggregation of Cu, Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem* 280:11648–11655. doi:10.1074/jbc.M414327200
- Compaine A, Schein JD, Tabbs JS, Mohan PS, Nixon RA (1995) Limited proteolytic processing of the mature form of cathepsin D in human and mouse brain: postmortem stability of enzyme structure and activity. *Neurochem Int* 27:385–396. doi:10.1016/0197-0186(95)00020-9
- Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P (2005) An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 58:894–895. doi:10.1136/jcp.2004.021352
- Crecelius A, Götz A, Arzberger T, Fröhlich T, Arnold GJ, Ferrer I et al (2008) Assessing quantitative post-mortem changes in the grey white matter of the human frontal cortex proteome by 2D-DIGE. *Proteomics* 8:1276–1291. doi:10.1002/pmic.200700728
- Cummings TJ, Strum JC, Yoon LW, Szymanski MH, Hulette CM (2001) Recovery and expression of messenger RNA from post-mortem human brain tissue. *Mod Pathol* 14:1157–1161. doi:10.1038/modpathol.3880451
- Dalfó E, Ferrer I (2005) Alpha-synuclein binding to rab-3a in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 380:170–175. doi:10.1016/j.neulet.2005.01.034
- Dalfó E, Albasanz JL, Martín M, Ferrer I (2004a) Abnormal metabotropic glutamate receptor expression and signaling in the cerebral cortex in Diffuse Lewy body disease is associated with irregular alpha-synuclein/phospholipase C interactions. *Brain Pathol* 14:388–398
- Dalfó E, Barrachina M, Rosa JL, Ambrosio S, Ferrer I (2004b) Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse Lewy body disease. *Neurobiol Dis* 16:92–97. doi:10.1016/j.nbd.2004.01.001
- Dalfó E, Gómez-Isla T, Rosa JL, Nieto Bodelón M, Cuadrado Tejedor M, Barrachina M et al (2004c) Abnormal alpha-synuclein interactions with Rab proteins in alpha-synuclein A30P transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:302–313
- Dalfó E, Albasanz JL, Rodríguez A, Martín M, Ferrer I (2005) Abnormal group I metabotropic glutamate receptor expression and signaling in the frontal cortex in Pick disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:638–647
- Daniel SE, Lees AJ (1993) *Parkinson's Disease Society Brain Bank*, London: overview and research. *J Neural Transm* 39:165–172
- Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, Gomez-Ramos P, Moran MA, Castaño JG et al (2003) Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* 23:11653–11661
- Ervin JF, Heinzen EL, Cronin KD, Goldstein D, Szymanski MH, Bohmer KA et al (2007) Postmortem delay has minimal effect on brain RNA integrity. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:1093–1099. doi:10.1097/nen.0b013e31815c196a
- Esiri MM (1993) Brain banks: the Oxford experience. *J Neural Transm* 39:25–30
- Faraco G, Pancani T, Formentini L, Mascagni P, Fossati G, Leoni F et al (2006) Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol* 70:1876–1884. doi:10.1124/mol.106.027912
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Ribera R, Goutan E, Puig B et al (2001) Phosphorylated MAP kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in

- Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Pathol* 11:144–158
- Ferrer I, Gómez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribé E, Dalfó E et al (2005) Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2:3–18. doi:10.2174/1567205052772713
- Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J et al (2007a) Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol* 17:297–303. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00073.x
- Ferrer I, Santpere G, Arzberger T, Bell J, Blanco R, Boluda S et al (2007b) Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:35–46
- Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S (2005) S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* 28:195–204. doi:10.1016/j.mcn.2004.09.007
- Gamblin TC, Chen F, Abraha A, Miller R, Fu Y, Garcia-Sierra F et al (2003) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10032–10037. doi:10.1073/pnas.1630428100
- García-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry R, Binder LI (2003) Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 5:65–77
- Garro MA, López de Jesús M, Ruiz de Azua I, Callado LF, Meana JJ, Salles J (2004) Differential postmortem delay effect on agonist-mediated phospholipase C β activity in human cortical crude and synaptosomal brain membranes. *Neurochem Res* 29:1461–1465. doi:10.1023/B:NERE.0000026412.66508.14
- Hansen T, Olsen L, Lindow M, Jakobsen KD, Ullum H, Jonsson E et al (2007) Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology. *PLoS ONE* 9:1–7
- Haroutunian V, Davis KL (2002) Issues and perspectives on brain tissue banking. *Curr Psychiatry Rep* 4:233–244. doi:10.1007/s11920-996-0039-6
- Harrison PJ, Heath PR, Eastwood SL, Burnet PW, McDonald B, Pearson RC (1995) The relative importance of pre-mortem acidosis and post-mortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci Lett* 200:151–154. doi:10.1016/0304-3940(95)12102-A
- Hébert SS, De Strooper B (2007) Molecular biology miRNAs in neurodegeneration. *Science* 317:1179–1180. doi:10.1126/science.1148530
- Hilbig H, Bidmon HJ, Oppermann OT, Remmerbach T (2004) Influence of post-mortem delay and storage temperature on the immunohistochemical detection of antigens in the CNS of mice. *Exp Toxicol Pathol* 56:159–171. doi:10.1016/j.etp.2004.08.002
- Huang HS, Matevosian A, Jiang Y, Akbarian S (2006) Chromatin immunoprecipitation in postmortem brain. *J Neurosci Methods* 156:284–292. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.02.018
- Hulette CM (2003) Brain banking in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:715–722
- Hulette CM, Welsh-Bohmer KA, Crain B, Szymanski MH, Sinclair NO, Roses AD (1997) Rapid brain autopsy. The Joseph and Kathleen Bryan Alzheimer's Disease Research Center experience. *Arch Pathol Lab Med* 121:615–618
- Ilieva EV, Ayala V, Jove M, Dalfó E, Cacabelos D, Povedano M et al (2007) Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130:3111–3123. doi:10.1093/brain/awm190
- Irving EA, McCulloch J, Dewar D (1997) The effect of post-mortem delay on the distribution of microtubule-associated proteins tau, MAP2, and MAP5 in the rat. *Mol Chem Neuropathol* 30:253–271. doi:10.1007/BF02815102
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison Hannon G et al (2007) A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317:1179–1180. doi:10.1126/science.1148530
- Kline MC, Duewer DL, Redman JW, Butler JM (2005) Results from the NIST 2004 DNA quantitation study. *J Forensic Sci* 50:570–578
- Konomi N, Lebowitz E, Zhang D (2002) Comparison of DNA and RNA extraction methods for mummified tissues. *Mol Cell Probes* 16:445–451. doi:10.1006/mcpr.2002.0441
- Koppelstaetter C, Jennings P, Hochegger K, Perco P, Ischia R, Karkoszka H et al (2005) Effect of tissue fixatives on telomere length determination by qualitative PCR. *Mech Ageing Dev* 126:1331–1333. doi:10.1016/j.mad.2005.08.003
- Korolainen MA, Goldsteins G, Nyman TA, Alafuzoff I, Kostinaho J, Pirttilä T (2006) Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 27:42–53. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.11.010
- Kovács Z, Kékesi KT, Bobest M, Török T, Szilágyi N, Szidra T et al (2005) Post mortem degradation of nucleosides in the brain: comparison of human and rat brains for estimation of in vivo concentrations of nucleosides. *J Neurosci Methods* 148:88–93. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.04.012
- Krajick K (2002) Glacial research melting glaciers release ancient relics. *Science* 296:2142. doi:10.1126/science.296.5567.454
- Kunkle RA, Miller JM, Alt DP, Cutlip RC, Cockett NE, Wang S et al (2006) Determination of sheep prion gene polymorphisms from paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* 18:443–447
- Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabuncian S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T et al (2007) DNA methylation signatures within the human brain. *Am J Hum Genet* 81:1304–1315. doi:10.1086/524110
- Leonard S, Logel J, Luthman D, Casanova M, Kirch D, Freedman R (1993) Biological stability of mRNA isolated from human post-mortem brain collections. *Biol Psychiatry* 33:456–466. doi:10.1016/0006-3223(93)90174-C
- Li X, Greenwood AF, Powers R, Jope RS (1996) Effects of postmortem interval, age, and Alzheimer's disease on

- G-proteins in human brain. *Neurobiol Aging* 17:115–122. doi:10.1016/0197-4580(95)02023-3
- Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, Tomita H, Evans SJ, Choudary PV et al (2004) Systematic changes in gene expression in post-mortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum Mol Genet* 13:609–616. doi:10.1093/hmg/ddh065
- Liu X, Brun A (1995) Synaptophysin immunoreactivity is stable 36 h postmortem. *Dementia* 6:211–217. doi:10.1159/000106949
- Luciani S, Fornaciari G, Rickards O, Labarga CM, Rollo F (2006) Molecular characterization of a pre-Columbian mummy and in situ coprolite. *Am J Phys Anthropol* 129:620–629. doi:10.1002/ajpa.20314
- Lukiw WJ (2007) Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease. *Neuroreport* 18:297–300. doi:10.1097/WNR.0b013e3280148e8b
- Ma JK, Zhu HE, Piletz JE (2003) Effect of postmortem delay on imidazoline receptor-binding proteins in human and mouse brain. *Ann N Y Acad Sci* 1009:341–346. doi:10.1196/annals.1304.043
- Marota I, Rollo F (2002) Molecular paleontology. *Cell Mol Life Sci* 59:97–111. doi:10.1007/s00018-002-8408-8
- Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ, Pangalos MN (2000) The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 98:9–20. doi:10.1016/S0165-0270(00)00178-3
- Michel TM, Frangou S, Thiemeier D, Camara S, Jecel J, Nara K et al (2007) Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder—a postmortem study. *Psychiatry Res* 151:145–150. doi:10.1016/j.psychres.2006.04.013
- Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J (2006) Effect of fixation for the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *J Histochem Cytochem* 54:371–374. doi:10.1369/jhc.5B6726.2005
- Miller CL, Diglisic S, Leister F, Webster M, Yolken RH (2004) Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of post-mortem human brain tissue. *Biotechniques* 36:628–633
- Morgello S, Gelman BB, Kozlowski PB, Vinters HV, Masliah E, Cornford M et al (2001) The national NeuroAIDS tissue consortium. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:326–335. doi:10.1046/j.0305-1846.2001.00334.x
- Murphy DD, Ravina B (2003) Brain banking for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 16:459–463. doi:10.1097/00019052-200308000-00003
- Nagatsu T, Sawada M (2007) Biochemistry of post-mortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J Neural Transm* 72:113–120
- Nelson PT, Keller JN (2007) RNA in brain disease: no longer just “the messenger in the middle”. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:461–468. doi:10.1097/01.jnen.0000240474.27791.f3
- Newcombe J, Cuzner ML (1993) Organization and research applications of the UK Multiple Sclerosis Society Tissue Bank. *J Neural Transm* 39:155–163
- Niwa S (2002) Establishment of the systematic Brain Bank Network for studies of mental disorders. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 104:152–157
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:631–641. doi:10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf
- Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N et al (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38:645–679. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143214
- Panaro NJ, Yuen PK, Sakazume T, Fortina P, Kricka LJ, Wilding P (2000) Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. *Clin Chem* 46:1851–1853
- Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arévalo JC, Lee R, Hempstead B et al (2005) Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol* 166:533–543
- Perkins DO, Jeffries CD, Jarskog LF, Thomson JM, Woods K, Newman MA et al (2007) microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorders. *Genome Biol* 8(R27):1–11. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r27
- Podlesniy P, Kichev A, Pedraza C, Saurat J, Encinas M, Perez B et al (2006) Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis. *Am J Pathol* 169:119–131. doi:10.2353/ajpath.2006.050787
- Preece P, Cairns NJ (2003) Quantifying mRNA in post-mortem human brain: influence of gender, age at death, post-mortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Brain Res Mol Brain Res* 118:60–71. doi:10.1016/S0169-328X(03)00337-1
- Puig B, Viñals F, Ferrer I (2004) Active stress kinase p38 enhances and perpetuates abnormal tau phosphorylation and deposition in Pick's disease. *Acta Neuropathol* 107:185–189. doi:10.1007/s00401-003-0793-z
- Ravid R (2008) Standard operating procedures, ethical and legal regulations in BTB (Brain/Tissue/Bio) banking: what is still missing? *Cell Tissue Bank* 9(2):121–137
- Ren M, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM (2004) Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 89:1358–1367. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02406.x
- Rivero ER, Neves AC, Siklva-Valenzuela MG, Sousa SO, Nunes FD (2006) Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 202:523–529. doi:10.1016/j.prp.2006.02.007
- Rodríguez A, Martín M, Albasanz JL, Barrachina M, Espinosa JC, Torres JM et al (2006) Adenosine A1 receptor protein levels and activity is increased in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease and in Bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:964–975
- Rogaev EI (2005) Small RNAs in human brain development and disorders. *Biochemistry* 70:1404–1407
- Rogaev EI, Lukiw WJ, Lavrushina O, Rogaeva EA, George-Hyslop PH (1994) The upstream promoter of the beta-amyloid precursor protein gene (APP) shows differential patterns of methylation in human brain. *Genomics* 22:340–347. doi:10.1006/geno.1994.1393

- Rollo F, Ermini L, Luciani S, Marota I, Olivieri C, Luiselli D (2006) Fine characterization of the Iceman's mtDNA haplogroup. *Am J Phys Anthropol* 130:557–564. doi:10.1002/ajpa.20384
- Ross BM, Knowler JT, McCulloch J (1992) On the stability of messenger RNA and ribosomal RNA in the brains of control human subjects and patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 58:1810–1819. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb10057.x
- Santpere G, Puig B, Ferrer I (2006) Low molecular weight species of tau in Alzheimer's disease are dependent on tau phosphorylation sites but not on delayed post-mortem delay in tissue processing. *Neurosci Lett* 399:106–110. doi:10.1016/j.neulet.2006.01.036
- Sarris M, Garrick TM, Sheedy D, Harper CG (2002) Banking for the future: an Australian experience in brain banking. *Pathology* 34:225–229. doi:10.1080/00313020220131260
- Scarpa S, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Fusco A (2006) Gene silencing through methylation: an epigenetic intervention on Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 9:407–414
- Schmidt A, Bauer M, Heinsen H, Feiden W, Falkai P, Alafuzoff I et al (2007) How a neuropsychiatric brain bank should be run: a consensus paper of Brainnet Europe II. *J Neural Transm* 114:527–537. doi:10.1007/s00702-006-0601-8
- Schwab C, Bondada V, Sparks DL, Cahan LD, Geddes JW (1994) Postmortem changes in the levels and localization of microtubule-associated proteins (tau, MAP2 and MAP1B) in the rat and human hippocampus. *Hippocampus* 4:210–225. doi:10.1002/hipo.450040212
- Siew LK, Love S, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ (2004) Measurement of pre- and post-synaptic proteins in cerebral cortex: effects of post-mortem delay. *J Neurosci Methods* 139:153–159. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.04.020
- Sorimachi Y, Harada K, Yoshida K (1996) Involvement of calpain in postmortem proteolysis in the rat brain. *Forensic Sci Int* 81:165–174. doi:10.1016/S0379-0738(96)01981-0
- Stadler F, Kolb G, Rubusch L, Baker SP, Jones EG, Akbarian S (2005) Histone methylation at gene promoters is associated with developmental regulation and region-specific expression of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in human brain. *J Neurochem* 94:324–336. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03190.x
- Stanta G, Mucelli SP, Petrera F, Bonin S, Bussolati G (2006) A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues. *Diagn Mol Pathol* 15:115–123. doi:10.1097/00019606-200606000-00009
- Steidl JV, Gómez-Isla T, Mariash A, Ashe KH, Boland LM (2003) Altered short-term hippocampal plasticity in mutant synuclein transgenic mice. *Neuroreport* 14:219–223. doi:10.1097/00001756-200302100-00012
- Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Elstner M, Leesch W, Jagodzinski FB, Stupak DP et al (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. *J Neural Transm* 60:77–100
- Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Genda Y, Ukitsu M (1999a) Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 70:288–292. doi:10.1016/S0169-328X(99)00163-1
- Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Ukitsu M, Genda Y (1999b) The methylation status of cytosines in a tau gene promoter region alters with age to downregulate transcriptional activity in human cerebral cortex. *Neurosci Lett* 275:89–92. doi:10.1016/S0304-3940(99)00731-4
- Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, Evans SJ, Choudary PV, Li J et al (2004) Effect of agonal and post-mortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of post-mortem human brain. *Biol Psychiatry* 55:346–352. doi:10.1016/j.biopsych.2003.10.013
- Tourtellotte WW, Rosario IP, Conrad A, Syndulko K (1993) Human neuro-specimen banking 1961–1992. The National Neurological Research Specimen Bank (a donor program of pre- and post-mortem tissues and cerebrospinal fluid/blood; and a collection of cryopreserved human neurological specimens for neuroscientists). *J Neural Transm* 39:5–15
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M et al (2002) Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 309:293–300. doi:10.1016/S0003-2697(02)00311-1
- Webster MJ (2006) Tissue preparation and banking. *Prog Brain Res* 158:3–14. doi:10.1016/S0079-6123(06)58001-X
- West RL, Lee JM, Maroun LE (1995) Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci* 6:141–146. doi:10.1007/BF02736773
- Witchell J, Varshney D, Gajjar T, Wangoo A, Goyal M (2008) RNA isolation and quantitative PCR from HOPE- and formalin-fixed bovine lymph node tissues. *Pathol Res Pract* 204(2):105–111
- Wu KH, Penfold PL, Billson FA (2002) Effects of post-mortem delay and storage duration on the expression of GFAP in normal human adult retinae. *Clin Exp Ophthalmol* 309:200–207. doi:10.1046/j.1442-9071.2002.00515.x
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL (2001) High stability of mRNAs post-mortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Brain Res Prot* 8:212–218. doi:10.1016/S1385-299X(01)00119-2
- Yates CM, Butterworth J, Tennant MC, Gordon A (1990) Enzyme activities in relation to pH and lactate in post-mortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J Neurochem* 55:1624–1630. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb04948.x
- Zhao TC, Cheng G, Zhang LX, Tseng YT, Padbury JF (2007) Inhibition of histone deacetylases triggers pharmacologic preconditioning effects against myocardial ischemic injury. *Cardiovasc Res* 76:473–481. doi:10.1016/j.cardiores.2007.08.010

2. Glycolitic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal cortex and oxidative damage of these proteins is increased in progressive supranuclear palsy

A. Martínez, E. Dalfó, G. Muntané, I. Ferrer.

J Neural Transm. 2008;115(1):59-66. Epub 2007 Aug 21.

La paràlisi supranuclear progressiva (PSP) és una patologia neurodegenerativa caracteritzada per pèrdua neuronal i gliosi, principalment en els nuclis subcorticals però també en l'escorça cerebral. A més a més de la pèrdua de neurones aquestes presenten dipòsits de tau hiperfosforilat, com també els astròcits i els cossos en espiral. S'havia descrit en treballs anteriors, un increment de productes d'oxidació en el nucli subtalàmic i també en l'escorça frontal de mostres de pacients de PSP.

En el present estudi es va examinar la lesió oxidativa en l'escorça frontal de 7 casos de PSP comparats amb 8 casos controls d'edats semblants. Gràcies a l'anàlisi amb gels en electroforesi i western blot es va observar un increment de la immunoreactivitat de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) en unes bandes d'entre 40 i 50 kDa en l'escorça frontal de les mostres de PSP, comparant amb els respectius controls. La identificació d'aquestes proteïnes, per gels bidimensionals i western blot junt amb l'anàlisi d'espectrometria de masses, van mostrar que les proteïnes modificades per l'HNE eren la fosfoglicerat cinasa-1 (FGC-1) i la fructosa difosfat aldolasa A (aldolasa A). La FGC-1 es va detectar en tots els casos patològics i l'aldolasa A en 4 dels 7 casos de PSP, a la vegada es va veure la presència d'aquests dos enzims modificats en 3 dels 8 casos controls analitzats. Per immunohistoquímica es va veure la localització de l'aldolasa A en les neurones i en els astròcits i, en el cas de la FGC-1, principalment en els astròcits.

Aquests resultats mostren que la FGC-1 i l'aldolasa A són dianes d'oxidació en l'escorça frontal en mostres de cervells humans envellits i que aquesta lesió oxidativa està considerablement més augmentada en l'escorça frontal de casos diagnosticats amb PSP.

Glycolytic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal cortex and oxidative damage of these proteins is increased in progressive supranuclear palsy

A. Martínez, E. Dalfó, G. Muntané, I. Ferrer

Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Received 13 February 2007; Accepted 28 July 2007; Published online 21 August 2007
© Springer-Verlag 2007

Summary. Progressive supranuclear palsy (PSP) is a neurodegenerative disorder pathologically characterized by neuronal loss and gliosis mainly in specific subcortical nuclei, but also in the cerebral cortex. In addition to neuron loss, hyperphosphorylated tau deposition is found in neurons, astrocytes and coiled bodies. Limited studies have shown that certain oxidative products are increased in the PSP brain. The present study examines oxidative damage in the frontal cortex in 7 PSP compared with 8 age-matched controls. Western blotting of the frontal cortex showed increased 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-immunoreactive bands between 40 and 50 kDa in PSP cases. Bi-dimensional gel electrophoresis and Western blotting, together with mass spectrometry, were used to identify HNE-modified proteins. Oxidized phosphoglycerate kinase 1 (PGK-1) and fructose bisphosphate aldolase A (aldolase A) were identified in all cases and 4 of 7 PSP cases, respectively. In contrast, PGK-1 and aldolase A were oxidized in 3 of 8 controls. Immunohistochemistry revealed the localization of aldolase A in neurons and astrocytes, and PGK-1 mainly in astrocytes. These findings show that PGK-1 and aldolase A are targets of oxidation in the frontal cortex in the aged human cerebral cortex and that oxidative damage of these proteins is markedly increased in the frontal cortex in PSP.

Keywords: Progressive supranuclear palsy; oxidative stress; phosphoglycerate kinase 1; fructose bisphosphate aldolase A; astrocytes

Introduction

Progressive supranuclear palsy (PSP) is a degenerative disease manifested with rigidity, loss of balance and unsteady gait, frequent falls, bradykinesia, abnormal eye movements, pseudobulbar palsy, mood and personality disorders, and dementia (Morris et al. 2002; Litvan 2004; Rampello

et al. 2005; Scaravilli et al. 2005). The disease is pathologically characterized by atrophy of the midbrain, including superior colliculi, de-pigmentation of the substantia nigra and locus ceruleus, and atrophy of the pallidum, subthalamic nucleus, thalamus, and frontal cortex. Neurofibrillary tangles (NFTs) and neurons with pre-tangles, as well as neuropil threads, are typically encountered in the striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, nucleus basalis of Meynert, several nuclei of the midbrain, pons and dentate nuclei, together with variable NFTs and pre-tangles in the hippocampus, para-hippocampus and isocortex. In addition, tufted astrocytes and coiled bodies in oligodendrocytes are markers of glial involvement in PSP (Litvan et al. 1996; Ikeda et al. 1998; Komori 1999; Dickson 2001; Haw and Agid 2001; Tawana and Ramsden 2001). Hyper-phosphorylated tau, predominantly composed of 4R isoforms, is accumulated in neurons, astrocytes and oligodendrocytes in PSP, and this biochemical hallmark characterizes PSP as a tauopathy (Spillantini and Goedert 1998; Buee et al. 2000; Delacourte and Buee 2000; Lee et al. 2001; Puig et al. 2005).

Oxidative stress has been proposed as playing an important role in the pathogenesis of PSP (Litvan 2004; Rampello et al. 2005). Early studies disclosed high levels of malondialdehyde (MDA), a well-established marker of lipid peroxidation, in the subthalamic nucleus in PSP (Albers et al. 1999). Later, increased MDA levels, and increased levels of 4-hydroxynonenal (HNE), another marker of lipid peroxidation, were reported in the frontal cortex and midbrain tissues, respectively, in PSP cases (Albers

Correspondence: Isidre Ferrer, Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, carrer Feixa Llarga sn, Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain
e-mail: 8082ifa@comb.es

et al. 2000; Odetti et al. 2000). Increased levels of the antioxidant superoxide dismutase 1 (SOD1) were found in several brain regions, whereas increased levels of SOD2 were only encountered in the subthalamic nucleus in PSP cases (Cantuti-Castelvetri et al. 2002).

The present study is intended to increase our understanding of oxidative damage and to identify possible targets of oxidation in the frontal cortex in PSP. For this purpose mono- and bi-dimensional gel electrophoresis and Western blotting, followed by in-gel digestion of selected spots and mass spectrometry, were used in 7 cases of PSP and 8 age-matched controls. HNE adducts occurred in phosphoglycerate kinase 1 (PGK 1) and fructose biphosphate aldolase A in aged human cerebral cortex, and were increased in PSP cases.

Materials and methods

Tissue samples

Brain tissue was obtained as a result of a generous donation for research to the University of Barcelona and Institute of Neuropathology Brain Banks, and following strict criteria of full disclosure and approval designed by the ethics committees of the University of Barcelona and the Hospital Universitari de Bellvitge. Seven sporadic PSP cases were selected for this study. In addition to typical clinical data including parkinsonism, frequent falls and vertical palsy of the gaze, all of them have language deficits and moderate frontosubcortical dysfunction accompanied by grasping and frontal reflexes, and emotional lability. Frontosubcortical dysfunction was neuropsychologically analyzed and characterized by altered attention, preserved orientation, impaired verbal, visual, recent and remote memory, mild or moderate loss of constructive and symbolic praxis, preservation of gnosias, and moderate impairment of calculation. Dependence on others for daily activities and moderate instrumental incapacity (as tested with the RDRS, and Lawton and Brody tests) occurred in all cases. Cortical atrophy, as revealed with CT and MRI, and/or reduced perfusion predominating in the

frontal lobes, as revealed with SPECT, were recorded in every case. The duration of the disease was between 4 and 7 years, and the post-mortem delay between death and processing between 4 and 13 h. At autopsy, half of each brain was fixed in 10% formalin, while the other half was cut in coronal sections 1 cm thick, frozen on dry ice and stored at -80°C until use. In addition, samples of the frontal cortex (area 8) were fixed in buffered 4% paraformaldehyde for 48 h, then cryoprotected in 30% saccharose, and frozen at -80°C . Clinical and neuropathological details of these cases are summarized in Table 1. Frozen material was stored for 6–12 months at -80°C , depending on the case. This interval did not have an apparent influence on tissue preservation for biochemical studies (unpublished observations). In addition, eight aged-matched controls were processed in parallel. No neurological signs and symptoms, evidence of metabolic or infectious disease were observed during life. The post-mortem delay was between 2 and 18 h. As in PSP cases, the pH of the brain tissue was between 6.8 and 7. The neuropathological study did not reveal abnormalities following the examination of the same regions and using the same battery of techniques as those utilized in diseased cases.

Gel electrophoresis and western blotting

Brain samples (0.1 g) of the frontal cortex from PSP and control cases were homogenized in 1 ml of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate and Complete protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Systems, Barcelona, Spain) and centrifuged at 5000 rpm (2600 g) for 10 min at 4°C . The pellets were discarded and protein concentrations of the supernatants were determined by BCA (bicinchoninic acid) method with bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Barcelona, Spain) as a standard.

Samples containing 30 μg of protein were loaded onto 10% acrylamide gels and proteins were separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) and then transferred to nitrocellulose membranes (200 mA/gel for 90 min). After transfer, the membranes were treated with NaBH_4 ; they were washed for 5 min in Tris-buffer saline (TBS) three times and incubated for 30 min with NaBH_4 10 mM. Then the membranes were blocked with 5% skimmed milk in TBS-T buffer (100 mM Tris-buffered saline, 140 mM NaCl and 0.1% Tween 20, pH 7.4) for 1 h at room temperature and incubated with the primary antibody in TBS-T-3% bovine serum albumin (BSA) at 4°C overnight. The membranes were incubated with rabbit polyclonal anti-HNE antibody (Calbiochem, Barcelona, Spain). Later, the membranes were washed for five minutes in TBS-T three times and then incubated for 45 min at room temperature with the corresponding secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako, Barcelona, Spain) at a dilution of 1:1000, and then washed in TBS-T for 30 min. Immunoreactivity was detected with the chemiluminescence ECL method (Amersham, Barcelona, Spain). The monoclonal antibody to β -actin (Sigma, Madrid, Spain) was used at a dilution of 1:10,000 as a control of protein loading.

Densitometry and statistical processing of data

Protein expression levels were determined by densitometry of the bands using Total laboratory v2.01 software. This software detects the bands obtained by Western blot and gives individual values which are dependent on the light quantification of the corresponding band. Measurements are expressed as arbitrary units. The results were normalized for β -actin. The numerical data obtained from PSP and the corresponding controls were statistically analyzed using the Student *t*-test. Asterisk indicates *p* values < 0.05 .

2D gel electrophoresis

In the first dimension electrophoresis, samples were applied onto 7 cm pH 3–10 nonlinear gradient ReadyStrip IPG strips (Bio-Rad) for isoelectric

Table 1. Summary of the cases studied in the present series

Case	Age	Gender	Post-mortem delay	Diagnosis
1	71	M	4	PSP
2	65	F	9	PSP
3	69	M	9	PSP
4	67	M	9	PSP
5	65	F	6	PSP
6	68	F	13	PSP
7	72	F	4	PSP
8	58	M	4	C
9	79	M	7	C
10	85	M	6	C
11	73	F	5	C
12	66	M	2	C
13	70	M	13	C
14	65	M	4	C
15	18	F	18	C

Age in years; Post-mortem delay in hours; *diagnosis* neurological and neuropathological diagnosis, *PSP* progressive supranuclear palsy; *C* no neurological and neuropathological lesions.

focusing (IEF). The strips were actively re-hydrated at 50 V for 16 h and the proteins were focused at 300 V for 2 h, after which the voltage was gradually increased to 500 V for 2 h. Focusing was continued at 1000 V for 2 h and at 8000 V for 18 h. After focusing, the IEF strips were stored at -80°C until the second dimension electrophoresis was performed.

For the second dimension electrophoresis, IPG strips were equilibrated for 10 min in 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) containing 6 M urea, 1% (wt/v) SDS (sodium dodecyl sulfate), 30% (v/v) glycerol, and 2% dithiothreitol, and then re-equilibrated for 10 min in the same buffer containing 2.5% iodacetamide. The strips were placed on 10% polyacrilamide gels, together with standards (Fermentas, Ontario, Canada) at 20 mA/gel 2. For the second dimension, two gels from the same case were run in parallel. One replicate was stained with silver and the other replicate was transferred to a nitrocellulose membrane (200 mA/gel for 90 min). For gel staining, a mass spectrometry-modified silver staining method (Amersham) was used as described by the manufacturer. Transferred nitrocellulose membranes were processed for blotting. After incubation with 5% skimmed milk in TBS-T buffer for 1 h at room temperature, nitrocellulose membranes were incubated with anti-HNE (Calbiochem), used at dilution of 1, 1000. Membranes were also incubated with rabbit anti-phosphoglycerate kinase 1 (Abgent, San Diego, CA, USA) or goat anti-fructose biphosphate aldolase A (Novus Biologicals, Littleton, USA) antibodies used at dilutions of 1:150 and 1:10,000, respectively. The immunoreaction was visualized as previously.

In-gel digestion

Proteins were in-gel digested with trypsin (Promega, Barcelona, Spain) in the automatic Investigator ProGest robot of Genomic Solutions. Briefly, excised gel spots were washed sequentially with ammonium bicarbonate buffer and acetonitrile. Proteins were reduced with 10 mM DTT (dithiothreitol) solution for 30 min and alkylated with 100 mM solution of iodine acetamide. After sequential washings with buffer and acetonitrile, proteins were digested overnight at 37°C with trypsin 0.27 nM. Tryptic peptides

were extracted from the gel matrix with 10% formic acid and acetonitrile. The extracts were pooled and dried in a vacuum centrifuge.

Acquisition of MS and MS/MS spectra

Proteins manually excised from the 2D gels were digested and analyzed by CapLC-nano-ESI-MS-MS mass spectrometry. The tryptic digested peptide samples were analyzed using on-line liquid chromatography (CapLC, Micromass-Waters, Manchester, UK) coupled to tandem mass spectrometry (Q-TOF Global, Micromass-Waters). Samples were resuspended in 12 μl of 10% formic acid solution and 4 μl was injected for chromatographic separation into a reverse-phase capillary C_{18} column (75 μm of internal diameter and 15 cm in length, PepMap column, LC Packings, Amsterdam, The Netherlands). The eluted peptides were ionized via coated nano-ES needles (PicoTipTM, New Objective, Woburn, USA). A capillary voltage of 1800–2200 V was applied together with a cone voltage of 80 V. The collision in the CID (collision-induced dissociation) was 25–35 eV and argon was employed as the collision gas. Data were generated in PKL file format and submitted for database searching in MASCOT server (Matrix Science, USA) using the NCBI database with the following parameters: trypsin enzyme, 1 missed cleavage, carbamidomethyl (C) as fixed modification and oxidized (M) as variable modification, and mass tolerance of 150–250 ppm.

Probability-based MOWSE score was used to determine the level of confidence in the identification of specific isoforms from the mass spectra. This probability equals $10^{-(\text{Mowse score}/10)}$. Mowse scores greater than 50 were considered to be of high confidence of identification.

Immunohistochemistry to phosphoglycerate kinase 1 and bisphosphate aldolase A

Cryostat sections 14 microns thick of cryoprotected frontal cortex were processed free-floating with the EnVision+ system peroxidase procedure (Dako, Barcelona, Spain) in every case. Control samples were

Western blotting of anti-HNE antibody

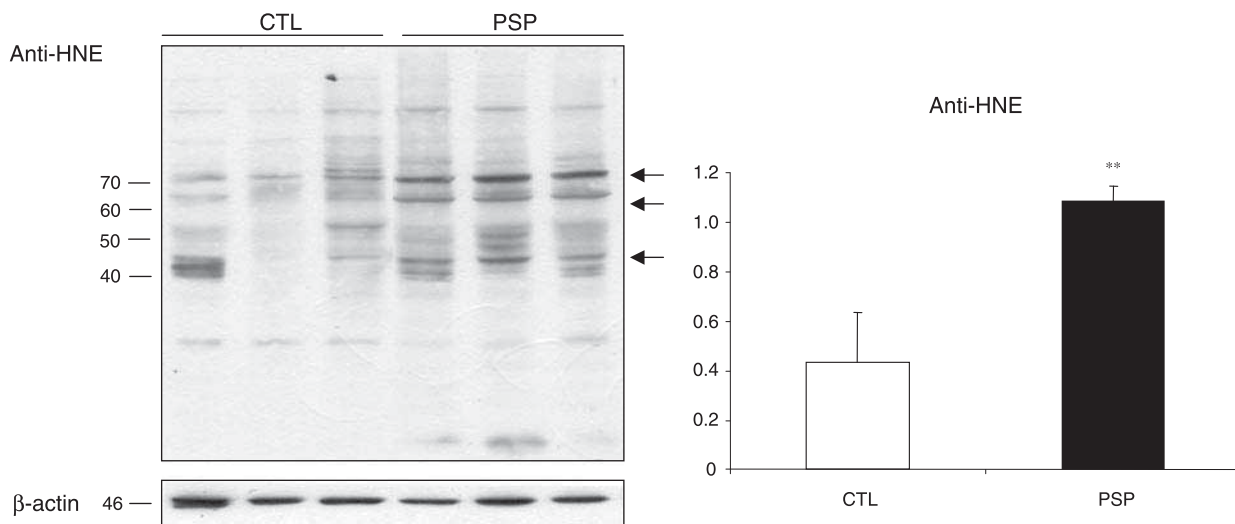


Fig. 1. Mono-dimensional gel electrophoresis and Western blotting of frontal cortex homogenates blotted for HNE show increased immunoreactivity of bands of 60 and 70 kDa and several bands between 40 and 50 kDa in progressive supranuclear palsy (PSP) when compared with controls (CTL). Quantitative analysis of HNE-immunoreactive bands, corrected for β -actin, expressed as mean values \pm SD, reveal a significant increase in the intensity of all the bands between 40 and 70 kDa in PSP cases compared with CTL. Student T test: * $p < 0.05$. Cases represented in the figure correspond to 8, 15 and 10 (controls), and 1, 2 and 4 (PSP)

processed in parallel. The rabbit anti-phosphoglycerate kinase 1 antibody (Abgent, San Diego, CA, USA) was used at a dilution of 1:150. The goat anti-fructose biphosphate aldolase A antibody (Novus Biologicals, Littleton, USA) was used at a dilution of 1:5000. The sections were incubated with EnVision for 1 h at room temperature. The peroxidase reaction was visualized with NH_4NiSO_4 (0.05 M) in phosphate buffer (0.1 M), 0.05% diaminobenzidine, NH_4Cl and 0.01% hydrogen peroxide (dark blue precipitate). Some sections were incubated without the primary antibody. No immunoreactivity was found in these samples.

Results

Mono-dimensional gel electrophoresis and western blotting to lipoxidized products

Western blot analysis of frontal cortex homogenates incubated with the anti-HNE antibody revealed increased intensity of bands of about 70, 60, and between 40 and 50 kDa in PSP cases when compared with the majority of controls (Fig. 1). Densitometric studies, including all the cases ex-

amined, revealed that these differences were significant ($p < 0.05$).

2D gel electrophoresis, in gel digestion and mass spectrometry

Immunodetection of oxidized proteins was performed using anti-HNE antibody. Two rows of spots located at the level of the 40 and 50 kDa markers were selected for study. Silver-stained spots of gels run in parallel were in-gel digested and processed for MS (Fig. 2). The same spots were identified in every case. The proteins identified were phosphoglycerate kinase 1 (PGK-1) and fructose biphosphate aldolase A (aldolase A) (Table 2).

Validation

To confirm the identity of these proteins, the same membranes were blotted with anti-HNE and anti-PGK 1 antibod-

Bi-dimensional gel stained with silver and processed in parallel western blotting incubated with anti-HNE antibody

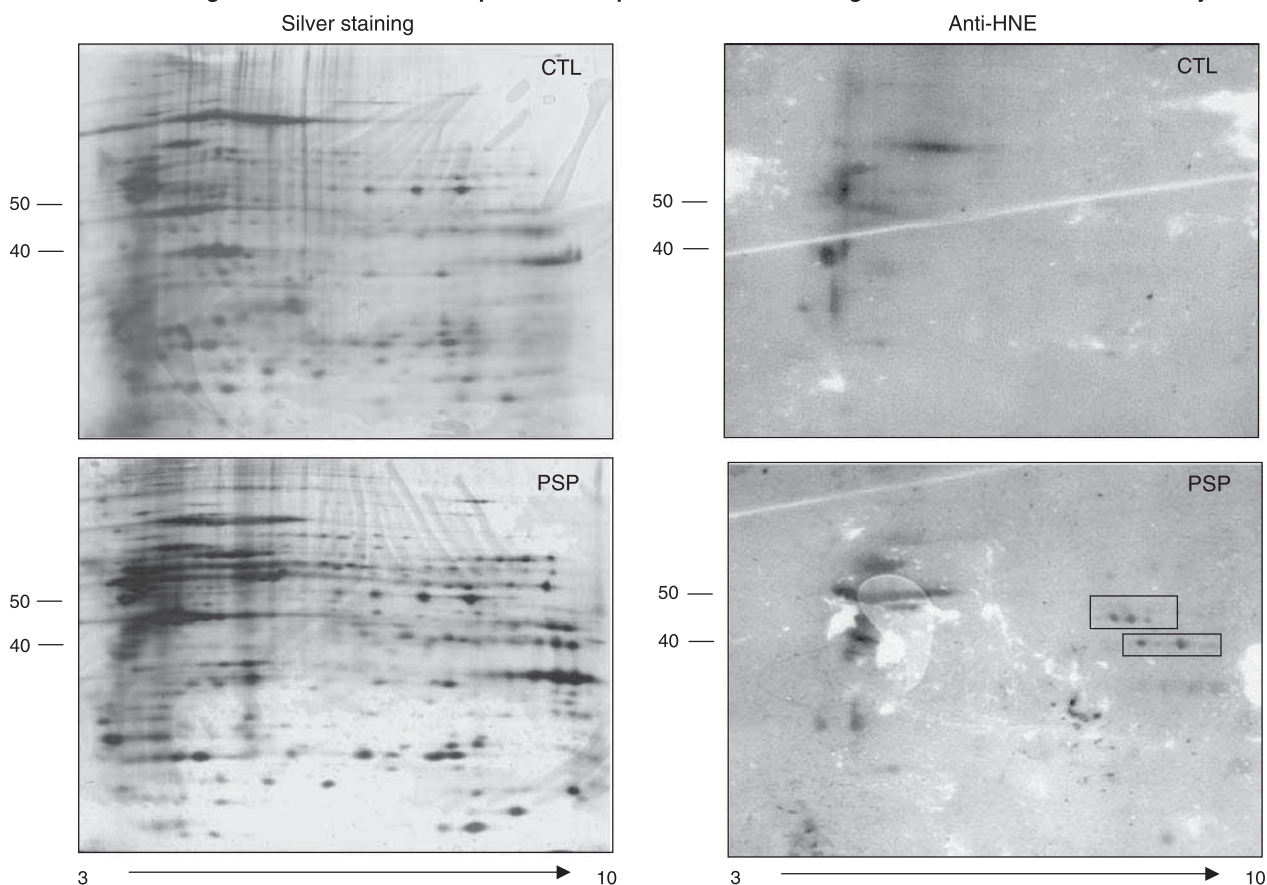


Fig. 2. 2D gel electrophoresis and immunoblotting with anti-HNE in control (CTL, case 15) and PSP (case 1) shows two rows of HNE-immunoreactive spots in PSP and not in CTL (*right panel*) between 40 and 50 kDa. Immunoreactive spots were matched in parallel gels stained with silver (*left panel*), which were in-gel digested, and processed for mass spectrometry

Table 2. Oxidized proteins excised from PSP gels. Spots were obtained from cases 1 (1, 2, 3, 4), 6 (5, 6) and 7 (7)

	Calculated pI	Nominal mass (Da)	Protein	Score coverage	No. of peptides matched	GI accession
1	8.3	44854	Phospho-glycerate kinase 1	58	5	P00558
2	8.3	44854	Phospho-glycerate kinase 1	54	9	P00558
3	8.39	39720	Fructose-bisphosphate aldolase A	60	4	P04075
4	8.39	39720	Fructose-bisphosphate aldolase A	73	8	P04075
5	8.3	44985	Phospho-glycerate kinase 1	204	6	NP000282
6	8.39	39816	Fructose-bisphosphate aldolase A	171	4	CAA30270
7	8.3	44985	Phospho-glycerate kinase 1	292	6	NP000282

Bi-dimensional gel electrophoresis and western blotting of membranes stained with anti-HNE antibody and anti-PGK-1 antibody

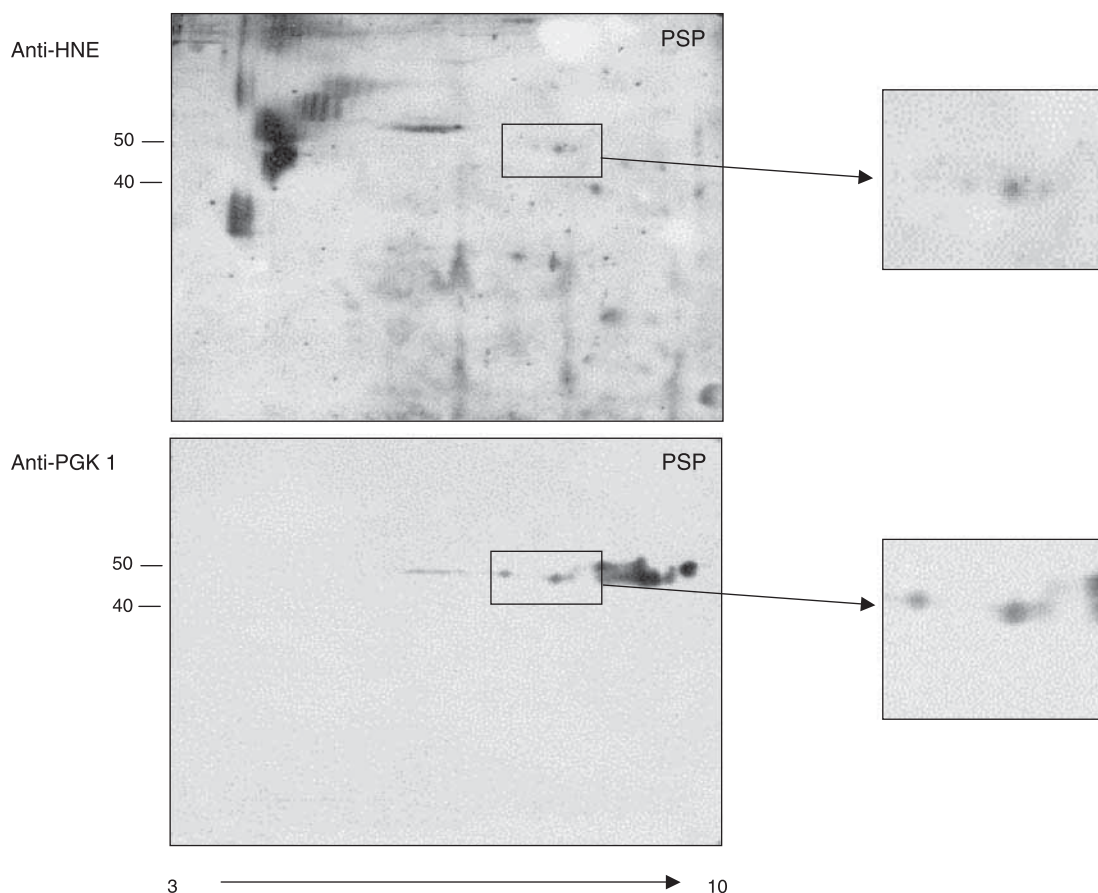


Fig. 3. Bi-dimensional gel electrophoresis and Western blotting of membranes stained with anti-PGK-1 antibody (*upper panel*) and anti-aldolase A (*lower panel*) antibodies in PSP (case 1)

ies. Selected spots were stained with anti-HNE and anti-PGK 1 antibodies (Fig. 3). Similarly, other pairs of membranes were blotted with anti-HNE and anti-aldolase A antibodies, showing similar results (Fig. 3).

The same studies were carried out in every case. Examples of these membranes are shown in Fig. 4. Lipoxidized PGK-1 and aldolase A were present in the 3

of 8 control cases, whereas oxidized PGK-1 occurred in 7 of 7 and oxidized aldolase A in 4 of 7 PSP cases (Table 3).

PGK-1 and aldolase A immunohistochemistry

Aldolase A immunoreactivity was present in neurons and glial cells in control and in diseased brains (Fig. 5A). PGK-1

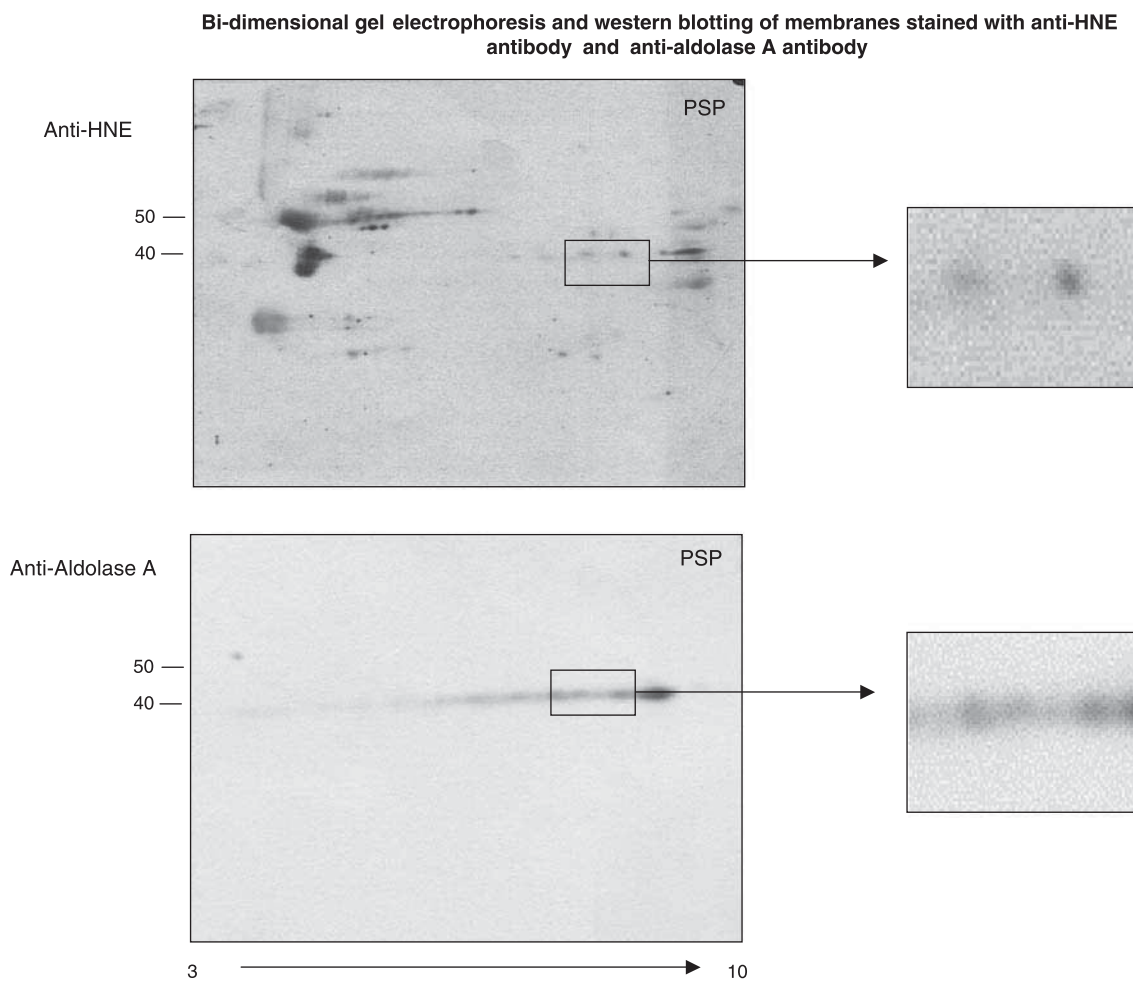


Fig. 4. Bi-dimensional gel electrophoresis and Western blotting of membranes stained with anti-HNE antibody (*left panel*) corresponding to one control (case 14) and one PSP case (case 6) showing parallel rows of positive spots between 40 and 50 kDa in PSP. Parallel membranes of the PSP case immunostained with anti-PGK-1 and fructose-bisphosphate aldolase A antibodies show specific immunostaining of the corresponding rows

Table 3. Oxidized phospho-glycerate kinase 1 (PGK-1) and fructose-bisphosphate aldolase A (aldolase A) in PSP and control cases

Case	Diagnosis	Oxidized PGK-1	Oxidized aldolase A
1	PSP	yes	yes
2	PSP	yes	yes
3	PSP	yes	no
4	PSP	yes	yes
5	PSP	yes	no
6	PSP	yes	yes
7	PSP	yes	no
8	C	no	no
9	C	yes	yes
10	C	no	no
11	C	no	no
12	C	yes	yes
13	C	yes	yes
14	C	no	no
15	C	no	no

immunoreactivity was mainly observed in the cytoplasm of astrocytes (Fig. 5B). No differences in the intensity of the immunostaining were found between control and diseased cases in individual cells excepting the increased number of astrocytes in PSP. It is worth mention that these antibodies do not distinguish oxidized from non-oxidized forms of the enzymes.

Discussion

Since previous reports have shown increased lipoxidative damage in the frontal cortex in PSP (Albers et al. 2000), the present study was delineated to gain understanding about targets of lipoxidative damage in the cerebral cortex in PSP brains.

2D gel electrophoresis, Western blotting to HNE and mass spectrometry has permitted the identification of two

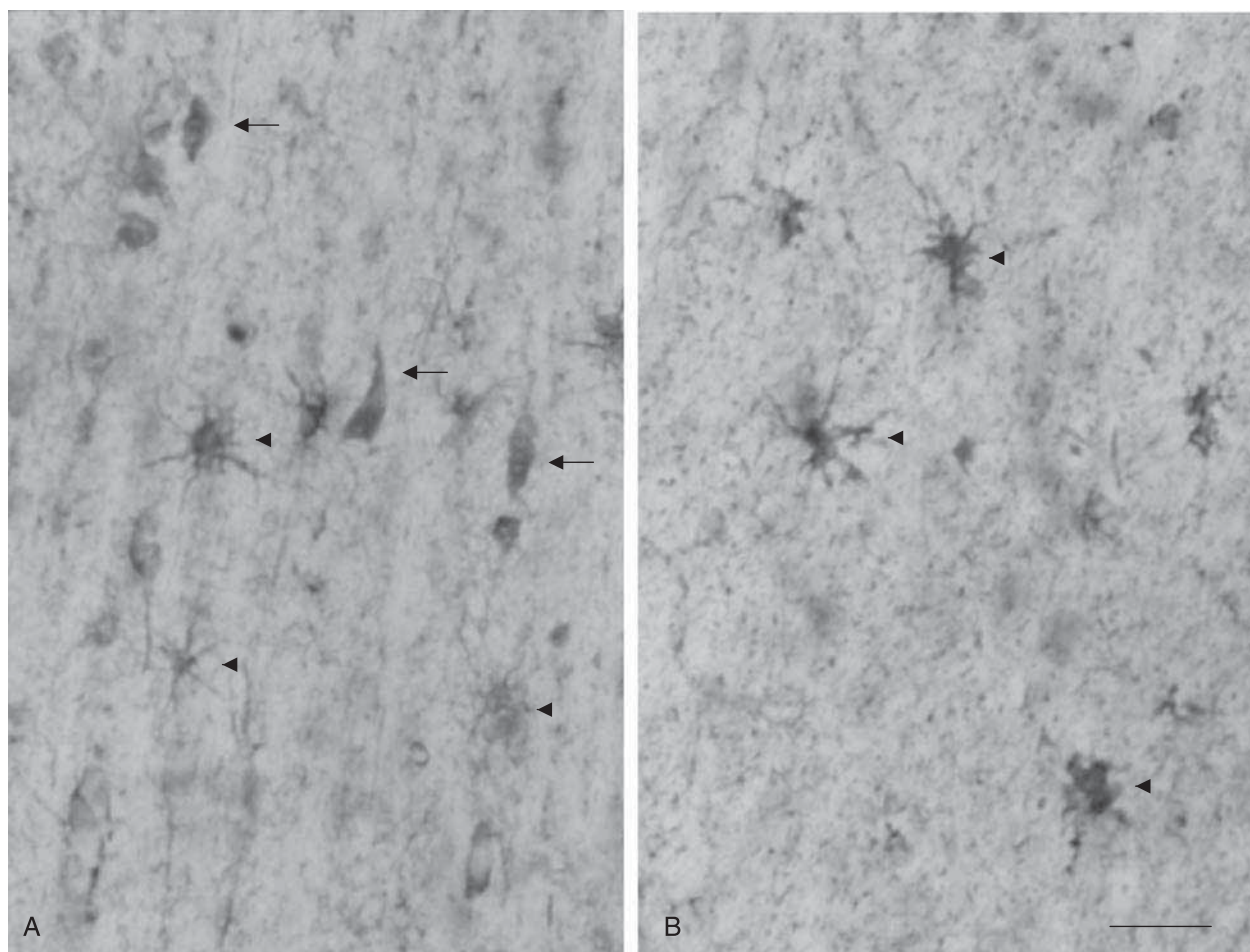


Fig. 5. Immunohistochemistry to aldolase A (A) and PGK-1 (B) in the PSP frontal cortex (case 1). Aldolase A immunoreactivity is observed in the cytoplasm of neurons (*arrows*) and astrocytes (*arrowheads*). PGK-1 immunoreactivity is mainly found in the cytoplasm of astrocytes (*arrowheads*). Cryostat section processed free-floating with no counterstaining. Bar = 25 μ m

proteins that are oxidized in the frontal cortex in PSP cases: fructose biphosphate aldolase A (aldolase A) and phosphoglycerate kinase 1 (PGK-1). Both enzymes are implicated in glycolysis. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase A converts fructose-1,6-bisphosphate into glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. PGK-1 catalyzes the conversion of 1,3-diphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate, leading to the production of the first ATP in glycolysis. Loss of function of PGK-1 may impair glucose metabolism and result in the accumulation of glycolytic intermediates.

PGK-1 has been described as being oxidized in the frontal cortex in Alzheimer's disease (AD) (Castegna et al. 2002; Korolainen et al. 2006) and in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology (Bigl et al. 2003). Several proteins related to glycogenesis and glycolysis have also been reported to be oxidized in experimental models of AD following injection of amyloid β peptide

(1–42) into rat brain (Boyd-Kimball et al. 2005) and in rat primary neural cells following amyloid β_{1-42} -induced oxidative damage (Sultana et al. 2006). Therefore, oxidation of proteins linked with the glycolysis may account for impaired energy metabolism in the AD brain.

No antecedents of HNE-modified glycolytic enzymes have been reported so far in PSP. Yet previous studies using (18F)-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) positron emission tomography (PET) have shown a significant alteration of cerebral glucose metabolism in the frontal cortex in PSP cases (Karbe et al. 1992). The present findings suggest that oxidation of aldolase A and PGK-1 may also account for impaired energy metabolism in PSP, and they provide a biochemical substrate for impaired glucose metabolism in PSP. Since aldolase A is present in neurons and astrocytes, and PGK-1 mainly in astrocytes, the present findings support neurons and astrocytes as targets of oxidative damage in PSP.

Although PGK-1 has been found to be oxidized in 7 of 7 cases and aldolase A in 4 of 7 PSP cases, oxidation of these proteins has also been observed in certain control cases. Thus PGK-1 and aldolase A were oxidized in the frontal cortex of 3 of 8 control cases. No apparent clinical and neuropathological differences were noticed between these three cases and the remaining five controls with no evidence of PGK-1 and aldolase A oxidation, excepting the young age in a single case.

In summary, the present study has shown that aldolase A and PGK-1 as targets of lipoxidation in the aged human cerebral cortex, and that increased lipoxidation of aldolase A and, particularly, of PGK-1 occurs in the frontal cortex in PSP. The present findings together with previous observations in AD support the idea that increased oxidation of proteins linked with glycolysis is a common feature in advanced stages of certain neurodegenerative diseases including AD and PSP.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (PI040184 and PI05/1570), and supported by the European Commission under the Sixth Framework Programme (BrainNet Europe II, LSHM-CT-2004-503039). We thank T. Yohannan for editorial help.

References

- Albers DS, Augood SJ, Martin DM, Standaert DG, Vonsattel JP, Beal MF (1999) Evidence for oxidative stress in the subthalamic nucleus in progressive supranuclear palsy. *J Neurochem* 73: 881–884
- Albers DS, Augood SJ, Park LC, Browne SE, Martin DM, Adamson J, Hutton M, Standaert DG, Vonsattel JP, Gibson GE, Beal MF (2000) Frontal lobe dysfunction in progressive supranuclear palsy: evidence for oxidative stress and mitochondrial impairment. *J Neurochem* 74: 878–881
- Bigl ML, Apelt J, Eschrich K, Schliebs R (2003) Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *J Neural Transm* 110: 77–94
- Boyd-Kimball D, Sultana R, Poon HF, Lynn BC, Casamenti F, Pepeu G, Klein JB, Butterfield DA (2005) Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid peptide (1–42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132: 313–324
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 33: 95–130
- Cantuti-Castelvetri I, Keller-McGandy CE, Albers DS, Beal MF, Vonsattel JP, Standaert DG, Augood SJ (2002) Expression and activity of antioxidants in the brain in progressive supranuclear palsy. *Brain Res* 930: 170–181
- Castegna A, Aksenov M, Thonboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery W, Butterfield DA (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: Dihydropyrimidinase-related protein 2, α -enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 82: 1524–1532
- Delacourte A, Buee L (2000) Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* 13: 371–376
- Dickson DW (2001) Progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. In: Hof PR, Mobbs ChV (eds) *Functional neurobiology of aging*. Academic Press, San Diego, pp 155–171
- Hauw JJ, Agid Y (2003) Progressive supranuclear palsy (PSP) or Steele-Richardson-Olszewski disease. In: Dickson D (ed) *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. ISN Neuropath Press, Basel, pp 103–114
- Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Nishimura T (1998) Glial tau pathology in neurodegenerative diseases: their nature and comparison with neuronal tangles. *Neurobiol Aging* 19: S85–S91
- Karbe H, Grond M, Huber M, Herholz K, Kessler J, Heiss WD (1992) Subcortical damage and cortical dysfunction in progressive supranuclear palsy demonstrated by positron emission tomography. *J Neurol* 239: 98–102
- Komori T (1999) *Tau*-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease. *Brain Pathol* 9: 663–679
- Korolainen MA, Goldsteins G, Nyman TA, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttila T (2006) Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 27: 42–53
- Lee WM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24: 1121–1159
- Litvan I (2004) Update on progressive supranuclear palsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 4: 296–302
- Litvan I, Hauw JJ, Bartko JJ, Lantos PL, Daniel SE, Horoupian DS, McKee A, Dickson D, Baner C, Tabaton M, Jellinger K, Anderson DW (1996) Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 97–105
- Morris HR, Gibb G, Katzenschlager R, Wood NW, Hanger DP, Strand C, Lashley T, Daniel SE, Lees AJ, Anderton BH, Revesz T (2002) Pathological, clinical and genetic heterogeneity in progressive supranuclear palsy. *Brain* 125: 969–975
- Odetti P, Garibaldi S, Norese R, Angelini G, Marinelli L, Valentini S, Menini S, Traverso N, Zaccaro D, Siedlak S, Perry G, Smith MA, Tabaton M (2000) Lipoperoxidation is selectively involved in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 393–397
- Puig B, Rey MJ, Ferrer I (2005) Individual and regional variations of phospho-tau species in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 110: 261–268
- Rampello I, Buttà V, Raffaele R, Vecchio I, Battaglia G, Cormaci G, Alvano A (2005) Progressive supranuclear palsy: a systematic review. *Neurobiol Dis* 20: 179–186
- Scaravilli T, Tolosa E, Ferrer I (2005) Progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: lumping versus splitting. *Mov Disord* 20 (Suppl 12): S21–S28
- Spillantini MG, Goedert M (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 21: 428–433
- Sultana R, Newman SF, Abdul HM, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, Butterfield DA (2006) Protective effect of D609 against amyloid-beta_{1–42}-induced oxidative modifications on neuronal proteins: redox proteomics studies. *J Neurosci Res* 84: 409–417
- Tawana K, Ramsden DB (2001) Progressive supranuclear palsy. *Mol Pathol* 54: 427–434

3. Type-Dependent Oxidative Damage in Frontotemporal Lobar Degeneration: Cortical Astrocytes Are Targets of Oxidative Damage

Anna Martínez, Margarita Carmona, Manuel Portero-Otin, Alba Naudí, Reinald Pamplona, Isidre Ferrer.

J Neuropathol Exp Neurol. 2008 Dec;67(12):1122-36. Erratum in: *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009 Jan;68(1):112.

En el grup de la degeneració frontotemporal lobar (DFTL) s'engloben diferents patologies com la DFTL amb la mutació P301L en el gen de la tau (DFTL-tau), la DFTL amb inclusions negatives per la tau però immunoreactives per la ubiquitina (DFTL-U) i la DFTL associada a l'esclerosi lateral amiotròfica (DFTL-ELA). La lesió oxidativa i les respostes a l'estrès són trets comuns de diferents malalties neurodegeneratives però, pel que fa a les malalties esmentades, no hi han gaires treballs que descriguin com afecta l'estrès oxidatiu a les proteïnes.

L'anàlisi per gels en electroforesi i western blot, van mostrar un increment de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) en l'escorça frontal de 6 de 6 casos de DFTL-tau, en 3 dels 10 casos de DFTL-U i en 2 de les 3 mostres de DFTL-ELA. L'augment del dany proteic derivat de la lipoxidació es va veure associat amb una alteració de les membranes insaturades i del perfil dels àcids grassos en les mostres de DFTL-tau i DFTL-ELA. Tots els casos de DFTL-tau, i la majoria que presentaven un increment en la immunoreactivitat de les bandes per western blot amb l'HNE, mostraven una important gliosi. Aquesta gliosi es va determinar per la immunohistoquímica de la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) i per l'increment d'aquesta proteïna per western blot. Gràcies a les tècniques dels gels bidimensionals, western blot i espectrometria de masses es va identificar la GFAP com la proteïna diana majoritàriament lipoxidada. La microscopia confocal va mostrar colocalització de l'HNE amb la GFAP en els astròcits corticals, la superòxid dismutasa 1 (SOD-1) en els astròcits i la superòxid dismutasa 2 (SOD-2) en els astròcits i les neurones de tots els grups de DFTL.

Per tant, en la DFTL hi ha una variabilitat de la lesió oxidativa depenent de la malaltia, trobant-se més accentuada en la DFTL-tau. Els astròcits són dianes de dany lipoxidatiu sent elements importants en situacions de resposta a l'estrès oxidatiu en la DFTL.

ORIGINAL ARTICLE

Type-Dependent Oxidative Damage in Frontotemporal Lobar Degeneration: Cortical Astrocytes Are Targets of Oxidative Damage

Anna Martínez, Margarita Carmona, Manuel Portero-Otin, PhD, Alba Naudí, PhD, Reinald Pamplona, PhD, and Isidre Ferrer, MD, PhD

Abstract

Oxidative injury and stress responses are common features of many neurodegenerative diseases. To assess oxidative stress responses in frontotemporal lobar degeneration (FTLD), we identified increased 4-hydroxynonenal (HNE) adducts using gel electrophoresis and Western blotting in frontal cortex samples in 6 of 6 cases of FTLD with the P301L mutation in the tau gene (FTLD-tau), in 3 of 10 cases with tau-negative ubiquitin-immunoreactive inclusions, and in 2 of 3 cases associated with motor neuron disease. Selectively increased lipoxidation-derived protein damage associated with altered membrane unsaturation and fatty acid profiles was verified by mass spectrometry in FTLD-tau and FTLD associated with motor neuron disease. All FTLD-tau and most cases with increased HNE-positive bands had marked astrogliosis as determined by glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry and increased GFAP expression on Western blotting; 2 FTLD cases with tau-negative ubiquitin-immunoreactive inclusions and with increased GFAP expression did not have increased HNE adducts. Bidimensional gel electrophoresis, Western blotting, in-gel digestion, and mass spectrometry identified GFAP as a major target of lipoxidation in all positive cases; confocal microscopy revealed colocalization of HNE and GFAP in cortical astrocytes, superoxide dismutase 1 in astrocytes, and superoxide dismutase 2 in astrocytes and neurons in all FTLD types. Thus, in FTLD, there is variable disease-dependent

oxidative damage that is prominent in FTLD-tau, astrocytes are targets of oxidative damage, and GFAP is a target of lipoxidation. Astrocytes are, therefore, crucial elements of oxidative stress responses in FTLD.

Key Words: Astrocytes, Frontotemporal lobar degeneration, Hydroxynonenal, Malondialdehyde-lysine, Membrane unsaturation, Oxidative damage, Superoxide dismutase.

INTRODUCTION

Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) designates a group of diseases having common progressive changes of personality and behavior, often with language impairment (i.e. frontotemporal dementia) associated with bilateral atrophy of the frontal and anterior temporal lobes. A prominent neuropathologic feature of FTLD is loss of neurons and microvacuolation that is mainly in the upper cortical layers and is accompanied by astrocytic gliosis. In addition to the frontal and temporal neocortex, the anterior cingulate gyrus, anterior insular cortex, hippocampus, entorhinal cortex, amygdala, and striatum (mainly the head of the caudate and putamen) are commonly affected. Loss of neurons and neuromelanin in macrophages, or free in the neuropil, can be present in the substantia nigra, even in cases with no apparent parkinsonian features (1–7). The remaining neurons in the upper cortical layers have reduced numbers of dendrites and dendritic spines, and there is a loss of presynaptic markers. Glutamatergic projection neurons and calbindin-immunoreactive local-circuit neurons are equally affected. Because the upper cortical layers are the source of short cortico-cortical connections, involvement of these areas is dramatic evidence of the devastating effects of FTLD on cortical connectivity (8–10).

The causes of frontotemporal dementia are varied. Three main groups of FTLD have been categorized, namely 1) tauopathies, including familial FTLD (and parkinsonism) linked to chromosome 17 because of mutations in the tau gene (*MAPT* 17q21-q22; FTLD-tau) (11–17); 2) FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions (FTLD-U); and 3) FTLD with no distinctive neuropathologic features. The second group has been subdivided into different types depending on the localization, distribution, and predominance of ubiquitin inclusions in the nucleus, cytoplasm, and/or neuropil (7, 18–20). Most FTLD-U cases seem sporadic, but

From the Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge; Universitat de Barcelona; Hospitalet de Llobregat; CIBERNED (AM, MC, IF); and Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida-IRBLLEIDA, Lleida, Spain (MP-O, AN, RP).

Send correspondence and reprint requests to: Isidre Ferrer, MD, PhD, Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, carrer Feixa Llarga sn, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain; E-mail: 8082ifa@gmail.com

This work was supported by Grants P105/1570 and P105/2214 from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III, and by Grant LSHM-CT-2004-503039 from the European Commission under the Sixth Framework Program (BrainNet Europe II) to Isidre Ferrer; by Grant BFU2006-14495/BFI from the Spanish Ministry of Education and Science, by Grant RD06/0013/0012 from the Spanish Ministry of Health (ISCIII, Red de Envejecimiento y Fragilidad), and by Grant 2005SGR00101 from the Autonomous Government of Catalonia to Reinald Pamplona; and by the Spanish Ministry of Health (Grants P104/0355, P105/2214, and P105/2241), Spanish Ministry of Education and Science (Grant AGL2006-12433), “La Caixa” Foundation, and COST B-35 Action to Manuel Portero-Otin.

mutations in at least 3 genes may cause FTLD-U. They are the progranulin gene (*PGRN*) located 17q21-q22, charged multivesicular body protein 2B (*CHMP2B*) in 3p13-3p12, and valosin-containing protein gene (*VCP*) in 9q21-q22 (21–28). In addition, FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis (FTLD-MND); linkage to chromosome 9 has been demonstrated in some of these cases (29, 30). Frontotemporal lobar degeneration with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions (FTLD-U) is more common (50%) than FTLD with tau pathology (FTLD-tau) (31). The amount of new information that has accumulated in recent years has made it increasingly difficult to consider the third category (i.e. FTLD with no distinctive neuropathologic features) as a separate entity (32).

Oxidative stress is common in degenerative diseases of the nervous system, including Alzheimer disease (33–40). Oxidative damage has also been reported in several tauopathies (41–43), but very little is known about oxidative stress in FTLD. Iron, in a redox-active state, is, however, increased in cases of frontotemporal dementia (44).

In the present study, we investigate the presence of oxidative stress and its impact on common predominant proteins in FTLD-tau, FTLD-U, and FTLD-MND. For this purpose, the combination of single and double labeling immunofluorescence and confocal microscopy, monodimensional and bidimensional gel electrophoresis, Western blot analysis, in-gel digestion, and mass-spectrometry was used for the first time to analyze the frontal cortex in 19 FTLD cases (FTLD-tau, n = 6; FTLD-U, n = 10; FTLD-MND, n = 3) and compared with 10 age-matched controls. Subsequently, gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analyses were performed to further dissect the molecular oxidative pathways by detecting and quantifying specific oxidation, glycooxidation, and lipoxidation-derived protein damage markers. Finally, to assess the role of structural components that can act as substrate targets in determining the cellular vulnerability, membrane fatty acid profiles and their degree of unsaturation were also measured. Because the first part of the study showed marked individual variations among FTLD-U cases, further attempts to delineate oxidative damage and lipid profiles were examined only in FTLD-U and FTLD-MND cases and controls.

MATERIALS AND METHODS

Cases

Patients were clinically categorized as having FTLD (16 cases) or FTLD + MND (3 cases). Clinical features of these patients are detailed elsewhere (45). Age-matched controls (n = 10) had not had neurological or metabolic diseases.

The postmortem delay between death and tissue processing was between 3 and 15 hours; the bodies were maintained at 4°C. All cases were processed in the same way following the same sampling and staining protocols. At autopsy, half of each brain was fixed in 10% buffered formalin, whereas the other half was cut in 1-cm-thick coronal sections, frozen on dry ice, and stored at –80°C until use.

The neuropathologic study permitted the identification of 6 FTLD-tau (Cases 4–6, 27–29), 10 FTLD-U (Cases 7–12, 23–26), and 3 FTLD-MND (Cases 13–15). Genetic studies demonstrated the P301L mutation in the 6 FTLD-tau cases, and the c908delC and P357HfsX3 mutations in the progranulin gene in 2 FTLD-U cases (Cases 10 and 26, respectively). The neuropathologic examination was normal in the 10 control cases, including lack of neurofibrillary tangles and amyloid deposits in any region, except a few diffuse plaques in the temporal and orbital cortex in two. The cases are summarized in Table 1.

Double Labeling Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Dewaxed 5-μm-thick sections were stained with a saturated solution of Sudan black B (Merck, Barcelona, Spain) for 10 minutes to block the autofluorescence of lipofuscin granules present in nerve cell bodies; they were then rinsed in 70% ethanol and washed in distilled water. The sections

TABLE 1. Case Summaries*

Case	Age, years	Sex	Postmortem Delay	Diagnosis
1	65	F	4 hours	CTL
2	59	M	7 hours	CTL
3	58	F	4 hours	CTL
4	52	M	14 hours	FTLD-tau (P301L)
5	58	M	13 hours	FTLD-tau (P301L)
6	58	M	10 hours	FTLD-tau (P301L)
7	64	M	12 hours	FTLD-U
8	61	M	8 hours	FTLD-U
9	74	F	5 hours	FTLD-U
10	74	F	15 hours	FTD-U-PGRN (c908delC)
11	77	F	8 hours	FTLD-U
12	69	F	10 hours	FTLD-U
13	68	M	3 hours	FTLD-MND
14	70	F	13 hours	FTLD-MND
15	69	F	6 hours	FTLD-MND
16	75	F	3 hours	CTL
17	78	F	4 hours	CTL
18	78	M	2 hours	CTL
19	85	M	6 hours	CTL
20	73	F	7 hours	CTL
21	67	M	5 hours	CTL
22	62	M	3 hours	CTL
23	74	F	15 hours	FTLD-U
24	72	M	6 hours	FTLD-U
25	62	F	4 hours	FTLD-U
26	51	M	8 hours	FTD-U-PGRN (P357HfsX3)
27	62	M	5 hours	FTLD-tau (P301L)
28	73	M	10 hours	FTLD-tau (P301L)
29	78	M	7 hours	FTLD-tau (P301L)

Mutations in *MAPT* (tau gene) and *PGRN* (progranulin gene) are indicated.

*Diagnoses are based on clinical, neuropathologic, and genetic data.

CTL, control; F, female; FTLD-MND, frontotemporal lobar dementia with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis; FTLD-tau, frontotemporal lobar dementia with tau pathology; FTLD-U, frontotemporal lobar degeneration with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions; M, male.

were incubated at 4°C overnight with a combination of the primary antibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 4-hydroxynonenal (HNE) or superoxide dismutase 1 (SOD1) or superoxide dismutase 2 (SOD2) diluted in PBS. Monoclonal anti-GFAP antibody or rabbit anti-GFAP antibody (Dako, Barcelona, Spain) were used at a dilution of 1:250; rabbit polyclonal anti-HNE antibody (Calbiochem, Barcelona, Spain) was used at a dilution of 1:50; monoclonal anti-SOD1 antibody was used at dilution 1:50 (Novocastra, Servicios Hospitalarios, Barcelona, Spain), and rabbit anti-SOD2 was diluted at 1:100 (Stressgen, Bionova, Madrid, Spain).

After washing in PBS, the sections were incubated in the dark for 45 minutes at room temperature with the cocktail of secondary antibodies diluted in the same vehicle solution as the primary antibodies. Secondary antibodies were Alexa488 anti-rabbit and Alexa546 anti-mouse immunoglobulin (both from Molecular Probes, Leiden, Netherlands). These were used at a dilution of 1:400. Nuclei were stained with TO-PRO-3-iodide (Molecular Probes) diluted 1:1000. Some sections were incubated only with the secondary antibodies; these sections were considered as nega-

tive controls. Sections were examined with a Leica TCS-SL confocal microscope.

Gel Electrophoresis and Western Blotting

Brain samples (weighing 0.1 g) of the frontal cortex from control, FTLD-tau, FTLD-U, and FTLD-MND cases were homogenized in 1 mL of lysis buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% CHAPS, 1 mmol/L sodium orthovanadate, and complete protease inhibitor cocktail [Roche Molecular Systems, Barcelona, Spain]) and centrifuged at 5,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellets were discarded, and protein concentrations of the supernatants were determined by the Bradford method with bovine serum albumin (Sigma, Barcelona, Spain) as a standard. Samples containing 30 µg of protein were loaded onto 10% acrylamide gels, and proteins were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to nitrocellulose membranes (200 mA/gel for 90 minutes). The membranes were then blocked with 5% skim milk in TBS-T buffer (100 mmol/L Tris-buffered saline, 140 mmol/L NaCl, and 0.1% Tween 20, pH 7.4) for 1 hour at room temperature and incubated with the primary antibody in

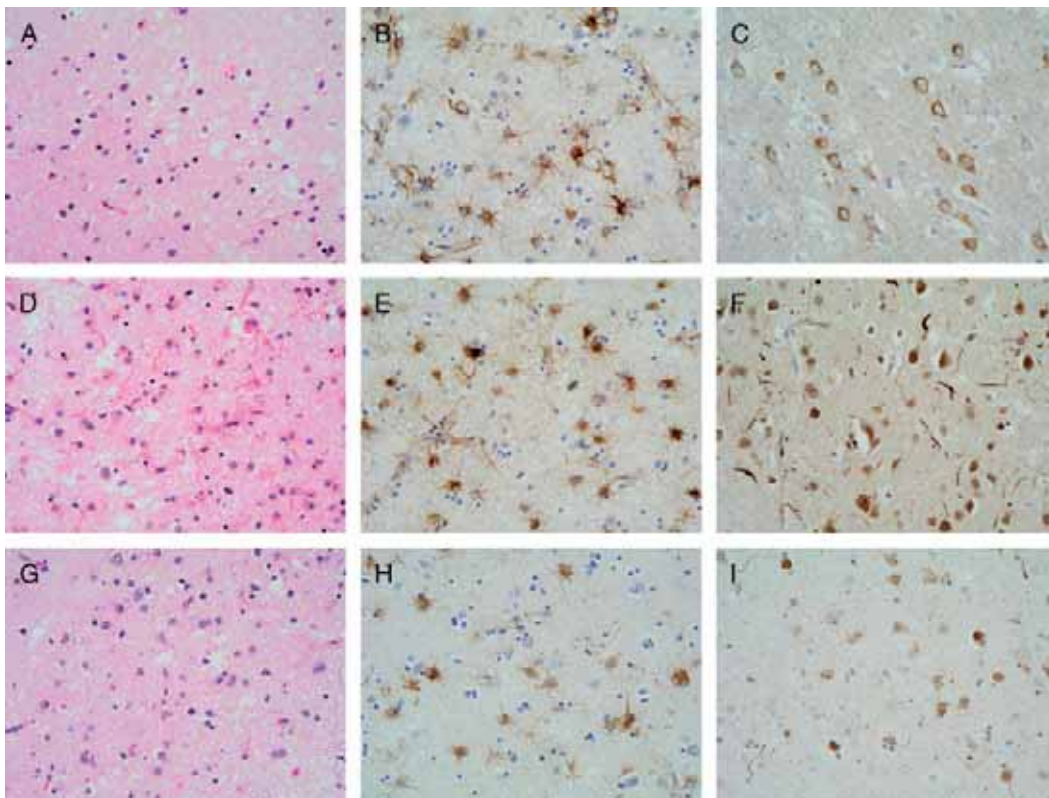


FIGURE 1. Major neuropathologic features in upper frontal cortical layers in frontotemporal lobar dementia (FTLD) cases: **(A–C)** FTLD with tau pathology (Case 5), **(D–F)** FTLD with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions (Case 12), **(G–I)** FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis (Case 15). There is neuron loss and spongiosis **(A, D, G)**, astrocytosis **(B, E, H)**, and either tau **(C)**- or ubiquitin-immunoreactive **(F, I)** inclusions. Ubiquitin-immunoreactive neurites predominate in Case 12, whereas cytoplasmic inclusions predominate in Case 15. Hematoxylin and eosin **(A, D, G)**; immunohistochemistry with hematoxylin counterstain for glial fibrillary acidic protein **(B, E, H)**, tau **(C)**, or ubiquitin **(F, I)**. Original magnification: 400×.

TBS-T–3% bovine serum albumin at 4°C overnight. After the incubation and washes with TBS, the membranes were blocked with 5% skim milk in TBS-T buffer and then incubated with rabbit polyclonal anti-HNE antibody (Calbiochem) at a dilution of 1:1000, rabbit polyclonal anti-catalase (Calbiochem) diluted 1:6000, rabbit polyclonal anti-GFAP (Dako) diluted 1:500, or mouse monoclonal anti-GFAP antibody (Dako) used at a dilution of 1:10000. Later, the membranes were washed 3 times in TBS-T for 5 minutes and then incubated for 45 minutes at room temperature, with the corresponding secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako) at a dilution of 1:1000 and washed in TBS-T for 30 minutes. The immunoreactivity was detected with the chemiluminescence ECL method (Amersham, Barcelona, Spain). The monoclonal antibody to β-actin (Sigma) was used at a dilution of 1:10000 as a control of protein loading.

Two-Dimensional Gel Electrophoresis

In the first dimension electrophoresis, samples were applied onto a 7-cm 4 to 7 pH nonlinear gradient ReadyStrip immobilized pH gradient strip (Bio-Rad, Barcelona, Spain) for isoelectric focusing. The strips were actively rehydrated at 50 V for 12 hours, and the proteins were focused at 500 V for 1 hour, after which the voltage was gradually increased to 1000 V for 1 hour. Focusing was increased to 8,000 V for 1 hour more, and the voltage was continued at 8,000 V for 10 hours. After focusing, the isoelectric focusing strips were stored at –80°C until the second dimension electrophoresis was performed.

For the second dimension electrophoresis, immobilized pH gradient strips were equilibrated for 10 minutes in 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) containing 6 mol/L urea, 1% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate, 30% (vol/vol) glycerol, and 2% dithiothreitol, and next re-equilibrated for 10 minutes in the same buffer containing 2.5% iodoacetamide. The strips were placed on 10% polyacrylamide gels together with standards (Fermentas, Ontario, Canada). For the second dimension, 2 gels from the same case were run in parallel. One replicate was stained with Coomassie blue (Bio-Rad), and the other replicate was transferred to a nitrocellulose membrane (200 mA/gel for 90 minutes). Transferred nitrocellulose membranes were processed for blotting. After incubation with 5% skim milk in TBS-T buffer for 1 hour at room temperature, nitrocellulose membranes were incubated with rabbit anti-HNE (Calbiochem), previously incubated with NaBH4 10 mmol/L in TBS, used at dilution of 1:1000. Membranes were also incubated with monoclonal anti-GFAP antibody (Dako) used at dilution of 1:10000. The immunoreactions were visualized as previously described (39).

In-Gel Digestion

Proteins were in-gel digested with trypsin (Promega, Barcelona, Spain) in the automatic Investigator ProGest robot of Genomic Solutions (Isogen Life Science, Barcelona, Spain). Briefly, excised gel spots were washed sequentially with ammonium bicarbonate buffer and acetonitrile. Proteins were reduced with 10 mmol/L dithiothreitol solution during

30 minutes and alkylated with 100 mmol/L solution of iodine acetamide. After sequential washings with buffer and acetonitrile, proteins were digested overnight at 37°C with trypsin 0.27 nmol/L. Tryptic peptides were extracted from the gel matrix with 10% formic acid and acetonitrile. The extracts were pooled and dried in a vacuum centrifuge.

Acquisition of MS and MS/MS Spectra

Proteins manually excised from the 2-dimensional (2-D) gels were digested and analyzed by CapLC-nano-ESI-MS-MS. The tryptic digested peptide samples were analyzed using an online liquid chromatography (CapLC, Micromass-Waters, Manchester, United Kingdom) coupled to a tandem MS (Q-TOF Global, Micromass-Waters) (43). Data were

TABLE 2. Summary of Neuropathologic and Biochemical Changes

Case	Diagnosis	Neuron Loss	Astrocytes	GFAP	HNE
1	CTL		+	+	±
2	CTL		+/++	+/++	++
3	CTL		+	+	±
4	FTLD-tau	++	+++	+++	+++
5	FTLD-tau	++	+++	+++	+++
6	FTLD-tau	++	+++	+++	+++
7	FTLD-U	+	+	+	+
8	FTLD-U	+	+	+	+
9	FTLD-U	+	+	+	+
10	FTLD-U	++	++	+++	+++
11	FTLD-U	+	++	++	+
12	FTLD-U	+++	+++	+++	+++
13	FTLD-MND	+	++	++	±
14	FTLD-MND	+	++	++	++/+++
15	FTLD-MND	+	++	++	++/+++
16	CTL		+	+	±
17	CTL		+	+	±
18	CTL		+	+	±
19	CTL		+	+	±
20	CTL		+	–	–
21	CTL		+	+	±
22	CTL		+	+	±
23	FTLD-U	++	+++	+++	+++
24	FTLD-U	+	+	+	±
25	FTLD-U	+	+	–	±
26	FTLD-U	+	+	++	+
27	FTLD-tau	++	++	+++	++
28	FTLD-tau	++	++	+++	++
29	FTLD-tau	+++	+++	+++	+++

Semiquantitative values for neuron loss and reactive astrocytosis in sections and immunoreactivities in Western Blots (WBs) for GFAP and HNE were assigned as follows: +, slight; ++, moderate; +++, severe or strong. +/++ and ++/+++ are used to designate intermediate values. There is a clear relationship between astrocyte numbers, GFAP protein expression levels, and HNE expression levels in every case, with the exception of Case 11, in which increased GFAP expression is accompanied by moderate increase in HNE expression levels.

CTL, control; FTL-D-MND, frontotemporal lobar dementia with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis; FTL-D-tau, frontotemporal lobar dementia with tau pathology; FTL-D-U, frontotemporal lobar degeneration with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HNE, 4-hydroxynonenal.

generated in PKL file format and submitted for database searching in MASCOT server (Matrix Science, Boston, MA) using the National Center for Biotechnology Information database with the following parameters: trypsin enzyme, 1 missed cleavage, carbamidomethyl (C) as fixed modification and oxidized (M) as variable modification, and mass tolerance of 150 to 250 ppm.

Probability-based MOWSE score was used to determine the level of confidence in the identification of specific isoforms from the mass spectra. This probability equals $10^{(-\text{Mowse score}/10)}$. Mowse scores greater than 50 were considered to be of high confidence of identification.

GC/MS Analyses of Protein Damage

The markers measured were, for protein oxidation: glutamic semialdehyde (GSA) and amino adipic semialdehyde (AASA), which are specific protein carbonyls; for glycoxylation: N ϵ -(carboxyethyl)lysine (CEL); for mixed glycoxylation and lipoxidation: N ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML); and for lipoxidation: N ϵ -(malondialdehyde)lysine (MDAL). The GSA, AASA, CML, CEL, and MDAL were determined

as trifluoroacetic acid methyl ester derivatives in acid hydrolyzed delipidated and reduced protein samples by GC/MS (46) using an HP6890 Series II gas chromatograph (Agilent, Barcelona, Spain) with a MSD5973A Series and a 7683 Series automatic injector, an HP-5MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), and the described temperature program (39). Quantification was performed by internal and external standardization using standard curves constructed from mixtures of deuterated and nondeuterated standards.

GC/MS Analyses of Membrane Fatty Acid Profile

Fatty acyl groups of human frontal cortex lipids were analyzed as methyl ester derivatives by GC/MS as previously described (39). Separation was performed in an SP2330 capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.20 μ m) in a GC Hewlett Packard 6890 Series II gas chromatograph (Agilent). A Hewlett Packard 5973A mass spectrometer was used as detector in the electron-impact mode. Identification of fatty acyl methyl esters was made by comparison with authentic standards and on the basis of mass spectra. Results are expressed as mol percentage.

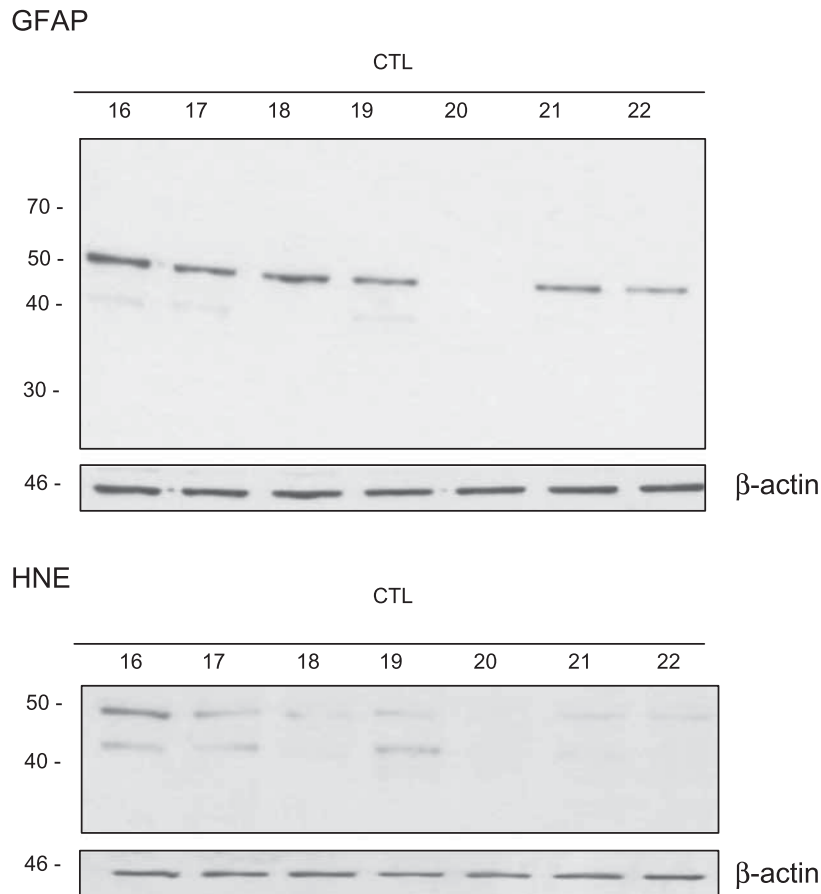


FIGURE 2. Monodimensional gel electrophoresis and Western blots of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 4-hydroxynonenal (HNE) in frontal cortex homogenates from 7 control cases (CTL). At this exposure time, GFAP is characterized by a single band of approximately 50 kd and a weaker band of approximately 40 kd. In 1 case (Case 20), a GFAP was not evident, but prolonged exposure showed a band of 50 kd in this case (not shown). The HNE blotting reveals 2 main bands of approximately 50 and 40 kd.

RESULTS

General Neuropathologic Findings

Variable degrees of neuron loss, spongiosis in the upper cellular layers, and reactive astrocytosis were present in every FTLD case, and characteristic inclusions were present in every FTLD type (Fig. 1). Cases with FTDL-tau showed tau-immunoreactive neurons and fewer tau-immunoreactive astrocytes (Fig. 1C). Cases with FTLD-U showed ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions and neurites (Fig. 1F); cases affected by FTLD-MND had globular ubiquitin-immunoreactive neuronal cytoplasmic inclusions (Fig. 1I). The 2 cases with mutation in the progranulin gene had characteristic cat eye-shaped intranuclear inclusions. All FTLD-U and FTLD-MND cases had TDP-43-immunoreactive inclusions.

The degrees of neuron loss and astrocytosis in the frontal cortex in FTLD and control cases were assessed in a semiquantitative manner and are summarized in Table 2.

Gel Electrophoresis and Western Blotting to GFAP and HNE in Controls

Monodimensional gel electrophoresis and GFAP Western blotting of the frontal cortex revealed a band of approximately 50 kd and a weaker band of approximately 40 kd in most control cases (Fig. 2). Increased GFAP immunoreactivity was seen in a single case (Case 2; see later). Monodimensional gel electrophoresis to HNE showed 2 bands of approximately 50 and 40 kd in most cases (Fig. 2), with the exception of moderate HNE immunoreactivity in Case 2. One case showed an apparent absence of GFAP and HNE immunoreactivity, but typical bands in this case were detected with a long time of exposure (data not shown).

Gel Electrophoresis and Western Blotting to GFAP and HNE in Pathological Cases

Monodimensional gel electrophoresis and GFAP Western blotting of the frontal cortex revealed several bands of strong GFAP immunoreactivity between 35 and 50 kd in

GFAP

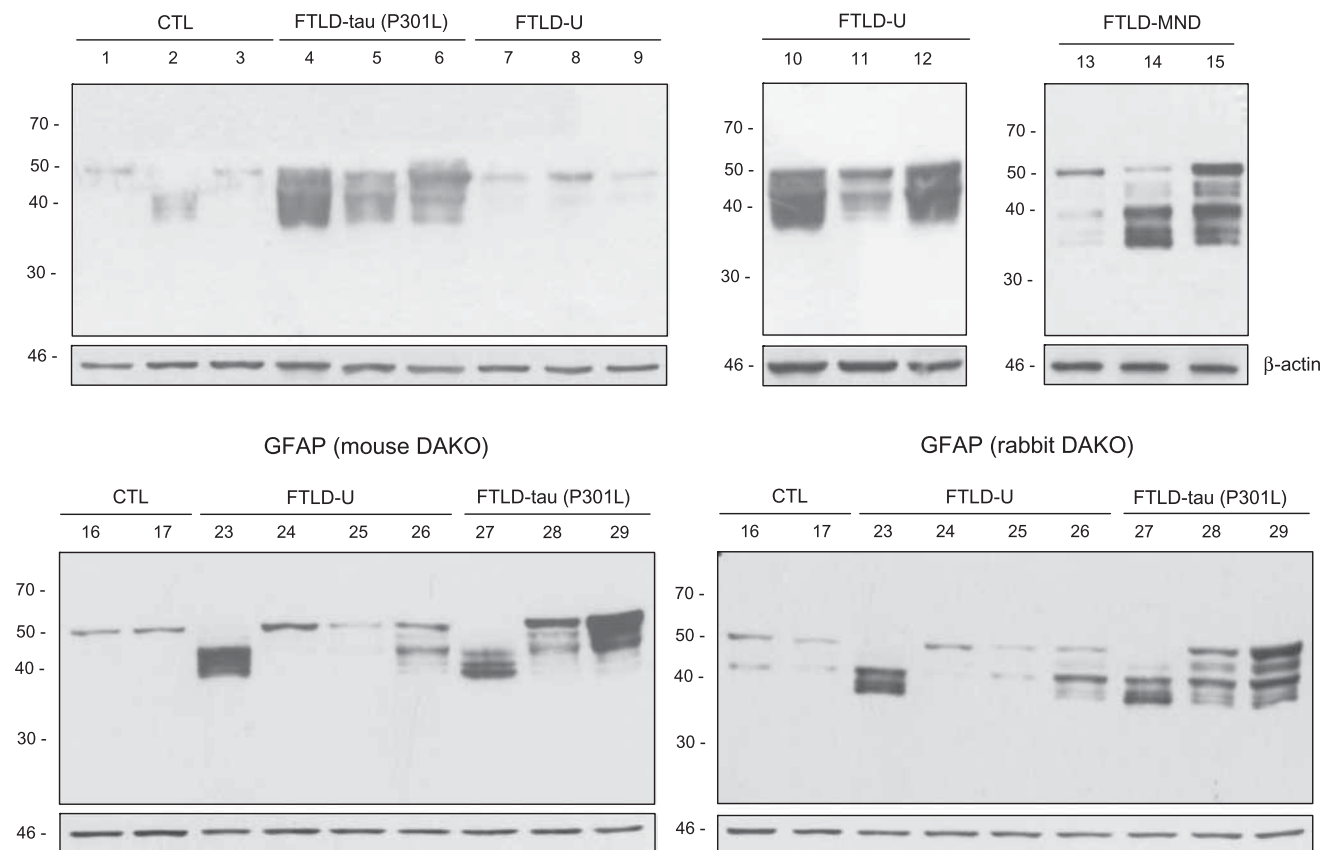


FIGURE 3. Monodimensional gel electrophoresis and Western blots of glial fibrillary acidic protein ([GFAP] bands between 35 and 50 kd) in frontal cortex homogenates showing strong expression levels in the 6 frontotemporal lobar dementia (FTLD) with tau pathology cases ([FTLD-tau] P301L; Cases 4–6, 27–29), 5 FTLD with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions cases ([FTLD-U] strong 10, 12, and 23; moderate 11, 26), and 2 FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis cases ([FTLD-MND] Cases 14, 15). A slight increase is observed in 1 control case ([CTL] Case 2). Similar patterns are seen by using mouse monoclonal and rabbit polyclonal anti-GFAP antibodies.

the 6 FTLD-tau (Cases 4–6, 27–29), 5 cases with FTLD-U (Cases 10–12, 23, 26), and 2 cases with FTLD-MND (Cases 14, 15) (Fig. 3). One control case (Case 2) had moderate GFAP immunoreactivity. Similar findings were obtained using mouse monoclonal and rabbit polyclonal anti-GFAP antibodies (Fig. 3). The intensity of GFAP immunoreactivity, as revealed in Western blot analysis, correlated with the amount of cortical GFAP-immunoreactive astrocytes identified by immunohistochemistry (Table 2).

Monodimensional gel electrophoresis and Western blot analysis of HNE revealed higher intensities of bands between 35 and 50 kd in some pathological cases than in controls. Increased densities of HNE bands were observed in the 6 FTLD-tau cases (Cases 4–6, 27–29), 3 of 10 FTLD-U cases (Cases 10, 12, 23), and 2 FTLD-MND cases (Cases 14, 15) (Fig. 4). Increased density of the upper band was noticed in another FTLD-U (Case 11). A moderate increase in HNE expression was present in 1 control (Case 2) (Fig. 4). The intensity of HNE-immunoreactive bands expressed semi-quantitatively is shown in Table 2 for comparison to other morphological and biochemical parameters.

2-D Gel Electrophoresis, In-Gel Digestion, and MS

4-Hydroxynonenal antibody was used in Western blots of 2-D gels. Control (Cases 1–3) and FTLD cases (Cases 4–6, 10, 12, 14, 15) were processed in parallel on different days. Several spots between 65 and 70 kd appeared in some FTLD cases, thus indicating that different proteins could be targets of lipoxidation in FTLD. However, only spots be-

tween 35 and 50 kd that were consistently present in HNE-positive cases were selected for study.

Corresponding Coomassie-stained spots were excised from Cases 4, 10, 12, 14, and 15, in-gel digested, and processed for MS. All spots were identified as GFAP as primary or unique option with Mowse scores of high confidence (Table 3). Other spots also appeared in individual cases, suggesting that other proteins were targets of oxidation, but because these spots were neither consistent nor related to age, sex, or pathology, no further attempts were made to identify them.

Validation

Parallel membranes were blotted with anti-HNE and anti-GFAP antibodies in control and FTLD cases. Spots of FTLD-tau, FTLD-U Cases 10 and 12, and FTLD-MND Cases 14 and 15 stained with anti-HNE antibody matched with spots incubated with anti-GFAP antibodies (Figs. 5–7).

Double Labeling Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Sections of the frontal cortex in controls and in Cases 4 to 6 (FTLD-tau), 10, 12 (FTLD-U), 14, and 15 (FTLD-MND) were double stained with anti-HNE and anti-GFAP. This analysis demonstrated colocalization of these antibodies in reactive astrocytes in FTLD (Fig. 8). Neurons were not stained with anti-HNE antibodies. Double labeling with antibodies to GFAP and SOD1 demonstrated the presence of SOD1 in astrocytes in FTLD-tau and FTLD-U cases (Fig. 9), whereas double labeling immunofluorescence and confocal

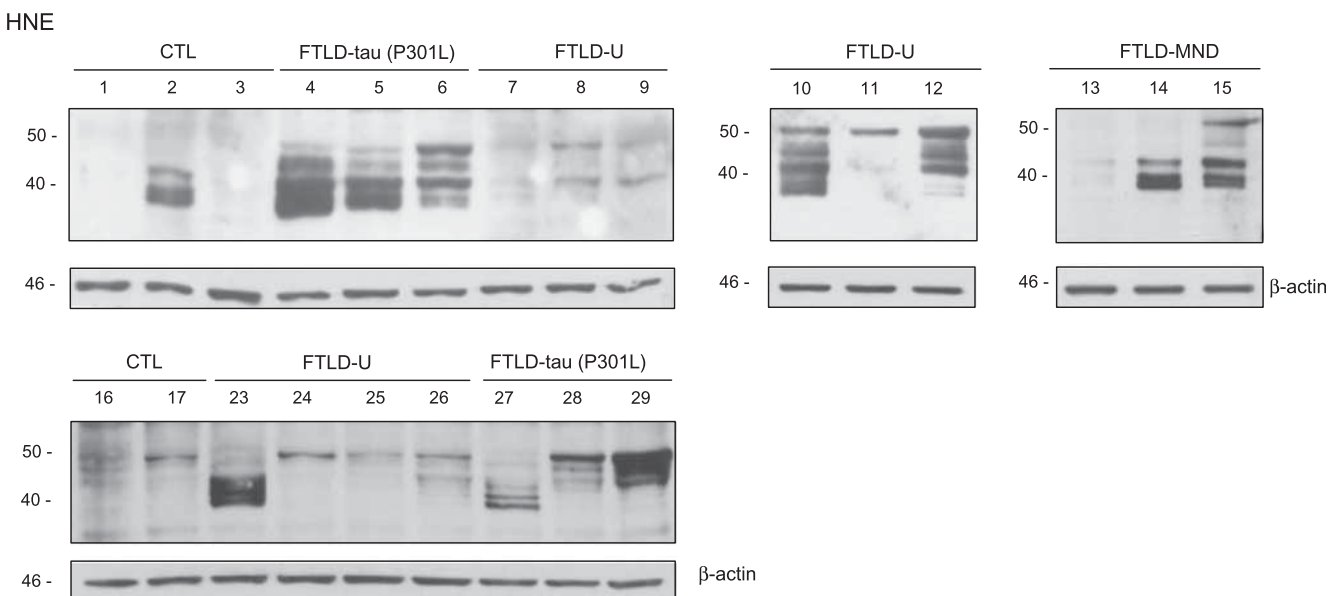


FIGURE 4. Monodimensional gel electrophoresis and Western blotting to 4-hydroxynonenal ([HNE] bands between 35 and 50 kd) in frontal cortex homogenates show strong expression levels in the 6 frontotemporal lobar dementia (FTLD) with tau pathology cases ([FTLD-tau] P301L; Cases 4–6, 27–29), 3 FTLD with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions cases ([FTLD-U] Cases 10, 12, 23), and 2 FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis cases ([FTLD-MND] Cases 14, 15). There is a moderate increase in 1 control case ([CTL] Case 2) and a slight increase in 2 FTLD-U cases (Cases 11, 26). β -Actin is used as a control of protein loading.

TABLE 3. Gel Electrophoresis Spot Identification in Selected Cases*

FTLD Case	Spot	Calculated pI	Nominal Mass, d	Protein	Score Coverage	Sequence Coverage, %	Peptides Matched	GI Accession
4	1	5.42	49,776	GFAP	91	21	9	38566198
4	2	5.42	49,776	GFAP	136	27	15	38566198
4	3	5.42	49,776	GFAP	275	40	22	38566198
10	1	5.42	49,907	GFAP	978	38	50	4503979
10	2	5.42	49,776	GFAP	404	46	25	38566198
12	1	5.42	49,776	GFAP	158	35	19	38566198
12	2	5.42	49,776	GFAP	442	42	23	38566198
12	3	5.42	49,776	GFAP	359	43	24	38566198
14	(1)	5.42	49,907	GFAP	540	26	12	4503979
14	(2)	5.47	49,835	GFAP	177	12	5	16265836
14	(4)	5.42	49,907	GFAP	502	29	13	4503979
14	(5)	5.42	49,907	GFAP	548	29	13	4503979
15	(3)	5.42	49,907	GFAP	270	15	6	4503979
15	(4)	5.42	49,907	GFAP	591	30	16	4503979
15	(5)	5.42	49,907	GFAP	790	39	23	4503979

*Case 4 is an FTLD-tau case; Cases 10 and 12 are FTLD-U; Cases 14 and 15 are FTLD-MND cases. Spots identified are indicated in Figures 5, 6, and 7 for the corresponding cases.

FTLD-MND, frontotemporal lobar dementia with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis; FTLD-tau, frontotemporal lobar dementia with tau pathology; FTLD-U, frontotemporal lobar degeneration with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GI, genInfo identification number; pI, isoelectric point.

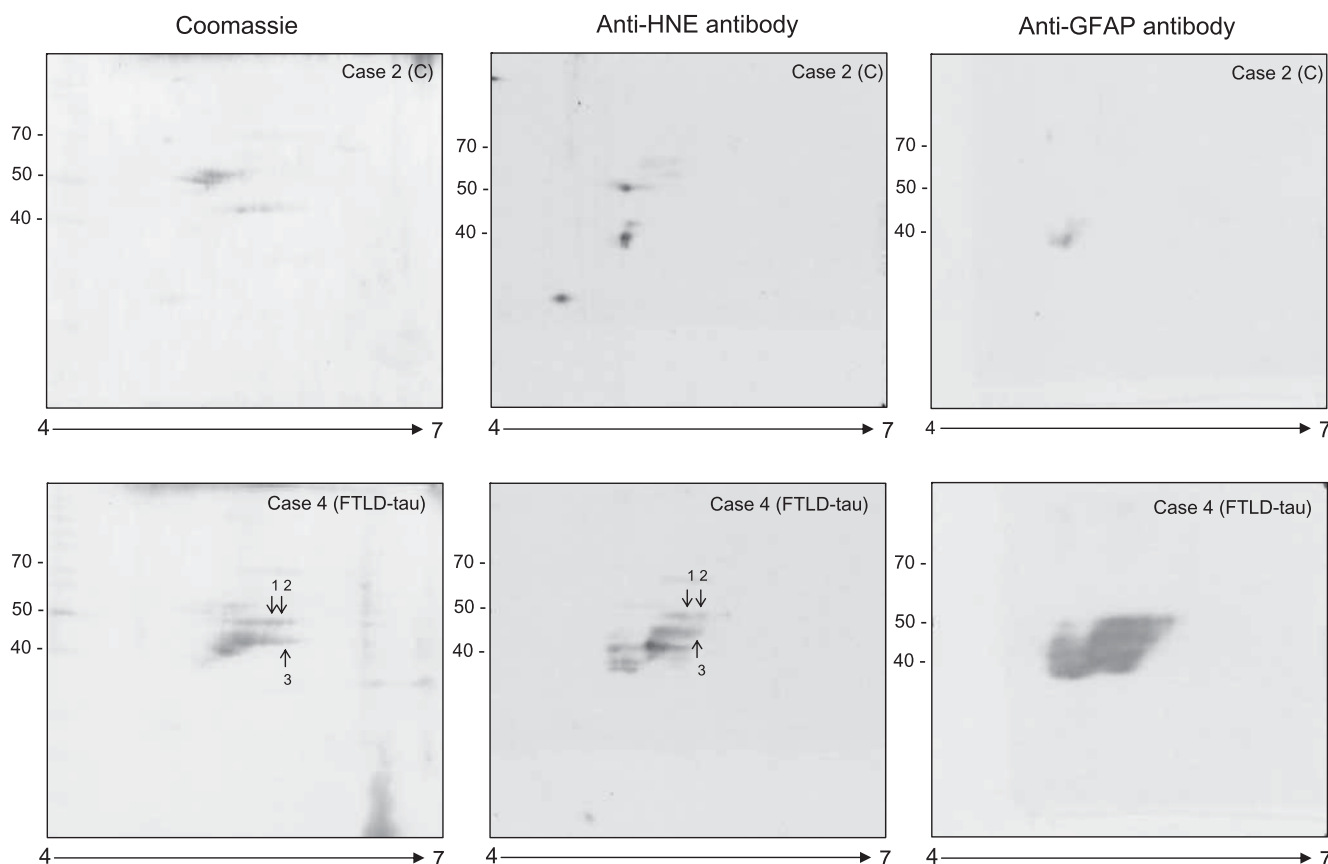


FIGURE 5. Bidimensional gel electrophoresis with gels stained with Coomassie (left panels) and membranes immunoblotted with anti-4-hydroxynonenal ([HNE] middle panels) and anti-glial fibrillary acidic protein ([GFAP] right panels) antibodies in control (Case 2) and frontotemporal lobar dementia with tau pathology ([FTLD-tau] Case 4). These cases were processed in parallel. Numbers 1 to 3 are spots selected for in-gel digestion and mass spectrometry.

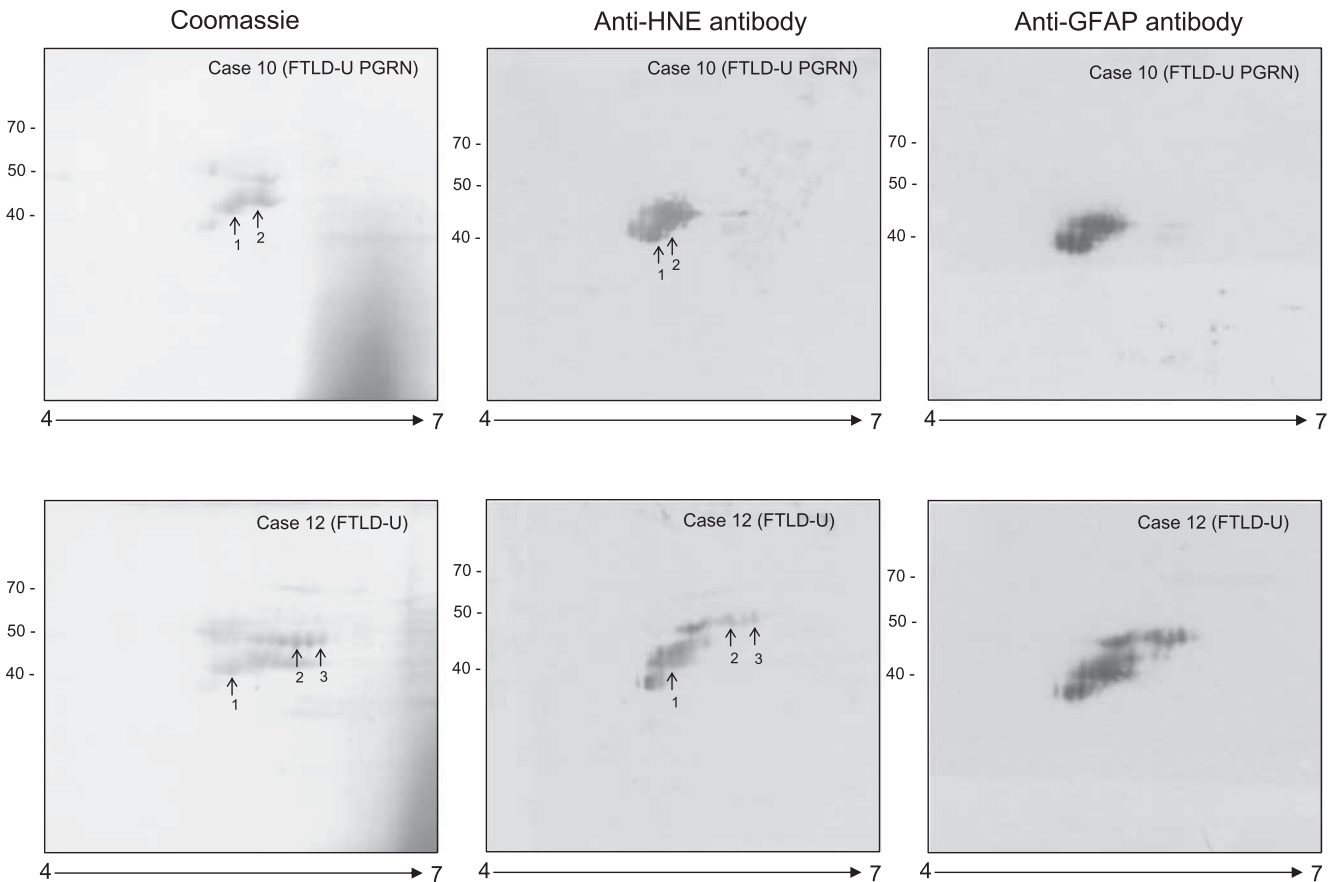


FIGURE 6. Bidimensional gel electrophoresis with gels stained with Coomassie (left panels) and membranes immunoblotted with anti-4-hydroxynonenal ([HNE] middle panels) and anti-gial fibrillary acidic protein ([GFAP] right panels) antibodies in fronto-temporal lobar degeneration with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions ([FTLD-U] Case 10) and FTLD-U (Case 12). Numbers 1 to 3 are spots selected for in-gel digestion and mass spectrometry. *PGRN*, progranulin gene.

microscopy showed SOD2 in reactive astrocytes and neurons (Fig. 10).

Catalase Expression

Western blot analysis of catalase in the frontal cortex in control and FTLD cases demonstrated increased catalase expression levels that largely correlated with other oxidative stress responses in individual cases (Fig. 11).

GC/MS Analysis of Protein Damage

Because of individual variations in the FTLD-U group, GC/MS analysis of protein damage and fatty acid profile was carried out only in FTLD-tau and FTLD-MND. The steady-state levels of representative specific markers of protein oxidation (GSA and AASA), glycoxidation (CEL and CML), and lipoxidation (MDAL) are shown in Table 4 and Figure 12. The MDAL was the most sensitive marker for the presence of disease because it showed significantly higher values both in FTLD-tau and FTLD-MND cases compared with the controls. The CML exhibited slightly but not significantly higher values both in FTLD-tau and in FTLD-MND compared with the controls. The CEL levels were significantly higher in

FTLD-tau, but not in FTLD-MND, compared with the control group. Finally, protein oxidation markers showed significantly higher values in FTLD-tau and significantly lower values in FTLD-MND compared with the controls.

GC/MS Analysis of Fatty Acid Profile

The full fatty acid composition of frontal cortex and derived indices are shown in Table 5. The FTLD-tau significantly increased 16:1n-7 and 18:1n-9 and decreased 18:0, 18:3n-3, and 22:6n-3 compared with the controls. The FTLD-MND significantly increased 18:1n-9 and 20:4n-6, and decreased 18:3n-3, 22:0, 22:4n-6, and 22:6n-3 compared with the control group. These changes in membrane fatty acid profile resulted in lowered saturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (specifically PUFA_{n-3}) contents, as well as double bond and peroxidizability indices, and increased monounsaturated fatty acid content in FTLD-tau than in the control group. In contrast, FTLD-MND only resulted in significantly lowered PUFA_{n-3} content and increased PUFA_{n-6}. Double bond and peroxidizability indices were lower, but not significantly, in FTLD-MND compared with the control group.

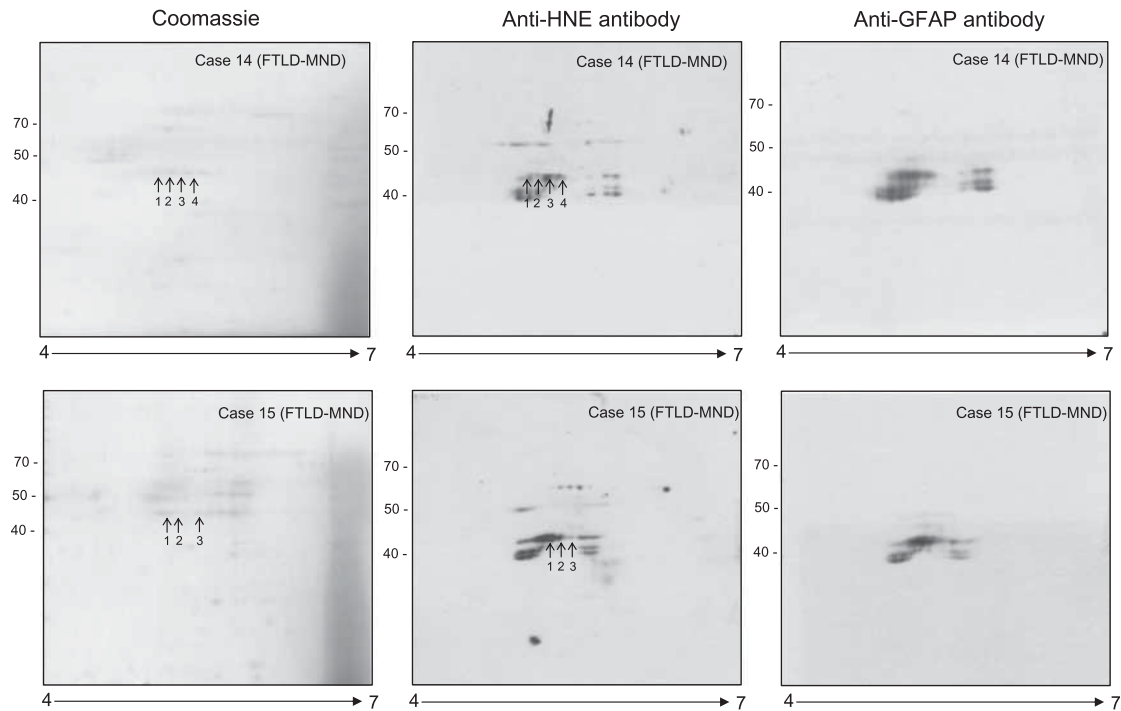


FIGURE 7. Bidimensional gel electrophoresis with gels stained with Coomassie (left panels) and membranes immunoblotted with anti-4-hydroxynonenal ([HNE] middle panels) and anti-glial fibrillary acidic protein ([GFAP] right panels) antibodies in frontotemporal lobar dementia with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis ([FTLD-MND] Cases 14, 15). Numbers 1 to 5 are spots selected for in-gel digestion and mass spectrometry.

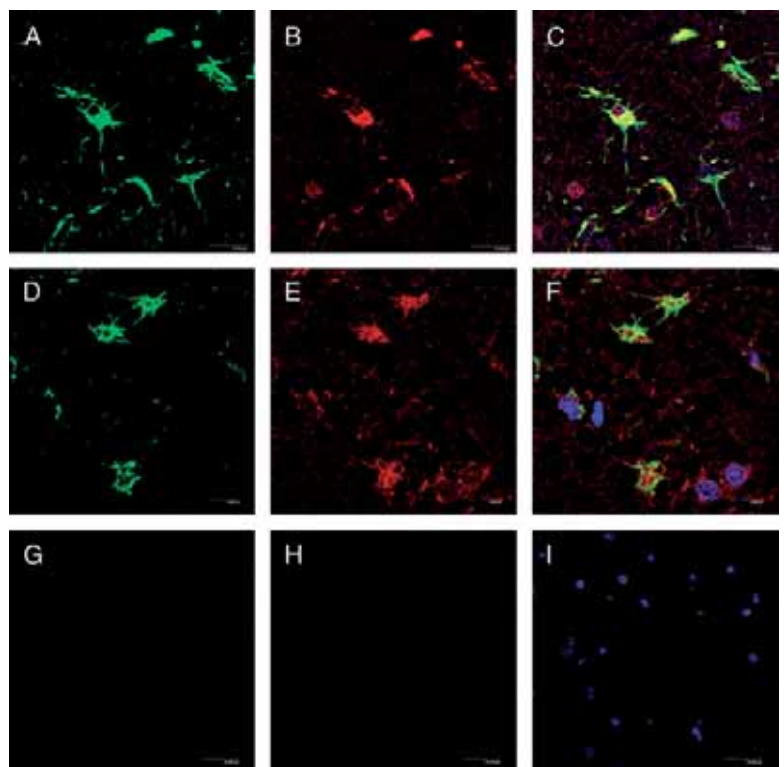


FIGURE 8. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to glial fibrillary acidic protein ([GFAP] green) and 4-hydroxynonenal ([HNE] red) in frontotemporal lobar dementia (FTLD) with tau pathology ([FTLD-tau] Case 5) (**A–C**) and FTLD with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions ([FTLD-U] Case 10) (**D–F**) in sections of the third layer of the frontal cortex. The HNE immunoreactivity colocalizes with GFAP in most astrocytes (merge). No HNE is found in GFAP-negative cells. Sections incubated with only the secondary antibodies (**G–I**) are negative controls of the immunoreaction. Original magnification: 600 \times .

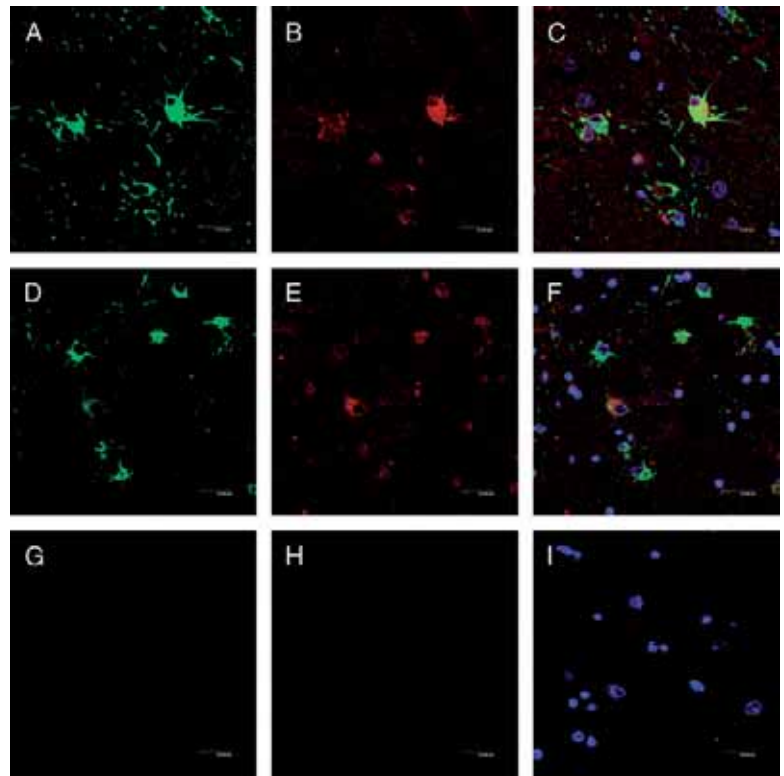


FIGURE 9. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to glial fibrillary acidic protein ([GFAP] green) and superoxide dismutase 1 ([SOD1] red) in frontotemporal lobar dementia (FTLD) with tau pathology (Case 6) (**A–C**) and FTLD with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions (Case 13) (**D–F**) in sections of the third layer of the frontal cortex. The SOD1 immunoreactivity colocalizes with GFAP in most astrocytes (merge). No SOD1 is found in GFAP-negative cells. Sections incubated with only the secondary antibodies (**G–I**) are used as negative controls of the immunoreaction. Original magnification: 600 \times .

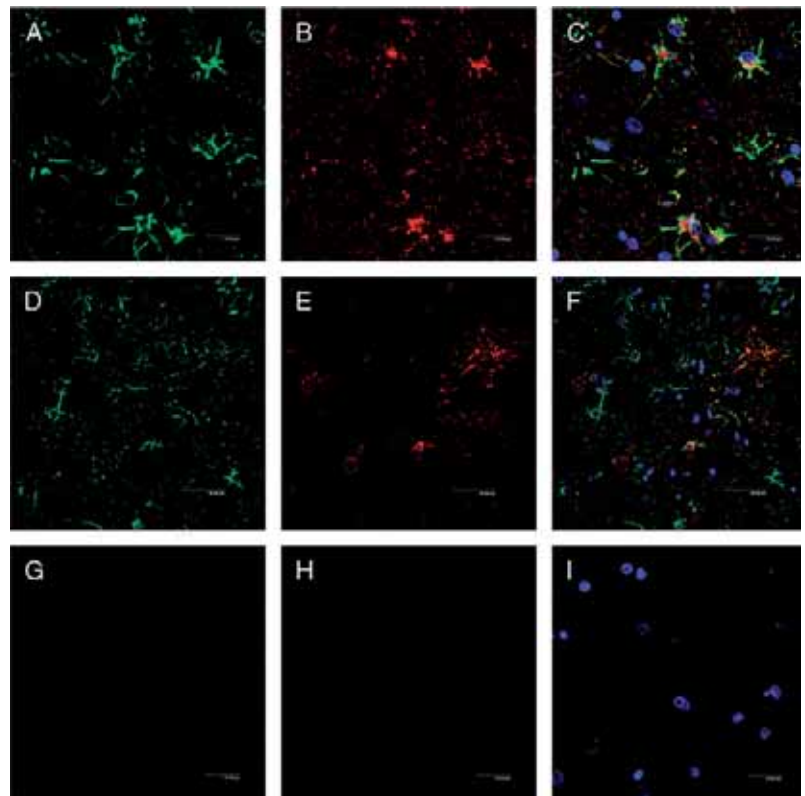


FIGURE 10. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to glial fibrillary acidic protein ([GFAP] green) and superoxide dismutase 2 ([SOD2] red) in frontotemporal lobar degeneration (FTLD) with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions (Case 13) (**A–C**) and FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis (Case 15) (**D–F**) in sections of the third layer of the frontal cortex. The SOD2 immunoreactivity is found in GFAP-positive and GFAP-negative cells (these were considered as neurons on the basis of the cytoplasm morphology with SOD2 immunostaining). Sections incubated with only the secondary antibodies (**G–I**) are used as negative controls of the immunoreaction. Original magnification: 600 \times .

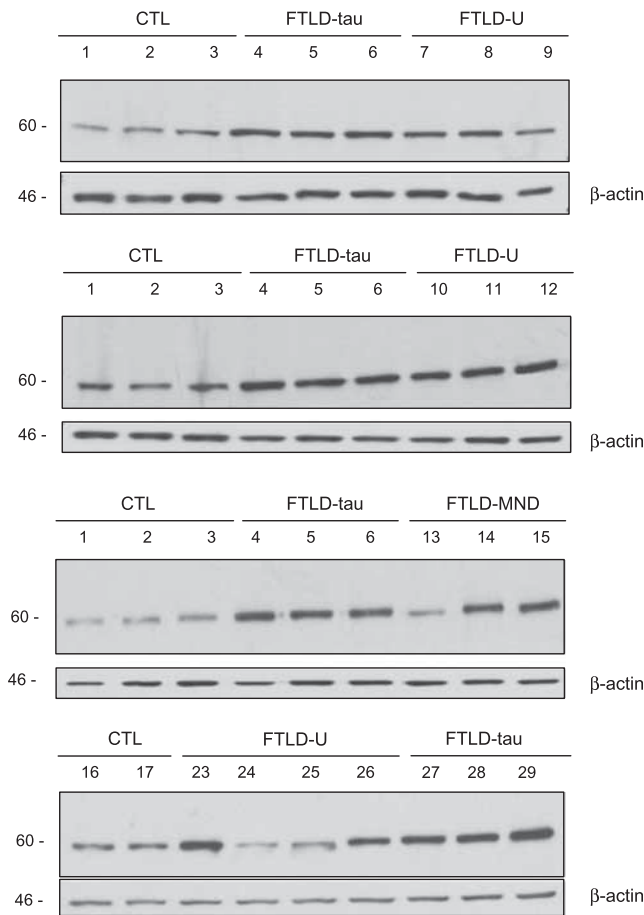


FIGURE 11. Western blots to catalase in the frontal cortex in control and frontotemporal lobar dementia (FTLD) cases. Increased expression levels are found in the 6 cases with FTLD with tau pathology (FTLD-tau), in 2 of 3 FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis (FTLD-MND) cases, and in FTLD with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions (FTLD-U) cases with oxidative damage (see Fig. 4 for comparison). CTL, control case.

DISCUSSION

Using anti-HNE antibodies and MS, we demonstrate increased lipoxidative damage in the frontal cortex in cases of FTLD. Frontotemporal lobar degeneration is not a single disorder, however, and there were marked differences in the extent of oxidative damage among the different types of FTLD. Increased lipoxidative damage was present in all 6 FTLD-tau cases, but only in 3 of 10 FTLD-U and in 2 of 3 FTLD-MND cases. Therefore, the oxidative damage is probably not the result of a single molecular event among the different FTLD types.

The brain consumes a large proportion of total oxygen used by the body; it is rich in PUFAs and low in antioxidant components. It has, therefore, a particularly high vulnerability to oxidative stress (36). Polyunsaturated fatty acids can be attacked by oxidative injury mechanisms that lead to the formation of reactive species, including HNE and MDA among others (40, 47). These species are produced during lipid peroxidation and react with nucleophilic side chains of Cys, His, and Lys residues, thereby generating covalent unions between aldehyde carbonyl groups and peptide chains. This promotes protein lipoxidative damage, loss of function, and cell death (48–50). Lipoxidative damage is further enhanced when there is impaired mitochondrial function. With these premises and reinforcing the findings previously described, significantly increased lipoxidation-derived protein damage was verified by GC/MS in FTLD cases. This molecular injury seems to be linked with increased lipoxidative damage at the cellular level, which in turn, is associated with profound changes in membrane unsaturation and fatty acid profile, particularly in FTLD-tau. Moreover, the available data suggest striking biochemical differences between FTLD-tau and FTLD-MND cases as evidenced by disease-specific patterns of subtypes of protein oxidative damage and fatty acid composition.

Proteomic studies focusing on FTLD-tau have shown increased GFAP (5.4-fold change) and increased SOD2 (11.2-fold change), among other modifications (51). These changes, of upregulation of GFAP and oxidative stress responses, parallel the present observations in FTLD-tau. Proteomic and functional studies in transgenic mice bearing the P301L

TABLE 4. Protein Markers of Oxidative, Glyoxidative, and Lipoxidative Damage in Human Frontal Cortex of Control and FTLD-tau and FTLD-MND Cases

	Control	FTLD-tau	FTLD-MND	p (Control vs FTLD-tau)	p (Control vs FTLD-MND)	p (FTLD-tau vs FTLD-MND)
GSA	25,532.44 ± 701.44	28,039.49 ± 251.20	15,917.09 ± 763.24	0.014	0.001	0.001
AASA	104.00 ± 12.19	145.46 ± 5.18	87.82 ± 10.62	0.011	0.266	0.001
CEL	362.70 ± 21.09	511.60 ± 76.98	375.84 ± 28.09	0.050	0.852	0.073
CML	1,105.90 ± 126.81	1,311.82 ± 389.24	1,417.59 ± 187.27	0.586	0.413	0.778

Values are expressed as mean ± SEM, micromole/mole lysine. p ≤ 0.05 are indicated in bold type.

AASA, amino adipic semialdehyde; CEL, carboxyethyl-lysine; CML, carboxymethyl-lysine; FTLD-MND, frontotemporal lobar dementia with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis; FTLD-tau, frontotemporal lobar dementia with tau pathology; FTLD-U, frontotemporal lobar degeneration with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions; GSA, glutamic semialdehyde.

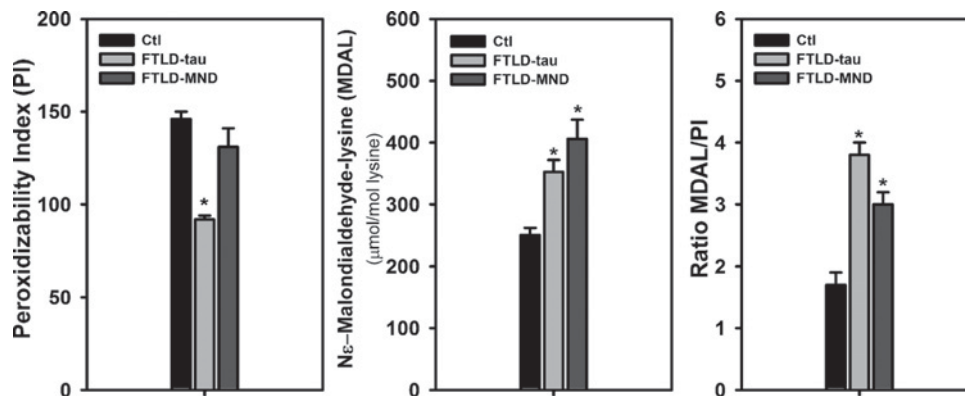


FIGURE 12. Peroxidizability index (PI), malondialdehyde-lysine (MDAL) steady-state levels, and ratio MDAL/PI in the frontal cortex in control and frontotemporal lobar dementia (FTLD) cases. Ratio MDAL/PI can be considered as an indicator of the lipoxidative damage efflux from membrane fatty acids to cellular proteins, normalizing differences in membrane peroxidizability. Values are as follows: Control (CTL) group: PI, 146.91 ± 4.62 ; MDAL, 250.31 ± 12.56 ; and ratio MDAL/PI: 1.7 ± 0.2 ; for FTLD with tau pathology (FTLD-tau): PI, 92.46 ± 2.77 ; MDAL, 353.08 ± 9.72 ; ratio MDAL/PI, 3.8 ± 0.2 ; finally, for FTLD with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis (FTLD-MND) group: PI, 131.48 ± 10.08 ; MDAL, 406.15 ± 31.63 ; and ratio MDAL/PI, 3.0 ± 0.2 . * $p < 0.01$ compared with the control group.

TABLE 5. Fatty Acid Composition (in mole percentage) and Derived Indices in FTLD-tau, FTLD-MND, and Control Cases

Fatty Acids	Control	FTLD-tau	FTLD-MND	p (Control vs FTLD-tau)	P (Control vs FTLD-MND)	p (FTLD-tau vs FTLD-MND)
14:0	0.42 ± 0.03	0.47 ± 0.07	0.39 ± 0.03	0.477	0.650	0.253
16:0	20.80 ± 0.60	22.17 ± 0.67	22.20 ± 0.57	0.145	0.136	0.968
16:1n-7	0.62 ± 0.09	1.30 ± 0.09	0.82 ± 0.02	0.001	0.101	0.001
18:0	22.51 ± 0.50	16.90 ± 0.63	22.23 ± 0.44	0.001	0.723	0.001
18:1n-9	20.62 ± 1.23	31.43 ± 0.35	24.87 ± 2.27	0.001	0.070	0.010
18:2n-6	0.91 ± 0.06	0.90 ± 0.05	1.03 ± 0.16	0.954	0.432	0.400
18:3n-3	1.05 ± 0.04	0.41 ± 0.06	0.49 ± 0.03	0.001	0.001	0.244
18:4n-3	2.32 ± 0.48	2.75 ± 0.52	1.50 ± 0.36	0.524	0.238	0.082
20:0	0.34 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.37 ± 0.08	0.682	0.737	0.941
20:1n-9	1.15 ± 0.24	1.27 ± 0.19	1.26 ± 0.25	0.710	0.735	0.972
20:2n-6	0.41 ± 0.08	0.55 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.122	0.441	0.030
20:3n-6	0.79 ± 0.04	1.02 ± 0.06	0.89 ± 0.07	0.023	0.285	0.160
20:4n-6	8.34 ± 0.60	7.95 ± 0.24	9.86 ± 0.41	0.552	0.034	0.011
20:5n-3	0.39 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.07	0.205	0.197	0.980
22:0	6.90 ± 1.41	6.38 ± 0.87	3.22 ± 0.45	0.723	0.023	0.045
22:4n-6	0.65 ± 0.07	0.82 ± 0.07	0.45 ± 0.01	0.084	0.043	0.001
22:6n-3	11.70 ± 0.48	4.92 ± 0.22	9.70 ± 1.19	0.001	0.087	0.001
ACL	18.55 ± 0.04	18.22 ± 0.05	18.31 ± 0.04	0.001	0.005	0.202
SFA	50.98 ± 1.15	46.33 ± 0.28	48.44 ± 1.01	0.003	0.070	0.125
UFA	49.01 ± 1.15	53.66 ± 0.28	51.55 ± 1.01	0.003	0.070	0.125
MUFA	22.40 ± 1.45	34.02 ± 0.29	26.96 ± 2.53	0.001	0.082	0.012
PUFA	26.60 ± 0.66	19.64 ± 0.51	24.59 ± 1.54	0.001	0.187	0.005
PUFAn-6	11.13 ± 0.47	11.26 ± 0.20	12.60 ± 0.46	0.815	0.024	0.037
PUFAn-3	15.47 ± 0.54	8.37 ± 0.68	11.99 ± 1.43	0.001	0.026	0.022
DBI	148.13 ± 3.06	118.39 ± 2.17	140.86 ± 5.53	0.001	0.208	0.001

Values are expressed as mean ± SEM.

Fatty acid indexes and their calculations are detailed in the Materials and Methods section.

$p \leq 0.05$ are indicated in bold type.

ACL, average chain length; SFA, saturated fatty acid; UFA, unsaturated fatty acid; MFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; DBI, double bond index; FTLD-MND, frontotemporal lobar dementia with tau-negative ubiquitin-positive inclusions that occurs in association with motor neuron disease and amyotrophic lateral sclerosis; FTLD-tau, frontotemporal lobar dementia with tau pathology; FTLD-U, frontotemporal lobar degeneration with tau-negative ubiquitin-positive neuronal inclusions.

mutation in the tau gene have also shown reduced NADH-ubiquinone oxidoreductase activity, reduced mitochondrial respiration, and reduced adenosine triphosphate synthase, together with increased reactive oxygen species, elevated antioxidant enzymes, enhanced SOD and glutathione reductase activities, and lowered *in vivo* lipoxidation and increased *in vitro* lipoxidation, as estimated by MDA levels (52). In light of the present findings, this last observation is likely caused by a lower membrane unsaturation in P301L mutants. Despite that the origin of this change in membrane unsaturation is unknown, it is likely caused by the combined effect of different factors, including 1) changes in cellular populations (neuronal loss and astrocytosis) with cell-specific fatty acid profiles, 2) alterations in metabolic pathways where specific fatty acids (particularly 22:6n-3) participate, 3) cellular membrane adaptations to the pathological state, and 4) the flux of oxidative damage directed to the cellular membrane.

No similar studies have been performed in FTLD-U, and no available models of FTLD-U are currently available. Recent studies have, however, shown a link between oxidative stress, oxidative damage, mitochondrial abnormalities, and endoplasmic reticulum stress in the spinal cord in patients with amyotrophic lateral sclerosis (53). For these reasons, despite being a neuropathologic variety of FTLD-U, the FTLD-MND cases in the present study have been considered apart. Because of the limited number of cases and considering that causes of oxidative damage in FTLD-MND may differ from those of other FTLD-U cases, further studies are necessary to probe specific impairment of metabolic pathways in FTLD-MND compared with other FTLD-U cases.

With the exception of 2 cases in which GFAP expression levels were higher than those corresponding to HNE, the intensity of oxidative damage correlated with astrocytosis ascertained by GFAP immunohistochemistry in the adjacent cortex and by levels of GFAP protein expression as revealed by Western blot analysis of total cortex homogenates. Bidimensional gel electrophoresis, Western blotting to HNE, in-gel digestion, and MS revealed GFAP as the first or unique candidate in every individually analyzed spot from FTLD-tau, FTLD-U, and FTLD-MND cases. Additional spots were also observed in individual cases, thus suggesting that other proteins may be additional targets of lipoxidation. Because of the extreme variability among cases, however, no further attempts were made to characterize these additional spots. Finally, double labeling immunofluorescence and confocal microscopy revealed the presence of HNE and SOD1 only in reactive cortical astrocytes in FTLD cases and SOD2 in neurons and astrocytes. Increased expression levels of catalase that correlated with oxidative damage were also demonstrated in Western blots of total frontal cortex homogenates.

Previous studies have shown GFAP to be a target of oxidation in Alzheimer disease (39, 54) and certain tauopathies such as Pick disease (46) and progressive supranuclear palsy (55). Glial fibrillary acidic protein oxidation has, however, also been reported in conditions not associated with tau pathology, such as aceruloplasminemia (56), diabetic retina (57), and Huntington disease (58). The present observations also indicate that although prominent GFAP lip-

oxidative damage occurs in FTLD-tau, GFAP is also involved in FTLD cases without tau pathology, including FTLD-U and FTLD-MND. On the other hand, not all FTLD-U cases with increased GFAP have similarly increased expression of HNE adducts.

In summary, disease-specific oxidative damage and fatty acid patterns seem to underlie different FTLD subtypes; these are particularly pronounced in FTLD-tau cases. Furthermore, the present findings show astrocytes as targets of lipoxidative damage, GFAP as a target of lipoxidation, and that astrocytes are crucial elements of oxidative stress responses in FTLD. Further work is needed to elucidate common and specific pathological metabolic pathways in FTLD-tau, FTLD-U, and FTLD-MND.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the anonymous reviewers for suggestions and T. Yohannan for editorial help.

Brain samples were obtained from the Institute of Neuropathology and University of Barcelona/Hospital Clinic Brain Banks following the guidelines and approval of the local ethics committees.

REFERENCES

1. Lowe J, Rossor M. Frontotemporal lobar degeneration. In: Dickson D, ed. *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. Basel, Switzerland: ISN Neuropath Press, 2003; 342–48
2. Froelich-Fabre S, Skoglund L, Ostojic J, et al. Clinical and molecular aspects of frontotemporal dementia. *Neurodegener Dis* 2004;1:218–24
3. Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2005;4:771–80
4. Knibb JA, Kipps CM, Hodges JR. Frontotemporal dementia. *Curr Opin Neurol* 2006;19:565–71
5. Brun A. Identification and characterization of frontal lobe degeneration: Historical perspective on the development of FTD. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2007;21:S3–S4
6. Kumar-Singh S, van Broeckhoven C. Frontotemporal lobar degeneration: Current concepts in the light of recent advances. *Brain Pathol* 2007; 17:104–13
7. Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IRA, et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: Consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 2007;114:5–22
8. Ferrer I, Roig C, Espino A, et al. Dementia of frontal lobe type and motor neuron disease. A Golgi study of the frontal cortex. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1991;54:932–34
9. Ferrer I, Tuñon T, Serrano MT, et al. Calbindin D-28k and parvalbumin immunoreactivity in the frontal cortex in patients with frontal lobe dementia of non-Alzheimer type associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1993;56:257–61
10. Ferrer I. Neurons and their dendrites in frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999;10(suppl 1):55–60
11. Goedert M, Crowther RA, Spillantini MG. Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 1998;21:955–58
12. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Ann Rev Neurosci* 2001;24:1121–59
13. Ghetti B, Hutton ML, Wszolek ZK. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 associated with tau gene mutations (FTDP-17T). In: Dickson D, ed. *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. Basel, Switzerland: ISN Neuropath Press, 2003;86–102
14. Alonso A, Mederlyova A, Novak M, et al. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem* 2004;279:34873–81

15. Goedert M. Tau gene mutations and their effects. *Mov Disord* 2005; 20(suppl 12):S45–S52
16. Gasparini L, Terri B, Spillantini MG. Frontotemporal dementia with tau pathology. *Neurodegener Dis* 2007;4:236–53
17. Muñoz DG, Ferrer I. Neuropathology of hereditary forms of frontotemporal dementia and parkinsonism. *Handb Clin Neurol* 2008;89: 393–414
18. Josephs KA, Holton JL, Rossor MN, et al. Frontotemporal lobar degeneration and ubiquitin immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004;30:369–73
19. Sampathu DM, Neumann M, Kwong LK, et al. Pathological heterogeneity of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions delineated by ubiquitin immunohistochemistry and novel monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 2006;169:1343–52
20. Mackenzie IR, Baborie A, Pickering-Brown S, et al. Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: Classification and relation to clinical phenotype. *Acta Neuropathol* 2006;112: 539–49
21. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006;442:916–19
22. Cruts M, Gijselink I, van der Zee J, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006;442:920–24
23. Mukherjee O, Pastor P, Cairns NJ, et al. HDDD2 is a familial frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, tau-negative inclusions caused by a missense mutation in the signal peptide of progranulin. *Ann Neurol* 2006;60:314–22
24. Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, et al. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet* 2006;15:2988–3001
25. Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 2004;36: 377–81
26. Guyant-Maréchal L, Laquerrière A, Duyckaerts C, et al. Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features. *Neurology* 2006;67:644–51
27. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, et al. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 2005;37:806–8
28. Holm IE, Englund E, Mackenzie IR, et al. A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:884–91
29. Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2–21.3. *Brain* 2006;129:868–76
30. Talbot K, Ansorge O. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: Common pathways in neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet* 2006;15:R182–87
31. Mackenzie IR, Rademakers R. The molecular genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: Recent developments. *Neurogenetics* 2007;8:237–48
32. Mackenzie IR, Shi J, Shaw CL, et al. Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta Neuropathol* 2006;112:551–59
33. Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 1999;9:133–46
34. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, et al. Review: Alzheimer's amyloid peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* 2000;130:184–208
35. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Acta* 2000;1502:139–44
36. Butterfield DA, Kanski J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* 2001;122:945–62
37. Liu Q, Raina AK, Smith MA, et al. Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Mol Aspects Med* 2003;24:305–13
38. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, et al. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 2005;64: 1152–56
39. Pamplona R, Dalfó E, Ayala V, et al. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem* 2005;280:21522–30
40. Pamplona R, Ilieva E, Ayala V, et al. Maillard reaction versus other non-enzymatic modifications in neurodegenerative processes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1126:315–19
41. Albers DS, Augood SJ, Park LC, et al. Frontal lobe dysfunction in progressive supranuclear palsy: Evidence for oxidative stress and mitochondrial impairment. *J Neurochem* 2000;74:878–81
42. Odetti P, Garibaldi S, Norese R, et al. Lipoperoxidation is selectively involved in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:393–97
43. Martínez A, Dalfó E, Muntané G, et al. Glycolytic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal cortex and oxidative damage of these proteins is increased in progressive supranuclear palsy. *J Neural Transm* 2008;115:59–66
44. Gerst JL, Siedlak SL, Nunomura A, et al. Role of oxidative stress in frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 10(suppl 1):85–87
45. Lladó A, Sánchez-Valle R, Rey MJ, et al. Clinicopathological and genetic correlates of frontotemporal lobar degeneration and corticobasal degeneration. *J Neurol* 2008;114:1051–54
46. Muntané G, Dalfó E, Martínez A, et al. Glial fibrillary acidic protein is a major target of glycooxidative and lipoxidative damage in Pick's disease. *J Neurochem* 2006;99:177–85
47. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10: 389–406
48. Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, et al. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 1997;17:5089–100
49. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003;42:318–43
50. Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* 2003;24:281–91
51. Schweitzer K, Decker E, Zhu L, et al. Aberrantly regulated proteins in frontotemporal dementia. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348: 465–72
52. David DC, Hauptmann S, Scherping I, et al. Proteomic and functional analysis reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem* 2005;280:23802–14
53. Ilieva EV, Ayala V, Jove M, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2007; 130:3111–23
54. Korolainen MA, Auriola S, Nyman TA, et al. Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol Dis* 2005;20:858–70
55. Santpere G, Ferrer I. Delineation of early changes in cases with progressive supranuclear palsy-like pathology. Astrocytes in striatum are primary targets of tau phosphorylation and GFAP oxidation. *Brain Pathol* 2008; May 6 [Epub ahead of print]
56. Kaneko K, Nakamura A, Yoshida K, et al. Glial fibrillary acidic protein is greatly modified by oxidative stress in aceruloplasminemia brain. *Free Radic Res* 2002;36:303–6
57. Baydas G, Tuzcu M, Yasar A, Baydas B. Early changes in glial reactivity and lipid peroxidation in diabetic rat retina: Effects of melatonin. *Acta Diabetol* 2004;41:123–28
58. Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, et al. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington's disease. *Free Radic Biol Med* 2008;45:667–78

4. Protein Targets of Oxidative Damage in Human Neurodegenerative Diseases with Abnormal Protein Aggregates

Anna Martínez, Manuel Portero-Otin, Reinald Pamplona, Isidre Ferrer.

Brain Pathol. 2009 Aug 6. [Epub ahead of print]

Les malalties humanes neurodegeneratives presenten proteïnes anormalment agregades, associades amb alteracions en les modificacions post translacionals, la solubilitat, l'agregació i la formació de fibrilles. A més a més de l'acumulació d'aquestes proteïnes principals, hi han d'altres mecanismes implicats en la neurodegeneració que probablement podrien explicar alguns aspectes importants, com per exemple determinar la seqüència dels diferents processos moleculars, la selectiva vulnerabilitat cel·lular i la progressió de la malaltia en els diferents casos individuals. Un d'aquests mecanismes és l'estrès oxidatiu, el qual es troba en la majoria, per no dir en totes, de malalties degeneratives del sistema nerviós.

La present revisió descriu la majoria de proteïnes dianes que han estat identificades com a modificades nitro/oxidativament, utilitzant gels d'electroforesi bidimensionals, western blot i espectrometria de masses en la malaltia d'Alzheimer, d'altres taupaties com la paràlisi supranuclear progressiva, la malaltia de Pick, la malaltia de grans argidòfils i la degeneració del lòbul frontotemporal lligada a mutacions de la proteïna tau; la malaltia de Parkinson i α -sinucleopaties relacionades; la malaltia d'Huntington i l'esclerosi lateral amiotròfica, juntament amb models animals i cultius cel·lulars. Les proteïnes vulnerables es van agrupar majoritàriament en: vies metabòliques (incloses la glicòlisi i el metabolisme energètic), citoesquelet, xaperones, resposta a l'estrès cel·lular i elements del sistema ubiquitina-proteosoma. Gràcies al recull d'informació bibliogràfica es va fer patent la importància de les vies metabòliques que es troben perjudicades per la lesió oxidativa en diverses malalties degeneratives humanes i que el dany oxidatiu succeeix en estadis primerens de la malaltia. Es va observar que els estudis funcionals paral·lels a la identificació de la proteïna oxidada són limitats i que són necessaris d'altres anàlisis per corroborar que els resultats de l'oxidació de les proteïnes comporten una pèrdua de l'activitat i/o alteracions en la seva funcionalitat. Un millor coneixement de les proteïnes susceptibles a l'oxidació i a la nitració permetrà definir la relació de les alteracions metabòliques en estadiatges inicials de la malaltia, per poder intervenir terapèuticament atenuant la progressió de la malaltia.

REVIEW ARTICLE

Protein Targets of Oxidative Damage in Human Neurodegenerative Diseases with Abnormal Protein Aggregates

Anna Martínez¹; Manuel Portero-Otin²; Reinald Pamplona²; Isidre Ferrer¹

¹ Institut de Neuropatologia, Institut d'Investigació de Bellvitge-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain.

² Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida-Institut de Recerca Biomedica de Lleida, Lleida, Spain.

Keywords

Alzheimer disease, amyotrophic lateral sclerosis, cytoskeleton, energy metabolism, Huntington disease, mitochondria, neurodegeneration, nitration, oxidative stress, Parkinson disease, tauopathies.

Correspondence author:

Isidro Ferrer, MD, Institut Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Carrer Feixa LLarga sn, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain (E-mail: 8082ifa@gmail.com)

Received 15 July 2009; accepted 17 July 2009.

doi:10.1111/j.1750-3639.2009.00326.x

Abstract

Human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates are associated with aberrant post-translational modifications, solubility, aggregation and fibril formation of selected proteins which cannot be degraded by cytosolic proteases, ubiquitin–proteasome system and autophagy, and, therefore, accumulate in cells and extracellular compartments as residual debris. In addition to the accumulation of “primary” proteins, several other mechanisms are involved in the degenerative process and probably may explain crucial aspects such as the timing, selective cellular vulnerability and progression of the disease in particular individuals. One of these mechanisms is oxidative stress, which occurs in the vast majority of, if not all, degenerative diseases of the nervous system. The present review covers most of the protein targets that have been recognized as modified proteins mainly using bidimensional gel electrophoresis, Western blotting with oxidative and nitrosative markers, and identified by mass spectrometry in Alzheimer disease; certain tauopathies such as progressive supranuclear palsy, Pick disease, argyrophilic grain disease and frontotemporal lobar degeneration linked to mutations in tau protein, for example, FTLT-tau, Parkinson disease and related α -synucleinopathies; Huntington disease; and amyotrophic lateral sclerosis, together with related animal and cellular models. Vulnerable proteins can be mostly grouped in defined metabolic pathways covering glycolysis and energy metabolism, cytoskeletal, chaperoning, cellular stress responses, and members of the ubiquitin–proteasome system. Available information points to the fact that vital metabolic pathways are hampered by protein oxidative damage in several human degenerative diseases and that oxidative damage occurs at very early stages of the disease. Yet parallel functional studies are limited and further work is needed to document whether protein oxidation results in loss of activity and impaired performance. A better understanding of proteins susceptible to oxidation and nitration may serve to define damaged metabolic networks at early stages of disease and to advance therapeutic interventions to attenuate disease progression.

INTRODUCTION

In most aerobic cell types the mitochondrial respiratory chain is one of the main sources of generation of reactive oxygen species (ROS) under physiologic conditions (6, 45, 46, 68, 83, 112). In addition to mitochondria, peroxisomes, endoplasmic reticulum, microsomes, nucleus and plasma membrane oxidases are potential sources of ROS. Univalent oxygen reduction by the mitochondrial respiratory chain, as well as metal-ion-catalyzed reactions, generates a wide diversity of highly reactive metabolites of oxygen and nitrogen. These products mainly include superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($HO\cdot$), which can be formed from either the O_2^- and H_2O_2 (Haber–Weiss reaction) or from metal ion (Fe^{2+} , Fe^{3+}) and H_2O_2 (Fenton reaction), peroxy

radical ($RO_2\cdot$), alkoxyl radical ($RO\cdot$), hydroperoxyl radical ($HO_2\cdot$), hypochlorous acid (HOCl), hypobromous acid (HOBr) and singlet oxygen (O_2) (50).

ROS plays a vital signaling role in physiologic conditions (50, 66, 120). However, ROS surpassing antioxidant cellular stress responses can be considered a significant source of endogenous structural damage to other cellular macromolecules, including DNA, RNA, carbohydrates, lipids and proteins, finally producing cytotoxic effects.

Nitric oxide ($NO\cdot$) is produced by the oxidation of one of the terminal guanidinitrogen atoms of L-arginine catalyzed by different isoforms of nitric oxide synthase. NO plays a crucial role in physiologic conditions, such as autoimmunity, muscular relaxation and neurotransmission.

Nevertheless, NO· is also a source of harmful reactive nitrogen species (RNS). Main RNS are nitrogen dioxide ($\cdot\text{NO}_2$), nitrous acid (HNO_2), nitrosyl cation (NO^+), nitrosyl anion (NO^-), dinitrogen tetroxide (N_2O_4), dinitrogen trioxide (N_2O_3), peroxyxynitrite (ONOO^-), peroxyxynitrous acid (ONOOH), alkyl peroxyxynitrites (ROONO), nitronium cation (NO^+) and nitryl chloride (NO_2Cl) (66).

All amino acid residues are susceptible to oxidation, but ion-catalyzed oxidation of some residues may result in the production of protein carbonyl derivatives (37, 108, 111). Characteristic products are glutamic semialdehyde and amino adipic semialdehyde, which are derived from arginine/proline and lysine, respectively (38, 102). Because the magnitude of protein carbonylation is higher than any other primary change resulting from oxidation, carbonylation of proteins is currently used as a marker of protein oxidation in variegated settings (1, 15, 35, 60, 110).

In addition to direct effects, protein oxidative modifications may also occur following the reaction of distinct reactive carbonyl species (RCS) as glyoxal, glycoaldehyde, methylglyoxal, malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE), derived from the oxidation of carbohydrates and lipids. Carbonyl species react with lysine, arginine and cysteine residues leading to the formation of advanced glycation and lipoxidation end-products (AGE/ALEs) in proteins. Typical AGEs/ALEs adducts are MDA-lysine (MDAL), carboxymethyl-lysine (CML) and carboxyethyl-lysine (CEL), among many others (82, 85, 122, 124).

Regarding RNS, NO damage to thiols, amines and hydroxyls leads to nitrosative damage. Reactions with RNS lead to the formation of 3-nitrotyrosine (nitration) and to oxidation of distinct substrates. As an example, reactive peroxyxynitrite is able to nitrate tyrosine residues and to oxidize methionine residues of proteins (55, 99, 121).

Cells have developed different mechanisms to prevent oxidative molecular damage. Antioxidant enzymes are superoxide dismutases, including cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1), matrix mitochondrial Mn-superoxide dismutase (SOD2) and extracellular superoxide dismutase 3 (SOD3); catalase; glutathione peroxidase; peroxiredoxin; and some molecular chaperones. Non-enzymatic systems composed of different proteins such as ferritin (binds iron in the cytoplasm of mammalian cells) and ceruloplasmin (binds copper in plasma) have the capacity to bind transition metals in oxidation reactions. Finally, α -tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C), glutathione (*L*- γ -glutamyl-*L*-cysteinylglycine), flavonoids and carotenoids may act as antioxidants (50).

The concept of oxidative stress has been applied to the imbalance between the generation of ROS/RNS/RCS, and the cellular antioxidant defense mechanisms (4, 49). This may result in oxidative damage to varied molecules including DNA, RNA, lipids and proteins. Oxidative damage increases in aging (15, 47, 60, 97, 109–111). The nervous system is particularly susceptible to oxidative stress because of the abundance of Polyunsaturated fatty acids (PUFA) content, especially arachidonic and docosahexaenoic acids, the high oxygen consumption rate, and the relatively low levels of antioxidant pathways (7, 14, 31). The presence of increased oxidative stress and oxidative damage in neurodegenerative diseases has been recognized for years, and it has been the subject of hundreds of papers and reviews (25, 39, 41, 44, 61–63, 67, 75, 80, 81, 90, 98, 113, 127–129). However, little is known about the specific protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases.

The term proteomics is used to define the analysis of the whole proteins expressed by a genome. Redox proteomics is used to name the analysis of proteins modified by oxidation and nitration (16, 34). The term *redox proteomics* is instrumental as it serves to identify proteins that are damaged as a result of oxidation as well as the methods used to recognize modified proteins (36).

The objectives of the present review are (i) to list proteins modified by oxidation/nitration identified so far in neurodegenerative diseases covering Alzheimer disease (AD), tauopathies, Parkinson disease (PD) and related α -synucleinopathies, Huntington disease (HD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and related animal and cellular models; (ii) to give information about the methods used to identify those proteins in the different studies; (iii) to identify vulnerable metabolic pathways in individual diseases and vulnerable proteins common to different neurodegenerative disorders; (iv) to investigate the effects of oxidative stress on protein targets at early stages of neurodegenerative diseases to learn whether oxidative damage to proteins is an early event in degenerative diseases of the nervous system; (v) to find out whether studies dealing with protein damage resulting from oxidation/nitration have been accompanied by studies focused on associated loss of function; (vi) to clarify whether information is available regarding the involvement of particular cell types; (vii) to discuss limitations of redox proteomics; and (viii) to comment on aspects that may help to improve the use and results of redox proteomics applied to the study of neurodegenerative diseases.

IDENTIFICATION OF OXIDIZED AND NITRATED PROTEINS

Several methods are currently used to identify oxidative stress and oxidative damage in tissues (36, 37). Yet the majority of studies dealing with the identification of proteins modified by oxidation in human neurodegenerative diseases are based on bidimensional gel electrophoresis of paired gels run in parallel—one of them is used to transfer proteins to membranes to carry out Western blotting with specific oxidative damage markers, and the other serves to pick up selected spots for protein identification by mass spectrometry. Common antibodies utilized to identify modified proteins are anti-AGE, anti-CEL, anti-CML, anti-3-NTyr, anti-MDAL and anti-HNE. The recognition of spots of modified proteins in Western blots is conducted in the parallel gels stained with Coomassie blue, SYPRO Ruby or silver. This is followed by in-gel digestion of the selected spots, analysis of fingerprints by MALDI mass spectrometry and identification of proteins using a database. To detect carbonyls, samples are derivatized to hydrazones with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) usually before the separation of proteins.

Several variables are introduced in different studies, including the characteristics of buffers of homogenates and the solutions used for protein loading. These aspects may have implications on the range and type of proteins finally transferred to membranes for Western blotting labeling (see section Pitfalls and limitations).

The effects of post-mortem delay in the study of oxidized/nitrated proteins in human brain has been analyzed by freezing part of the sample immediately 1 or 2 h after death, and storing pieces of the remaining sample at -4°C (thus mimicking corpse preservation) and then freezing them at 2, 6, 8, 12, 18, 24 and 48 h at -80°C until use. Monodimensional gel electrophoresis and Western blot-

ting to anti-MDAL, anti-HNE, anti-CEL, anti-CML and anti-3-NTyr antibodies has demonstrated good preservation up to 12–18 h. Yet reduction or enhancement of the intensity of previous bands and appearance of new bands occurs from this time onward (43).

The relevant methodological aspects in individual studies, including use of total homogenates or subfractions, buffers, regions examined, gel staining, methods employed for mass spectrometry and software characteristics, are shown in Tables S1–S3 (Supporting Information).

ALZHEIMER DISEASE

Excellent reviews of oxidatively damaged proteins in AD and related models, identified by researchers of the University of Kentucky, have recently appeared (20, 118). Yet other groups have significantly contributed to identify proteins modified by oxidation. For these reasons, the present review updates and complements the list by adding important observations made in other centers. To facilitate understanding, vulnerable proteins have been grouped in defined metabolic pathways covering glycolysis and energy metabolism, mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation, structural proteins, chaperones, stress proteins, ubiquitin–proteasome system components, and other proteins.

Glycolysis and energy metabolism

Aldolase A, which catalyzes D-fructose 1,6-bisphosphate to glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate, is modified by oxidation and nitration at middle and advanced stages of AD (57, 101); oxidative damage to aldolase C has also been detected in advanced stages of AD (58). Triose phosphate isomerase, which catalyzes the reversible interconversion of glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate, is also modified by oxidation and nitration at middle and advanced stages (24, 101, 115). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), involved in the two-step reaction that transforms glyceraldehyde 3-phosphate to D-glycerate 1,3-bisphosphate, is modified by S-glutathionylation (77) and nitration (117) in AD.

Interestingly, GAPDH is carbonylated in the brain of Wistar rats following intracerebral injection of amyloid-beta_{1–42} (A β _{1–42}) (12), and in neuronal cultures treated with A β _{1–42} (116).

Phosphoglycerate kinase (PGK) catalyzes the reaction of D-glycerate 1,3-bisphosphate with adenosine diphosphate (ADP) to form adenosine triphosphate (ATP) and 3-phosphoglycerate. Oxidized PGK, as detected using anti-4-HNE, has been shown at middle stages of AD-related pathology to be clinically manifested as mild cognitive impairment (100).

Phosphoglycerate mutase (PGM) catalyzes an internal transfer of a phosphate group from 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate. Isoform B (PGM-1) is more oxidized and nitrated in AD cases than in age-matched controls (101, 115).

Similarly, PGM-1 was more carbonylated in 3-month-old male Wistar rats following intracerebral injection of A β _{1–42} when compared with controls (12).

Enolases, which modulate the reaction of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate in the next-to-last step of glycolysis, are targets of oxidative and nitrosative damage in AD. α -Enolase has increased carbonylation, lipoxidation, S-glutathionylation and

nitration levels in advanced stages of AD and in cases of mild cognitive impairment (19, 23, 24, 77, 84, 100, 101, 114, 115). Likewise, increased oxidized α -enolase has been found in the brain of mutant Tg2576 mice which bear the Swedish APP mutation causative of familial AD (105).

Increased modification of enolase, as revealed with anti-DNPH, anti-MDAL and anti-3NTyr antibodies, has been described in sporadic AD and in cases with familial AD linked with mutations in presenilin-1 (18, 24, 84).

The last enzyme of glycolysis is pyruvate kinase (PK), which catalyzes the step from phosphoenolpyruvate to pyruvate, thus transferring phosphate to ADP to form ATP. Increased oxidation of isoform PK-M2 was reported in human brain samples of cases with mild cognitive impairment by using anti-DNPH and anti-HNE antibodies (19, 100). In the same line, increased PK oxidation occurred in neuronal cultures from rat fetuses exposed to A β _{1–42} (116).

Two enzymes of the Krebs cycle appear to be targets of oxidation in AD and related models. Pyruvate dehydrogenase, which catalyzes the step from pyruvate to acetyl-CoA, is more carbonylated in the brain of rats treated with intracerebral injection of A β _{1–42} (12). Malate dehydrogenase, which catalyzes the interconversion of malate and oxaloacetate using nicotinamide adenine as a coenzyme, has increased levels of carbonylation in primary rat neuronal cultures treated with A β _{1–42} (116). Moreover, similar results have been obtained in transgenic *Caenorhabditis elegans* (13).

In addition to enzymes involved in glycolysis and Krebs cycle, several proteins linked to variegated metabolic reactions have been shown to be targets of oxidative damage in AD. These include carbonyl reductase 1, an oxoreductase enzyme related to arachidonic acid metabolism (100), carbonyl anhydrase (58), carbonic anhydrase II (CA II) (114, 117), and glutamate dehydrogenase, which converts glutamate to α -ketoglutarate (101). Increased carbonyl levels in GDH have also been discovered in gerbil synaptosomes exposed to A β _{1–42} (11).

Related to nitrogen metabolism, glutamine synthetase (GS), which catalyzes glutamate and ammonia to form glutamine, is more oxidized in AD cases when compared with age-matched controls (19, 22). Increased oxidation of glutamate-ammonia ligase, a transferase enzyme, occurs after intracerebral injection of A β _{1–42} in rat brain (12). Finally, lactate dehydrogenase B (LDH 2), which participates in the interconversion of pyruvate and lactate, is more oxidized in cases of AD presenting as mild cognitive impairment compared with controls (100).

Electron transport chain, oxidative phosphorylation and other mitochondrial components

Complex V or ATP synthase catalyzes the synthesis of ATP from ADP and inorganic phosphate with a flow of protons from the intermembrane space to the matrix side. Several studies have found lipoxidized and nitrated ATP synthase in middle and advanced stages of AD (84, 100, 117). ATP synthase oxidative damage is a very early event in AD, as ATP synthase has been found oxidized and its function reduced in the entorhinal cortex in asymptomatic cases with Braak II AD-related pathology (119).

In the same line, ATP synthase is more carbonylated in stable transgenic *C. elegans* strain CL 2337 when compared with wild worms (13).

Ubiquinol–cytochrome c reductase complex core protein I is a component of the complex III, which helps to link the complex between cytochromes c and c1. This protein is more lipoxidated in the frontal cerebral cortex of advanced AD when compared with control samples (84).

Evidence of increased oxidative damage in creatine kinase BB (CK BB) derives from the observation that specific protein carbonyl content is higher in AD cases when compared with controls (2, 3, 22), and in AD-related mice models (26).

Voltage-dependent anion-channel protein-1 (VDAC-1) is a porin that forms a channel through the mitochondrial outer membrane and the plasma membrane. It helps the transport of a variety of purine nucleotides (responsible for ATP/ADP exchange) and allows the diffusion of small hydrophilic molecules. VDAC-1 also has an important role as a regulator of mitochondrial function. Nitrated VDAC-1 is significantly increased in AD (117).

Structural proteins

Cytoskeletal proteins are targets of oxidative damage in AD. Increased β -actin carbonylation has been found in sporadic AD and in familial AD due to mutations in presenilin-1 (3, 18). Similar changes occur at earlier stages of AD corresponding with clinical symptoms of mild cognitive impairment (100). Transgenic *C. elegans* expressing human $A\beta_{1-42}$ also show β -actin oxidative damage (13). Increased β -actin oxidation also occurs in synaptosomes of Mongolian gerbils exposed to $A\beta_{1-42}$ (11, 12).

Oxidative damage to α -tubulin 1, as revealed with anti-MDAL antibodies, has been reported in AD (84). Tubulins are also targets of oxidative damage in the brains of rats following intracerebral injection of $A\beta_{1-42}$ (12).

By using a different approach, it has been shown that high molecular neurofilament proteins are substrates of adduction by HNE (123). Carbonyl-related modifications of neurofilament protein have been shown in neurofibrillary tangles in AD (106).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is oxidized in the normal aged brain, but GFAP oxidative damage increases in AD (57, 84) and related animal models (11).

Chaperones, stress proteins and stress responses

There is cumulative evidence of increased oxidation of several chaperones including HSC-71 (23) and HSP-70 (100) in AD, and HSP-60 in experimental models (12, 26). α B-crystallin is also a target of S-glutathionylation in AD (77).

Pin-1 is a protein within the peptidyl-prolyl isomerase family with chaperone activity involved in several cellular functions, including the modulation of assembly and folding of several proteins. Increased oxidized Pin-1 level, using anti-DNPH antibodies, has been found in the hippocampus in AD (114).

Regarding oxidative stress responses, SOD1 is oxidatively damaged in AD (28).

Ubiquitin–proteasome system

Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1 (UCHL-1) belongs to a family of proteases with high specificity for ubiquitinated substrates. Increased levels of carbonylated and oxidized UCHL-1

have been reported in AD (22). Oxidative modifications of UCHL-1 in AD have also been reported by independent groups (27).

Additional targets of oxidative damage in AD

Other proteins are oxidatively damaged or are targets of nitration in AD cases. Most of the descriptions refer to unique reports that should be validated by further studies. Moreover, some of them appear as isolated molecules within a particular metabolic pathway. A list of altered proteins in AD is shown in Table 1. In addition to AD, details are also provided for several experimental models including intracerebral injection of $A\beta_{1-42}$ in rats and gerbils, transgenic mice, transgenic *C. elegans* and transfected cell lines.

TAUOPATHIES

Studies in tauopathies including progressive supranuclear palsy (PSP), Pick disease (PiD), argyrophilic grain disease (AGD) and familial frontotemporal lobar degeneration linked to *MAPT* mutations (FTLD-tau) are still very limited.

Energy metabolism enzymes phosphoglycerate kinase 1 (PGK-1) and aldolase A have been shown to be oxidatively modified in frontal cortex in terminal PSP stages (65). In addition, GFAP has been identified as a major target of oxidative damage in the striatum in conventional PSP and in cases with PSP-like pathology consistent with early pre-symptomatic stages of the disease (103).

Increased oxidation of GFAP is also encountered in the amygdala in AGD (103), and in the cerebral cortex of FTLD-tau (64) and PiD (54, 74). Oxidative damage to GFAP also occurs, although to a lesser extent, in the cerebral cortex in FTLD with ubiquitin-positive, tau-negative inclusions (FTLD-U) and in FTLD associated with motor neuron disease FTLD-MND (64).

Other proteins that are targets of oxidative damage in PiD are listed as follows: vesicle-fusing ATPase, cathepsin D precursor isoforms, carbonyl reductase NADPH1 isoforms, GAPDH and HSP-7054.

Additional data of studies dealing with protein oxidative damage in selected tauopathies is shown in Table 2.

PARKINSON DISEASE AND RELATED α -SYNUCLEINOPATHIES

Several proteins are damaged by oxidation in PD and dementia with Lewy bodies (DLB). One of them is α -synuclein, which is oxidized in the substantia nigra even at very early stages of PD (32). α -synuclein oxidative damage also occurs in the frontal cortex in PD and DLB, but also at preclinical (pre-motor) stages in which neuropathologic features (Lewy bodies) are restricted to selected nuclei of the brain stem at the time of the post-mortem study (incidental PD) (32). Other proteins, the mutations of which are causative of familial or sporadic PD, are also targets of oxidative damage in sporadic PD, such as DJ-1, which is modified by carbonylation (29). Parkin is S-nitrosated in the brain of PD (30, 126). These aspects have functional implications as oxidative stress-induced aggregation of parkin is followed by decreased parkin E3 ligase activity and impaired proteasome function (59). Down-regulation and increased oxidation of UCHL-1 has also been reported in PD (27).

Table 1. Alzheimer disease.

Reference	Disease/stage	Protein	Function	Detection antibody	Degree of oxidation in relation to age-matched controls	Enzymatic activity	Total protein levels	Comments
Aksenov <i>et al</i> (2)	AD	CK BB	Energy transduction	Anti-DNPH antibody	↑	↓	↓	—
Aksenov <i>et al</i> (3)	AD	β-tubulin	Cytoskeleton	Anti-DNPH antibody	=	NA	NA	—
		β-actin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—
		CK BB	Energy transduction		↑	NA	NA	—
Castegna <i>et al</i> (22)	AD	CK BB	Energy transduction	Anti-DNPH antibody	↑	NA	NA	—
		UCHL-1	UPS		↑	NA	NA	—
		GS	Amino acid biosynthesis		↑	NA	NA	—
Castegna <i>et al</i> (23)	AD	DRP-2	Pyrimidine metabolism	Anti-DNPH antibody	↑	NA	NA	—
		α-enolase	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		HSC-71	Chaperone		↑	NA	NA	—
Castegna <i>et al</i> (24)	AD	α-Enolase	Glycolysis	Anti-3-NTyr antibody	↑	NA	NA	—
		Triosephosphate isomerase	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		Neuropolypeptide h3 protein	Phospholipid binding		↑	NA	NA	—
		β-actin	Cytoskeleton		=	NA	NA	—
		LDH	Glycolysis		=	NA	NA	—
		γ-enolase	Glycolysis		=	NA	NA	—
Choi <i>et al</i> (27)	AD	UCH-L1	UPS	Anti-DNPH antibody	↑	NA	↓ 50%	identification of oxidation sites IHC
Choi <i>et al</i> (28)	AD	SOD1	Antioxidant response	Anti-DNPH antibody	↑	NA	↑	IHC
Pamplona <i>et al</i> (84)	AD Stages V-VI/C	Neurofilament triplet L	Cytoskeleton	Anti-MDAL-antibody	↑ (3-fold)	NA	NA	—
		Vimentin	Cytoskeleton		=	NA	NA	—
		β-tubulin 2	Cytoskeleton		=	NA	NA	—
		α-tubulin 1	Cytoskeleton		↑ (9-fold)	NA	NA	—
		α-tubulin 4	Cytoskeleton		=	NA	NA	—
		α-tubulin 6	Cytoskeleton		=	NA	NA	—
		β-actin	Cytoskeleton		=	NA	NA	—
		γ-actin	Cytoskeleton		=	NA	NA	—
		GFAP	Cytoskeleton		↑ (8-fold)	NA	NA	—
		γ-enolase	Glycolysis		↑ (2-fold)	NA	NA	—
		α-enolase	Glycolysis		=	NA	NA	—
		Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein I	Electron transport chain		↑ (4-fold)	NA	NA	—
		ATP synthase (β chain)	Oxidative phosphorylation		↑ (4-fold)	NA	NA	—
		CK BB	Energy transduction		=	NA	NA	—
		GS	Amino acid biosynthesis		=	NA	NA	—
		Glutamate dehydrogenase 1	Amino acid biosynthesis		=	NA	NA	—
		Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) β	Signal transduction		=	NA	NA	—
		60-kDa HSP	Chaperone		=	NA	NA	—
		Dihydropyrimidinase-related protein-2	Pyrimidine metabolism		=	NA	NA	—
Korolainen <i>et al</i> (57)	AD	GFAP	Cytoskeleton	Anti-DNPH antibody	↑	NA	↑	—
		α-actin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—
		β-actin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—
		Enolase	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		CK BB	Energy transduction		↑	NA	NA	—
Korolainen <i>et al</i> (58)	AD Braak stages V-VI	CA II	CO ₂ metabolism	Anti-DNPH antibody	↑	NA	=	Oxp/tp =
		MDH1a	Kreb's cycle		↓	NA	↑	Oxp/tp ↓
		MDH1b	Kreb's cycle		↓	NA	=	Oxp/tp ↓
		Aconitase	Kreb's cycle		↓	NA	=	Oxp/tp =
		Glutamate dehydrogenase	Amino acid biosynthesis		=	NA	=	Oxp/tp ↓
		14-3-3 protein zeta/delta	Cell signalling		↓	NA	=	Oxp/tp =
		Aldolase C	Glycolysis		↓	NA	=	Oxp/tp =
		Aldolase A	Glycolysis		↓	NA	=	Oxp/tp =
		ATP synthase	Oxidative phosphorylation		=	NA	↑	Oxp/tp =

Table 1. Continued.

Reference	Disease/stage	Protein	Function	Detection antibody	Degree of oxidation in relation to age-matched controls	Enzymatic activity	Total protein levels	Comments
Butterfield <i>et al</i> (19)	AD MCI Braak stages III, V, VI	Enolase 1	Glycolysis	Anti-DNPH antibody	↑	↓	NA	IP, IHC
		GS	Energy transduction		↑	↓	NA	IP, IHC
		Pyruvate kinase M2	Glycolysis		↑	↓	NA	—
Butterfield <i>et al</i> (18)	Familial AD with mutations in PS1	PIN 1	Chaperone		↑	↓	NA	—
		γ-enolase	Glycolysis	Anti-DNPH antibody	↑	NA	NA	—
		Actin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—
Sultana <i>et al</i> (115)	AD Hippocampus	DMDMAH-1	Nitric oxide metabolism		↑	NA	NA	—
		UCHL-1	UPS		↑	NA	NA	—
		Pin 1	Chaperone	Anti-DNPH antibody	↑	NA	↓	IP
		DRP-2	Pyrimidine metabolism		↑	NA	↓	—
		PGM 1	Glycolysis		↑	NA	↓	—
		CA II	CO ₂ metabolism		↑	↓	↑	—
		Enolase 1	Glycolysis		↑	↓	↑	—
Sultana <i>et al</i> (114)	AD	TPI	Glycolysis		↑	=	↑	—
		UCHL-1	UPS		↑	↓	↑	—
		Pin 1	Chaperone	Anti-DNPH antibody	↑	↓	↓	—
		CA II	CO ₂ metabolism	Anti-3-N-Tyr antibody	↑	NA	↑	IP: VDAC-1
		α-enolase	Glycolysis		↑	NA	↓	—
Sultana <i>et al</i> (117)	AD	GAPDH	Glycolysis		↑	NA	↓	—
		ATP synthase	Oxidative phosphorylation		↑	NA	↑	—
		VDAC	Ion transporter		↑	NA	=	—
		DJ-1	Antioxidant response	Anti-DNPH antibody	↑	NA	↑	Identification of oxidation sites individual spots in 2D blots normalized with density of corresponding spots in 2D gels
Newman <i>et al</i> (77)	AD	α-enolase	Glycolysis	Anti-GSH antibody	↑	↓	NA	—
		GAPDH	Glycolysis		↑	↓	NA	—
		Deoxyhemoglobin			↑	NA	NA	—
		αB-crystallin	Chaperone		↑	NA	NA	—
Santpere <i>et al</i> (104)	AD Braak stage V CAA	14-3-3 protein gamma	Chaperone, signal transduction	Anti-CEL antibody Anti-MDAL antibody	↑ PHF	NA	NA	—
		14-3-3 protein zeta	Signal transduction		↑ TH in AD, CAA ↑ PHF in AD	NA	NA	—
Reed <i>et al</i> (101)	AD Braak stage V	Peroxiredoxin 2	Antioxidant response	Anti-3-N-Tyr antibody	↑	NA	NA	—
		TPI	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		GDH	Amino acid biosynthesis		↑	↓	NA	—
		Neuropolypeptide h3 protein	Phospholipid binding		↑	NA	NA	—
		H ⁺ transporting ATPase	Oxidative phosphorylation		↑	↓	NA	—
		α-enolase	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		Aldolase 1 Golgi apparatus system	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		PGM1	Glycolysis		↑	NA	NA	—

Table 1. Continued.

Reference	Disease/stage	Protein	Function	Detection antibody	Degree of oxidation in relation to age-matched controls	Enzymatic activity	Total protein levels	Comments	
Reed <i>et al</i> (100)	AD MCI Braak stages III, IV, V, VI	Hippocampus		Anti-HNE antibody					
		Neuropolypeptide h3	Phospholipid binding protein		↑	NA	NA	—	
		Carbonyl reductase 1	Antioxidant response		↑	NA	NA	—	
		LDH	Glycolysis		↑	↓	NA	—	
		PGK	Glycolysis		↑	NA	NA	—	
		HSP70	Chaperone		↑	NA	NA	—	
		ATP synthase	Oxidative phosphorylation		↑	↓	NA	IP	
		α-enolase	Glycolysis		↑	NA	NA	—	
		IPL			Anti-HNE antibody				
		β-actin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—	
		Pyruvate kinase	Glycolysis		↑	↓	NA	—	
		ATP synthase	Oxidative phosphorylation		↑	↓	NA	—	
		eIF-α	Protein synthesis		↑	NA	NA	—	
		EF-Tu	Protein synthesis		↑	NA	NA	—	
Terni <i>et al</i> (119)	AD Braak stages I/II	ATP synthase	Oxidative phosphorylation	Anti-HNE antibody	↑	↓ complex V	=	Treatment with 10 mM NaBH4 for 30 min	
								In-strip DNP derivatization	
Choi <i>et al</i> (26)	ApoE-deficient mice	GFAP	Cytoskeleton	Anti-DNP antibody	↑ Hippocampus = cortex	NA	NA	—	
		CK BB	Energy transduction		↑ Hippocampus = cortex	NA	NA	—	
		Glucose regulated protein, Erp61	Chaperone		↑ Hippocampus = cortex	NA	NA	—	
		Chaperonin subunit 5	Chaperone		↑ Hippocampus = cortex	NA	NA	—	
		Dihydropyrimidinase-related protein 2	Pyrimidine metabolism		↑ Hippocampus = cortex	NA	NA	—	
		Mortalin, Grp70	Chaperone		↑ Hippocampus = cortex	NA	NA	—	
Shin <i>et al</i> (105)	Tg2576 mice bearing the APP Swedish mutation	Anti-DNP antibody		Anti-DNP antibody Anti-3NTyr antibody				—	
		α-enolase	Glycolysis		↑	NA	NA	—	
		Laminin receptor 1	Neurite growth		↑	NA	NA	—	
		Anti-3NTyr antibody							
		Atp5b	Oxidative phosphorylation		↑	NA	NA	—	
		Calpain 12	Cytoskeleton remodeling processes, cell differentiation, apoptosis, signal transduction		↑	NA	NA	—	
Boyd-Kimball <i>et al</i> (12)	Intracerebral injection of Aβ (1–42) to 3-month-old Wistar rats	NBM		Anti-DNP antibody				Sonication in re-hydration buffer on ice	
		14-3-3 ζ	Signal transduction		↑	NA	NA	—	
		HSP-60	Chaperone		↑	NA	NA	—	
		Cortex		Anti-DNP antibody					
		Glutamate-ammonia ligase	Amino acid biosynthesis		↑	NA	NA	—	
		Tubulin β chain 15/α-tubulin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—	
		Hippocampus		Anti-DNP antibody					
		β-synuclein	Regulator of α-synuclein aggregation		↑	NA	NA	—	
		14-3-3 ζ	Signal transduction		↑	NA	NA	—	
		GAPDH	Glycolysis		↑	NA	NA	—	
Pyruvate dehydrogenase	Glycolysis-Kreb's cycle		↑	NA	NA	—			
Phosphoglycerate mutase 1	Glycolysis		↑	NA	NA	—			

Table 1. Continued.

Reference	Disease/stage	Protein	Function	Detection antibody	Degree of oxidation in relation to age-matched controls	Enzymatic activity	Total protein levels	Comments	
Boyd-Kimball <i>et al</i> (11)	Intracerebral injection of Aβ (1–42) to <i>Mongolian gerbils</i> . Study of synaptosomal fractions	γ-actin	Cytoskeleton	Anti-DNPH antibody	↑	NA	NA	—	
		β-actin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—	
		GFAP	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—	
		H ⁺ -transporting two-sector ATPase	Oxidative phosphorylation		↑	NA	NA	—	
		Syntaxin binding protein 1	Synaptic vesicle exocytosis		↑	NA	NA	—	
		GDH	Amino acid biosynthesis		↑	NA	NA	—	
		Dihydropyrimidinase-related protein-2	Pyrimidine metabolism		↑	NA	NA	—	
Boyd-Kimball <i>et al</i> (13)	<i>C.elegans</i> Strain CL 4176 (Aβ 1–42)	EF-Tu	Protein synthesis	Anti-DNPH antibody	↑	NA	NA	—	
		Strain CL 4176 (Aβ 1–42)						Sonication in rehydration buffer on ice	
		Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase	Fatty acid metabolism		↑	NA	NA	—	
		Short-chain acyl-CoA dehydrogenase	Fatty acid metabolism		↑	NA	NA	—	
		Translation elongation factor EF	Protein synthesis		↑	NA	NA	—	
		Malate dehydrogenase	Kreb's cycle		↑	NA	NA	—	
		Arginine kinase	Energy transduction		↑	NA	NA	—	
		RACK1 ortholog	Anchoring activated protein kinase C		↑	NA	NA	—	
		Myosin regulatory light chain	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—	
		Actin	Cytoskeleton		↑	NA	NA	—	
		Adenosine kinase	Purine biosynthesis		↑	NA	NA	—	
		Nematode specific protein	Presynaptic development		↑	NA	NA	—	
		Lipid binding protein	Metabolism		↑	NA	NA	—	
		Transketolase	Calvin's cycle and pentose phosphate pathway		↑	NA	NA	—	
		Proteasome alpha subunit	UPS		↑	NA	NA	—	
		Proteasome beta subunit	UPS		↑	NA	NA	—	
		Glutathione S-transferase	Antioxidant response		↑	NA	NA	—	
		Strain CL 2337			Anti-DNPH antibody				
		ATP synthase α chain	Oxidative phosphorylation		↑	NA	NA	—	
		Nematode-specific protein	Presynaptic development		↑	NA	NA	—	
Glutamate dehydrogenase	Amino acid biosynthesis		↑	NA	NA	—			
Proteasome beta subunit	UPS		↑	NA	NA	—			
Strain XA 1440			Anti-DNPH antibody						
20S proteasome subunit PAS-4	UPS		↑	NA	NA	—			
Sultana <i>et al</i> (116)	Primary neuronal cultures treated with Aβ (1–42)	GAPDH	Glycolysis	Anti-DNPH antibody	↑	NA	NA	Sonication on ice pretreatment of the neuronal cells with D609 reduces protein oxidation	
		14-3-3 zeta	Cell signaling		↑	NA	NA	—	
		Pyruvate kinase	Glycolysis		↑	NA	NA	—	
		MDH	Glycolysis		↑	NA	NA	—	

Table 2. Tauopathies.

References	Disease/stage	Protein	Localization/function	Detection antibody	Degree of oxidation in relation with age-matched controls	Enzymatic activity	Total protein levels	Comments
Muntané <i>et al</i> (74)	PD	GFAP	Cytoskeleton	Anti-AGE, anti-CEL, anti-CML, anti-HNE, anti-MDAL antibodies	↑	NA	NA	—
Ilieva <i>et al</i> (54)	PD	Vesicle-fusing ATPase GFAP Cathepsin D precursor isoform Carbonyl reductase NADPH1 isoforms GAPDH HSP 70	Energy metabolism Cytoskeleton Proteolysis Antioxidant response Glycolysis Chaperone Glycolysis	Anti-DNPH antibody	↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	NA NA NA NA NA NA NA	— — — — — — —	— — — — — — —
Martinez <i>et al</i> (65)	PSP	PGK-1 Aldolase A	Glycolysis Cytoskeleton	Anti-HNE antibody	↑ ↑	NA NA	= =	— —
Santpere and Ferrer (103)	AGD PSP, early-PSP	GFAP (anti-AGE)	Cytoskeleton	Anti-MDAL, anti-AGE, anti-CEL anti-CML antibodies	↑ ↑	NA NA	↑ ↑	— —
Martinez <i>et al</i> (64)	FTLD-tau FTLD-U FTLD-MIND	GFAP	Cytoskeleton	Anti-HNE antibody	↑	NA	↑	IHC Variations depending on the type of FTLD. More marked in FTLD-tau

In addition, increased oxidation of several glycolytic enzymes, the intensity of which increases with disease progression, has been found in PD and related diseases. Aldolase A, enolase 1 and GAPDH were oxidized, as revealed with anti-HNE antibodies, in the frontal cortex in the majority of cases of incidental PD and in all cases of PD and DLB when compared with control samples (48). Subunits of complex I have been observed to be oxidatively damaged, functionally impaired and misassembled in PD brains (56). Other proteins that are vulnerable to oxidative stress in PD are β -synuclein and SOD2 (33).

Transgenic mice overexpressing A30P mutant α -synuclein are also at risk of increased oxidative protein damage. Enolase, LDH and CA II show significantly higher carbonyl levels when compared with controls (95).

Details of studies dealing with protein targets of oxidative damage in PD and related α -synucleinopathies are found in Table 3.

HUNTINGTON DISEASE

Aldolase C, aconitase, GFAP, tubulin, peroxiredoxin 1/2/6, glutathione peroxidase and α B-crystallin were discovered as targets of oxidative modification by showing higher carbonyl levels using DNPH as a marker (107).

Increased carbonyl levels have also been shown in total homogenates of r6/2 strain transgenic HD mice, neuron-specific enolase, HSP90, aconitase, creatine kinase and VDAC have been identified as oxidized proteins (89).

AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Oxidative stress seems crucial in the pathogenesis of ALS (5, 53, 86). Yet practically nothing is known about protein targets of oxidative stress in ALS. GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis (92). Similarly, oxidative modification of SOD1, translationally controlled tumor protein, UCHL-1 and α B-crystallin were evidenced in a mouse model of the disease (96). Transgenic mice expressing human SOD1 gene with a G93A mutation presented oxidized HSP70 and α -enolase in spinal cords, as revealed with anti-HNE antibody, and high levels of carbonyls in α B-crystallin (88).

COMMON AND SPECIFIC PROTEIN TARGETS IN DIFFERENT PATHOLOGIES

Observations carried out by different groups have reached similar results in AD, the most studied disease, by using redox proteomics, thus giving support to the reliability of proteins vulnerable to oxidative and nitrosative stress. β -actin, β -tubulin, GFAP, α -enolase, γ -enolase, aldolase A, glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, ATP synthase, pyruvate kinase, UCHL-1, CK BB and Pin 1 have been identified as targets of oxidative/nitrosative damage, at least, in two different studies (see Table 1).

Also important is the evidence that several proteins linked to glycolysis and energy metabolism are targets of oxidative damage in distinct neurodegenerative diseases. Oxidative damage to aldolase A, α -enolase, LDH, UCHL-1, SOD1, DJ-1 and GAPDH have been reported in AD and PD (14, 19, 22–24, 26–29, 48, 77, 84, 100,

Table 3. Synucleopathies.

Reference	Disease/stage	Protein	Localization/function	Detection antibody	Degree of oxidation in relation to age-matched controls	Enzymatic activity	Total protein levels	Comments
Choi et al (26)	PD	UCHL-1	UPS	Anti-DNPH antibody	↑ (10-fold)	NA	NA	Identification of oxidation sites
Chung et al (30)	PD	Parkin	UPS	Anti-S-nitro-sylated parkin antibody	↑	NA	=	Increase of S-nitrosylated proteins measured by the Saville method parkin S-nitrosylated by the biotin switch method
Yao et al (126)	PD	Parkin	UPS	Anti-S-nitroso-parkin antibody	↑	NA	=	Detection of S-nitrosylated proteins by the biotin switch method
Choi et al (28)	PD	SOD1	Antioxidant response	Anti-DNPH antibody	↑	NA	↑	Identification of oxidation sites
Dalfó et al (33)	iPD	β-synuclein	Regulator of α-synuclein aggregation	Anti-MDAL antibody	↑	NA	NA	—
		SOD2	Antioxidant response	Anti-DNPH antibody	↑	NA	NA	—
Choi et al (29)	PD	DJ-1	Antioxidant response	Anti-DNPH antibody	↑	NA	↑	Identification of oxidation sites
Keeney et al (56)	PD	Mitochondrial complex I	Electron transport chain	Anti-DNPH antibody	↑	↓	=	Immunocapture to isolate the complete complex I in isolated mitochondria
Dalfó and Ferrer (32)	iPD	α-synuclein/md	Synapsis	Anti-MDAL antibody	↑	NA	NA	IP anti-MDAL antibody
Gómez and Ferrer (48)	iPD	Aldolase A	Glycolysis	Anti-HNE antibody	↑	NA	NA	—
	DLB	Enolase 1	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		GADPH	Glycolysis		↑	NA	NA	—
		LDH	Glycolysis	Anti-DNPH antibody	↑	↓	NA	—
Poon et al (95)	A30P α-synuclein transgenic mice	Enolase	Glycolysis		↑	↓	NA	—
		Carbonic anhydrase	CO ₂ metabolism		↑	↓	NA	—

101, 115, 116). Increased oxidative damage to GFAP occurs in AD, tauopathies (PiD, PSP, FTLT-tau and AGD) and HD (54, 57, 65, 84, 103, 107).

Mitochondrial proteins are also vulnerable to oxidative/nitrosative stress in different conditions, although vulnerability of particular proteins appears to be disease-dependent. ATP synthase (complex V) is a target of oxidative damage in AD (84, 100, 117, 119), whereas subunits of complex I have been observed to be oxidatively damaged, functionally impaired and misassembled in PD (56).

These examples will serve to emphasize that certain proteins are damaged by oxidative stress in different pathologies whereas other proteins are selectively damaged in one degenerative disease but apparently not in another. Mitochondrial proteins are paradigms of this assumption.

Available evidence clearly indicates that only a small fraction of proteins exhibit discernible oxidative modifications, suggesting selective vulnerability. Obviously, more studies are needed to evaluate structural/functional factors shared by these proteins (if any) in order to explain this “specificity.” ROS probably act in a random fashion; however, the sensitivities and proximities of potential targets differ. The factors that can affect selectivity of oxidative damage to proteins could include the presence of a metal-binding site, molecular conformation, rate of proteolysis, relative abundance of amino acid residues susceptible to metal-catalyzed oxidation, or even protein abundance (91), among others. In this line, it is clear that modifications present in predominant proteins are easier to detect than modifications in proteins that are less abundant. Studies geared to analyze proteins that are represented at low levels in the brain will improve our understanding of selective vs. non-selective vulnerability.

However, disease-related specificities in protein vulnerability have been demonstrated as well. This is best exemplified with selective vulnerability of certain subunits of the complexes of the respiratory chain in AD and PD. ATP synthase is consistently oxidatively damaged in early stages of AD-related pathology, mild cognitive impairment with AD pathology and advanced stages of AD. In contrast, complex I is consistently altered in PD.

OXIDATIVE CHANGES IN POST-MORTEM BRAIN ARE PRINCIPALLY PRIMARY

Primary or secondary oxidative damage in post-mortem brain is difficult to ascertain as several pre-mortem factors may have produce oxidative damage. However, several complementary data support a primary origin of the observed protein modifications in post-mortem human brain. It is important to stress that targets of oxidative damage are similar in human neurodegenerative diseases, in a case-control approach, and in several animal models covering intracerebral injection of Aβ₁₋₄₂ in rats and gerbils, and transgenic mice and worm models bearing human mutations of APP. Similar profiles have been reproduced in primary cortical cultures treated with Aβ₁₋₄₂.

Together these data point to the likelihood that at least many proteins identified as oxidized in the post-mortem human brain are not modified as a consequence of pre-mortem agonic state but, rather, those modifications are directly linked to the degenerative process.

PROTEIN OXIDATION IS AN EARLY EVENT IN NEURODEGENERATIVE DISEASES

Pioneering studies stressed oxidative damage as an early event in AD (78, 79). In agreement with those predictions, several proteins have been identified as targets of oxidation and nitration in cases clinically manifested as mild cognitive impairment and pathologically verified as middle (IV) or early advanced (V of Braak) stages of AD-related pathology (17, 19, 20, 100, 101). More impressive, oxidative damage of ATP synthase and its associated loss of function has been observed in the entorhinal cortex in asymptomatic cases with neuropathologic AD-related pathology restricted to the entorhinal and perirhinal cortices (stage II of Braak), thus representing the earlier oxidative damage to proteins reported in AD (119).

Protein oxidative damage has also been investigated in other conditions. Protein oxidative damage was increased in brain cortex from ALS patients with lumbar debut (53). Increased oxidative damage of α -synuclein has been found in the substantia nigra at pre-clinical or pre-motor stages of PD (stages II and III of Braak) also known as incidental PD (32). Importantly, increased oxidative damage of α -synuclein, β -synuclein, SOD2, aldolase A, enolase 1 and GADPH has been shown in the cerebral cortex in incidental PD (in addition to PD and DLB) (32, 33, 48). This indicates that the cerebral cortex in PD is involved at very early stages of the disease and that oxidative damage to enzymes linked to energy metabolism and glycolysis, oxidative stress responses, and synucleins is already present at these early stages of the disease and not associated with Lewy pathology (42).

Further studies are needed to unveil oxidative damage at pre-clinical stages in tauopathies and other diseases with abnormal protein aggregates. However, recent studies have shown increased GFAP oxidative damage at pre-clinical stages of cases with PSP-like pathology (103).

OXIDATIVE DAMAGE AND LOSS OF FUNCTION

Enzymatic activity decline has been noted in AD with disease progression. Yet loss of activity may be due to reduced number of cells or specific cellular types, as well to cell redistribution, reduced amount of the enzyme or to modifications in the protein that led to protein dysfunction. All these scenarios are probably at work in advanced stages of neurodegenerative diseases. Among these possibilities, it is well known that oxidative damage of proteins has consequences in cell function (21).

Unfortunately, the majority of studies dealing with oxidized proteins in neurodegenerative diseases are not accompanied by functional studies. Perhaps historical events may account for this situation as pioneering works focused on the mere presence of increased oxidative stress and oxidative damage in aging and degenerative conditions. This was followed by the identification of DNA, RNA, lipids and proteins as targets of oxidative damage. Subsequent studies have been centered on the identification of particular proteins.

The enzymatic activities of certain oxidatively damaged proteins have been analyzed in parallel in a few studies. Increased oxidative damage accompanied by decreased activity has been shown for

CK BB, enolase 1, glutamine synthetase, Pin-1, CA II, UCHL-1, α -enolase, GAPDH, GDH, H⁺ transporting ATPase, LDH, ATP synthase and pyruvate kinase in AD (2, 19, 77, 100, 101, 114, 115, 119). However, decreased activity can be related to lower total levels of the protein; therefore, the value of reduction due to oxidation or to the total amount of the particular protein cannot be solved in those works.

Only a few studies have included the identification of the oxidatively damaged protein, the quantification of total protein levels and the reduction of enzymatic activity (2, 114, 115, 119).

No similar data are available in PD, but oxidative damage to LDH, enolase and CA II anhydrase is associated with the corresponding decreased enzymatic activities in transgenic mice overexpressing the human A30P α -synuclein mutation (95).

CLINICAL IMPLICATIONS

Reduced oxygen uptake and impaired glycolysis have been recognized by means of neuroimaging functional studies at relatively early stages of AD manifested as mild cognitive impairment, and in advanced stages of AD. Impaired energy metabolism in the cerebral cortex has also been reported in pre-clinical stages of individuals with familial AD (8, 10, 40, 51, 69–73, 93, 94). Unfortunately, no functional neuroimaging and neuropathologic studies have been performed in the same cases. As a result, the cause of impaired energy metabolism in these cases is not known.

However, preserved protein expression levels, together with decreased enzymatic function associated with oxidative damage of relevant energy metabolism enzymes and components of the respiratory chain, have been found in a few well-documented studies (2, 114, 115, 119). These examples are particularly illuminating as they demonstrate that reduced oxygen uptake and impaired energy metabolism may be a result of oxidative damage to selected proteins rather than a consequence of neuronal loss, at least at early stages of AD-related pathology.

In the same line, mitochondrial dysfunction and impaired energy metabolism in the cerebral cortex has been demonstrated by several convergent neurologic, neuroimaging and biochemical studies in PD (42). These observations reinforce a causal link between oxidative modifications of selected proteins and functional impairment of energy metabolism in PD.

Prognostic implications of these observations are obvious because oxidative damage is subject of therapeutic intervention as oxidatively damaged molecules can be substituted by new ones whereas neuronal loss is not.

CELLULAR LOCALIZATION OF OXIDATIVELY DAMAGED PROTEINS

Seminal immunohistochemical studies carried out several years ago showed that neurons and glial cells were putative sources of oxidative stress in the nervous system as they were labeled with antibodies that recognize oxidative adducts. Moreover, certain oxidative stress responses are particularly robust in astroglia.

In contrast with these observations, it is assumed that oxidatively damaged proteins, as detected by redox proteomics, are predominantly neuronal proteins. In fact there is little evidence that a particular damaged protein is neuronal or glial, unless the localization of the protein is known in advance. It is logical to interpret that

oxidatively damaged neurofilaments are localized in neurons, whereas oxidized glial fibrillary protein is localized in astrocytes. In some examples, HNE adducts co-localize with GFAP in astrocytes, as revealed by double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy, at the time that HNE-modified GFAP is identified by bidimensional gel electrophoresis, Western blotting, in-gel digestion and mass spectrometry (64).

It is clear that further studies are needed to elucidate the localization of damaged molecules in neurons and glial cells to understand the implications of the abnormalities in definite cellular types. This is not only valid considering neurons vs. glial cells, but also among different neuronal types. The fact that similar molecules are oxidatively damaged in variegated degenerative diseases does not prove that the same neurons are affected in the different conditions.

PITFALLS AND LIMITATIONS

With no doubt, redox proteomics is a useful tool for detecting damaged proteins resulting from oxidative/nitrosative damage. Yet available studies have also detected limitations and pitfalls.

First of all, information about post-mortem delay is important as certain proteins might be affected by oxidation/nitration with post-mortem delay. On the other hand, degradation of proteins with post-mortem delay may minimize the abundance of oxidized proteins due to non-specific post-mortem degradation. Several available studies take into consideration this aspect whereas this information is lacking in many others. A caveat derived from this observation is that identification of oxidized/nitrated proteins in human neurodegenerative diseases is feasible provided that tissue samples are examined within a time not surpassing thresholds of protein degradation and vulnerability to oxidative damage which are variable from one protein to another.

A second point is the overrepresentation of most abundant proteins whereas oxidative damage of minority proteins is probably underdetected. This may lead to an oversimplification of damaged metabolic pathways and, therefore, to the putative neglect of damaged crucial components.

A third point is the lack of information regarding cellular types involved, including particular neuronal types in different neurodegenerative disorders. We barely understand the reasons for selective cell vulnerability in general terms, and this shortage may also be applied to selective vulnerability of individual molecules in particular cell types.

Another source of possible confusion is based on the convergence of abnormalities in particular metabolic pathways that may obscure the real impact of oxidative damage in determined cellular functions. As an example, abnormal mitochondrial function in AD may be the result of several components, including increased mitochondrial DNA deletions, abnormal fusion and fission of mitochondria, and decreased expression of certain complexes of the respiratory chain, such as complex IV (45, 52, 68, 87, 125). Mitochondrial alterations result in increased oxidative stress. Oxidative damage to ATP synthase (complex V), VDAC, ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein I, H⁺ transporting ATPase and Atp5b (11, 13, 58, 84, 100, 105, 117, 119) may, in turn, increase mitochondrial dysfunction.

Similar considerations can be applied to the cerebral cortex in PD (42, 76).

REFINING METHODS TO IMPROVE REDOX PROTEOMICS

The large majority of studies in human brain and animal models have been carried out by analyzing total homogenates of a particular region. This is with no doubt an adequate approach although damage of minority proteins can be easily underrepresented. The study of cellular fractions may improve the resolution of the study by increasing the total amount of a particular protein. In this line, sarkosyl-insoluble fractions have been used to recover proteins in paired-helical filament-enriched fractions (104), mitochondria-enriched fractions to recover proteins principally related with mitochondria (30, 48), or synaptosomal-enriched fractions to reveal abnormalities of synapsis-related proteins (11).

Another important point is the use of different protocols and buffers to increase the capture of different proteins. The combination of different buffers to grind or to focus samples is a strategy to improve the reproducibility at the acidic or alkaline extremes of the electrophoresis gel and, likewise, to solubilize different proteins receiving a better number of spots and resolution (9). This observation, originally applied to general bidimensional gel electrophoresis methodology, may be of considerable interest in redox proteomics to optimize spots detected as oxidized proteins. We should also take into account that membrane proteins are difficult to detect by current bidimensional gel electrophoresis, thus probably accounting for the low numbers of membrane proteins identified as targets of oxidation.

Finally, detection of specific residues of oxidative modifications may increase understanding of specific oxidation sites and their relevance to protein function. However, this approach is time-consuming and a combination of different methods is needed. By using MALDI-TOF/MS and HPLC-ESI/MS/MS techniques, oxidation sites have been identified only in UCH-L1, SOD1 and DJ-1 in AD and PD as yet (27, 28).

CONCLUDING COMMENTS

Neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates are associated with modifications of solubility, aggregation and fibril formation of selected proteins. Mutant proteins resulting from DNA mutations are causative in familial and certain sporadic settings. More commonly, post-translational modifications of proteins are involved in the majority of sporadic cases. Understanding the mechanisms involved in such modifications is crucial from a mechanistic perspective, but it is also essential for the delineation of therapeutic strategies. Oxidative stress plays a functional role in physiologic conditions as it switches on vital cellular responses. Yet imbalance between oxidative stress sources and antioxidant responses may cause a net flux of oxidative damage to DNA, RNA, carbohydrates, lipids and proteins, and, in most cases, concomitant loss of function. Oxidative stress increases with age largely because of progressive mitochondrial dysfunction and impairment or loss of cellular repair mechanisms. In addition, neurodegenerative diseases are associated with higher levels of oxidative damage and higher levels of direct and indirect protein modifications resulting from increased oxidation, nitrosation and nitration when compared with those

occurring in age-matched individuals with no diseases of the nervous system.

Vulnerable proteins can be grouped in defined metabolic pathways covering glycolysis and energy metabolism, mitochondrial proteins, cytoskeleton, chaperones, and members of the ubiquitin–proteasome system, among many others. Some proteins are affected in different degenerative diseases whereas others appear to be disease-specific. Importantly, many damaged proteins in human neurodegenerative diseases are also damaged in experimental models, transgenic mice and worms, and cell culture paradigms. These findings indicate that oxidative stress observed in post-mortem brains is a primary event linked to degeneration rather than a secondary effect resulting from pre-mortem agonistic states.

Since oxidative damage may result in impaired function, protein oxidative damage may have important consequences on the nervous system thus resulting in abnormal glycolysis and energy metabolism, abnormal responses to protein folding and oxidative stress responses, cytoskeletal abnormalities, and impaired protein degradation, in addition to damage to relevant proteins as α -synuclein in PD and related α -synucleinopathies. Some of these abnormalities are reflected *in vivo* by using sophisticated metabolic and neuroimaging methods. Thus, abnormal energy metabolism has been observed in the cerebral cortex not only in AD but also in patients with mild cognitive impairment and in patients with PD in whom impaired metabolism cannot be ascribed to neuron loss. Therefore, it is reasonable to think that part of the metabolic disturbances observed at early stages of degenerative processes are related to oxidative damage of selected proteins rather than to neuron loss. However, much work has to be done as the majority of redox proteomics studies are not accompanied by functional analysis of oxidatively damaged proteins.

Available information points to the fact that vital metabolic pathways are hampered by protein oxidative damage in several human degenerative diseases at very early stages of the disease. A better understanding of proteins susceptible to oxidation and nitration may serve to define damaged metabolic networks at early stages of disease and to procure therapeutic interventions to attenuate disease progression.

ACKNOWLEDGMENTS

Work carried out at the Institute of Neuropathology was partially funded by grants from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III PI080582, and supported by the European Commission under the Sixth Framework Programme BrainNet Europe II, LSHM-CT-2004-503039 and INDABIP FP6-2005-LIFESCIHEALTH-7 Molecular Diagnostics. Work carried out at the Department of Experimental Medicine was supported in part by I+D grants from the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2006-14495/BFI and AGL2006-12433), the Spanish Ministry of Health (ISCIII, Red de Envejecimiento y Fragilidad, RD06/0013/0012, PI081843), the Autonomous Government of Catalonia (2005SGR00101), “La Caixa” Foundation and COST B-35 Action.

We thank Odena MA and Oliveira E from the Proteomics platform, Science Park, University of Barcelona, for support.

Thanks to T. Yohannan for editorial help. There is no conflict of interest including any financial, personal or other relationships

with other people or organizations within the three years from the beginning of the work.

REFERENCES

- Adams S, Green P, Claxton R, Simcox S, Williams MV, Walsh K, Leewenburgh C (2001) Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front Biosci* **6**:A17–A24.
- Aksenov M, Aksenova M, Butterfield DA, Markesbery WR (2000) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer’s disease brain. *J Neurochem* **74**:2520–2527.
- Aksenov MY, Atiksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer’s disease. *Neuroscience* **103**:373–383.
- Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B (1991) Oxygen free radicals and human diseases. *J R Soc Health* **111**:172–177.
- Barber SC, Mead RJ, Shaw PJ (2006) Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **1762**:1051–1067.
- Barja G (2007) Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Res* **10**:215–224.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* **3**:205–214.
- Bigl M, Brückner MK, Arendt T, Bigl V, Eschrich K (1999) Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer’s disease. *J Neural Transm* **106**:499–511.
- Bland AM, D’Eugenio LR, Dugan MA, Janech MG, Almeida JS, Zile MR, Arthur JM (2006) Comparison of variability associated with sample preparation in two-dimensional gel electrophoresis of cardiac tissue. *J Biomol Tech* **17**:195–199.
- Blass JP (2002) Alzheimer’s disease and Alzheimer’s dementia: distinct but overlapping entities. *Neurobiol Aging* **23**:1077–1084.
- Boyd-Kimball D, Castegna A, Sultana R, Poon HF, Petroze R, Lynn BC *et al* (2005) Proteomic identification of proteins oxidized by A β (1–42) in synaptosomes: implications for Alzheimer’s disease. *Brain Res* **1044**:206–215.
- Boyd-Kimball D, Sultana R, Poon HF, Lynn BC, Casamenti F, Pepeu G *et al* (2005) Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid β -peptide (1–42) into rat brain: implications for Alzheimer’s disease. *Neuroscience* **132**:313–324.
- Boyd-Kimball D, Poon HF, Lynn BC, Cai J, Pierce WM Jr, Klein JB *et al* (2006) Proteomic identification of proteins specifically oxidized in *Caenorhabditis elegans* expressing human A β (1–42): implications for Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* **27**:1239–1249.
- Butterfield DA, Kanski J (2001) Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech Ageing Dev* **122**:945–962.
- Butterfield DA, Stadtman ER (1997) Protein oxidation processes in aging brain. In: *Advances in Cell Aging and Gerontology*, Vol. 2. PS Timiras, EE Bittar (eds), pp. 161–191. JAI Press, Greenwich.
- Butterfield DA, Sultana R (2008) Redox proteomics: understanding oxidative stress in the progression of age-related neurodegenerative disorders. *Expert Rev Proteomics* **5**:157–160.
- Butterfield DA, Abdul HM, Newman S, Reed T (2006) Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. *NeuroRx* **3**:344–357.
- Butterfield DA, Gnjec A, Poon HF, Castegna A, Pierce WM, Klein JB, Martins RN (2006) Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer’s disease: an initial assessment. *J Alzheimers Dis* **10**:391–397.
- Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR (2006) Redox proteomics identification of

- oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **22**:223–232.
20. Butterfield DA, Sultana R, Poon HF (2006) Redox proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease. In: *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*. I Dalle-Donne, A Scaloni, DA Butterfield (eds), pp. 563–603. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
 21. Cabiscol E, Ros J (2006) Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. In: *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*. I Dalle-Donne, A Scaloni, DA Butterfield (eds), pp. 399–471. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
 22. Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM et al (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* **33**:562–571.
 23. Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R et al (2002) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, α -enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* **82**:1524–1532.
 24. Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA (2003) Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* **85**:1394–1401.
 25. Chinta SJ, Andersen JK (2008) Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Acta* **1780**:1362–1367.
 26. Choi J, Forster MJ, McDonald SR, Weintraub ST, Carroll CA, Gracy RW (2004) Proteomic identification of specific oxidized proteins in ApoE-knockout mice: relevance to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* **36**:1155–1162.
 27. Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, Li L (2004) Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* **279**:13256–13264.
 28. Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L (2005) Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem* **280**:11648–11655.
 29. Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE et al (2006) Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem* **281**:10816–10824.
 30. Chung KKK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L et al (2004) S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* **304**:1328–1331.
 31. Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA (1987) The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **22**:299–304.
 32. Dalfó E, Ferrer I (2008) Early α -synuclein lipoxidation in neocortex in Lewy body diseases. *Neurobiol Aging* **29**:408–417.
 33. Dalfó E, Portero-Otín M, Ayala V, Martínez A, Pamplona R, Ferrer I (2005) Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**:816–830.
 34. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G et al (2005) Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* **24**:55–99.
 35. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* **10**:389–406.
 36. Dalle-Donne I, Rossi R, Ceciliani F, Giustarini D, Colombo R, Milzani A (2006) Proteins as sensitive biomarkers of human conditions associated with oxidative stress. In: *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*. I Dalle-Donne, A Scaloni, DA Butterfield (eds), pp. 487–525. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
 37. Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA (eds) (2006) *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
 38. Daneshvar B, Frandsen H, Autrup H, Dragsted LO (1997) γ -Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: biomarkers of oxidative damage to proteins. *Biomarkers* **2**:117–123.
 39. Danielson SR, Andersen JK (2008) Oxidative and nitrate protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* **44**:1787–1794.
 40. De Leon MJ, Convit A, Wolf OT, Tarshish CY, DeSanti S, Rusinek H et al (2001) Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-[¹⁸F]fluorodeoxy-2-deoxy-D-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:10966–10971.
 41. Ding Q, Dimayuga E, Keler JN (2007) Oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **4**:73–79.
 42. Ferrer I (2009) Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects. *Progr Neurobiol* **88**:89–103.
 43. Ferrer I, Martínez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M (2008) Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank* **9**:181–194.
 44. Gibson GE, Huang HM (2005) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **26**:575–578.
 45. Gibson GE, Karuppagounder SS, Shi Q (2008) Oxidant-induced changes in mitochondria and calcium dynamics in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* **1147**:221–232.
 46. Gibson GE, Ratan RR, Beal MF (2008) Mitochondria and oxidative stress in neurodegenerative disorders. Preface. *Ann NY Acad Sci* **1147**:xi–xii.
 47. Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B (2007) The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med* **53**:207–213.
 48. Gómez A, Ferrer I (2009) Increased oxidation of certain glycolysis and energy metabolism enzymes in the frontal cortex in Lewy body diseases. *J Neurosci Res* **87**:1002–1013.
 49. Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **91**:14S–22S.
 50. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press: New York.
 51. Herholz K, Carter SF, Jones M (2007) Positron emission tomography imaging in dementia. *Br J Radiol* **80**(Spec. No. 2):S160–S167.
 52. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS et al (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**:3017–3023.
 53. Ilieva EV, Ayala V, Jové M, Dalfó E, Cacabelos D, Povedano M et al (2007) Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **130**:3111–3123.
 54. Ilieva EV, Naudí A, Kichev A, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M (2009) Loss of the Stress Transducers *Nrf2* and *Grp78/BiP* in *Pick's Disease*. (In press).
 55. Ischiropoulos H, Al-Medi AB (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett* **364**:279–282.

56. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* **26**:5256–5264.
57. Korolainen MA, Auriola S, Nyman TA, Alafuzoff I, Pirttilä T (2005) Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol Dis* **20**:858–870.
58. Korolainen MA, Goldsteins G, Nyman TA, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttilä T (2006) Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* **27**:42–53.
59. LaVoie MJ, Cortese GP, Ostaszewski BL, Schlossmacher MG (2007) The effects of oxidative stress on parkin and other E3 ligases. *J Neurochem* **103**:2354–2368.
60. Levine RL, Stadtman ER (2001) Oxidative modifications of proteins during aging. *Exp Gerontol* **36**:1495–1502.
61. Lowell MA, Markesbery WB (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucl Acid Res* **35**:7497–7504.
62. Mancuso C, Scapagini G, Currò D, Giuffrida Stella AM, De Marco C, Butterfield DA, Calabrese V (2007) Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* **12**:1107–1123.
63. Markesbery WR, Lowell MA (2007) Damage to lipids, proteins, DNA and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* **64**:954–956.
64. Martínez A, Carmona M, Portero-Otín M, Naudi A, Pamplona R, Ferrer I (2008) Type-dependent oxidative damage in frontotemporal lobar degeneration: cortical astrocytes are targets of oxidative damage. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**:1122–1136.
65. Martínez A, Dalfó E, Muntanó G, Ferrer I (2008) Glycolytic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal cortex and oxidative damage of these proteins is increased in progressive supranuclear palsy. *J Neural Transm* **115**:59–66.
66. Mikkelsen RB, Wardman P (2003) Biological, chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* **22**:5734–5754.
67. Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Nunomura A, Castellani RJ, Perry G (2005) Oxidative stress and neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci* **1043**:545–552.
68. Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR (2007) Alzheimer's disease: a lesson from mitochondrial dysfunction. *Antioxid Redox Signal* **9**:1621–1630.
69. Mosconi L (2005) Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med* **32**:486–510.
70. Mosconi L, De Santi S, Li J, Tsui WH, Li Y, Boppana M *et al* (2006) Hippocampal metabolism predicts cognitive decline from normal aging. *Neurobiol Aging* **29**:676–692.
71. Mosconi L, Sorbi S, De Leon MJ, Li Y, Nacmias B, Myoung PS *et al* (2006) Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. *J Nucl Med* **47**:1778–1786.
72. Mosconi L, Pupi A, De Leon MJ (2008) Brain glucose metabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* **1147**:180–195.
73. Mosconi L, Tsui WH, Herholz K, Pupi A, Drzezga A, Lucignani G *et al* (2008) Multicenter standardized 18F-FDG PET diagnosis of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and other dementias. *J Nucl Med* **49**:390–398.
74. Muntanó G, Dalfó E, Martínez A, Rey MJ, Avila J, Pérez M *et al* (2006) Glial fibrillary acidic protein is a major target of glycoxidative and lipoxidative damage in Pick's disease. *J Neurochem* **99**:177–185.
75. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, Sakumi K (2007) Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* **85**:919–934.
76. Navarro A, Boveris A, Bández MJ, Sanchez-Pinto MJ, Gómez C, Muntane G, Ferrer I (2009) Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptative response in Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Free Radic Biol Med* **46**:1574–1580.
77. Newman SF, Sultana R, Perluigi M, Coccia R, Cai J, Pierce WM *et al* (2007) An increase in S-glutathionylated proteins in the Alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach. *J Neurosci Res* **85**:1506–1514.
78. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK *et al* (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**:759–767.
79. Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**:631–641.
80. Nunomura A, Moreira PI, Takeda A, Smith MA, Perry G (2007) Oxidative RNA damage and neurodegeneration. *Curr Med Chem* **14**:2968–2975.
81. Onyango IG, Khan SM (2006) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and stress signalling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **3**:339–349.
82. Pamplona R (2008) Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* **1777**:1249–1262.
83. Pamplona R, Barja G (2007) Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev* **6**:189–210.
84. Pamplona R, Dalfó E, Ayala V, Bellmunt MJ, Prat J, Ferrer I, Portero-Otín M (2005) Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycoxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem* **280**:21522–21530.
85. Pamplona R, Ilieva E, Ayala V, Bellmunt MJ, Cacabelos D, Dalfó E *et al* (2008) Maillard reaction versus other nonenzymatic modifications in neurodegenerative processes. *Ann NY Acad Sci* **1126**:315–319.
86. Pedersen WA, Fu W, Keller JN, Markesbery WR, Appel S, Smith RG *et al* (1998) Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol* **44**:819–824.
87. Perez-Gracia E, Torrejon-Escribano B, Ferrer I (2008) Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome C oxidase. *Acta Neuropathol* **116**:261–268.
88. Perluigi M, Fai Poon H, Hensley K, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V *et al* (2005) Proteomic analysis of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice—a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* **38**:960–968.
89. Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V *et al* (2005) Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics* **4**:1849–1861.
90. Petersen RB, Nunomura A, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Smith MA, Zhu X (2007) Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **11**:143–152.
91. Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D *et al* (2008) Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **8**:1744–1749.
92. Pierce A, Mirzaei H, Muller F, De Waal E, Taylor AB, Leonard S *et al* (2008) GAPDH is conformationally and functionally altered in association with oxidative stress in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Biol* **382**:1195–1210.

93. Piert M, Koeppel RA, Giordani B, Berent S, Kuhl DE (1996) Diminished glucose transport and phosphorylation in Alzheimer's disease determined by dynamic FDG-PET. *J Nucl Med* **37**:201–208.
94. Pietrini P, Furey ML, Guazzelli M, Alexander GE (2001) Functional brain studies of the neurometabolic bases of cognitive and behavioral changes in Alzheimer's disease. In: *Functional Neurobiology of Aging*. PR Hof, CV Mobbs (eds), pp. 227–241. Academic Press: New York.
95. Poon HF, Frasier M, Shreve N, Calabrese V, Wolozin B, Butterfield DA (2005) Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice—a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **18**:492–498.
96. Poon HF, Hensley K, Thongboonkerd V, Merchant ML, Lynn BC, Pierce WM et al (2005) Redox proteomics analysis of oxidatively modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice—a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* **39**:453–462.
97. Portero-Otin M, Pamplona R (2006) Is endogenous oxidative protein damage involved in the aging process? In: *Protein Oxidation and Disease*. J Pietzsch (ed.), pp. 91–142. Research Signpost, Kerala, India.
98. Practico D (2008) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci* **29**:609–615.
99. Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* **268**:L699–L722.
100. Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM et al (2008) Proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **30**:107–120.
101. Reed TT, Pierce WM Jr, Turner DM, Markesbery WR, Butterfield DA (2008) Proteomic identification of nitrated brain proteins in early Alzheimer's disease inferior parietal lobule. *J Cell Mol Med* DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00478.
102. Requena J, Chao CC, Stadtman ER (2001) Glutamic acid and aminodipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:624–632.
103. Santpere G, Ferrer I (2008) Delineation of progressive supranuclear palsy-like pathology. Astrocytes in striatum are primary targets of tau phosphorylation and GFAP oxidation. *Brain Pathol* **19**:177–187.
104. Santpere G, Puig B, Ferrer I (2007) Oxidative damage of 14-3-3 zeta and gamma isoforms in Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Neuroscience* **146**:1640–1651.
105. Shin SJ, Lee SE, Boo JH, Kim M, Yoon YD, Kim SI, Mook-Jung I (2004) Profiling proteins related to amyloid deposited brain of Tg2576 mice. *Proteomics* **4**:3359–3368.
106. Smith MA, Rudnicka-Nawrot M, Richey P, Praprotnik D, Mulvihill P, Miller CA et al (1995) Carbonyl-related post-translational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **64**:2660–2666.
107. Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E (2008) Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* **45**:667–678.
108. Stadtman ER (1998) Free radical-mediated oxidation of proteins. In: *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance*. NATO ASI Series, Series A: Life Sciences, Vol. 296. T Ozben (ed.), pp. 51–143. Plenum Press: New York.
109. Stadtman ER (2002) Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* **33**:597–604.
110. Stadtman ER, Berlett BS (1997) Free radical-mediated modification of proteins. In: *Free Radical Toxicity*. KB Wallace (ed.), pp. 71–87. Taylor and Francis: Washington, DC.
111. Stadtman ER, Levine RL (2006) Chemical modification of proteins by reactive oxygen species. In: *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*. I Dalla-Donne, A Scaloni, DA Butterfield (eds), pp. 3–23. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
112. Starkov AA (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann NY Acad Sci* **1147**:37–52.
113. Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G et al (2008) Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **5**:525–532.
114. Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB et al (2006) Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: a redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging* **27**:918–925.
115. Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB et al (2006) Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging* **27**:1564–1576.
116. Sultana R, Newman SF, Abdul HM, Cai J, Pierce WM, Klein JB et al (2006) Protective effect of D609 against amyloid-beta1-42-induced oxidative modification of neuronal proteins: redox proteomics study. *J Neurosci Res* **84**:409–417.
117. Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB et al (2006) Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* **22**:76–87.
118. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA (2009) Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis. *Acta Neuropathol* **118**:131–150.
119. Terni B, Boada J, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I (2009) Mitochondrial ATP-synthase in the entorhinal cortex is a target of oxidative stress at stages I/II of Alzheimer's disease pathology. *Brain Pathol* DOI: 10.1111/j.1750-3639.2009.00266.x.
120. Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L1005–L1028.
121. Thomas DD, Ridnour L, Donzelli S, Espey MG, Mancardi D, Isenberg JS et al (2006) The chemistry of protein modifications elicited by nitric oxide and related nitrogen oxides. In: *Redox Proteomics: From Protein Modifications to Cellular Dysfunction and Diseases*. I Dalle-Donne, A Scaloni, DA Butterfield (eds), pp. 25–58. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.
122. Thorpe SR, Baynes JW (2003) Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* **25**:275–281.
123. Wataya T, Nunomura A, Smith MA, Siedlak SL, Harris PLR, Shimohama S et al (2002) High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of aduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *J Biol Chem* **277**:4644–4648.
124. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV (1991) Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* **10**:339–352.
125. Wong-Riley M, Antuono P, Ho KV, Egan R, Hevner R, Liebl WW et al (1997) Cytochrome oxidase in Alzheimer's disease: biochemical, histochemical, and immunohistochemical analysis of the visual and other systems. *Vision Res* **37**:3593–3608.
126. Yao D, Gu Z, Nakamura T, Shi ZQ, Ma Y, Gaston B et al (2004) Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:10810–10814.

127. Zhou C, Huang Y, Przedborski S (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann NY Acad Sci* **1147**:93–104.
128. Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G (2004) Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res* **1000**:32–39.
129. Zhu X, Lee HG, Casadesus G, Avila J, Drew K, Perry G, Smith MA (2005) Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **31**:205–217.
130. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G (2007) Causes of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* **64**:2202–2210.

Table S1. Alzheimer disease.

Table S2. Tauopathies.

Table S3. Parkinson disease and related α -synucleinopathies.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Alzheimer disease

Reference	Disease/stage	Region	Fraction	Buffer	Gel staining	MS	Type of analysis
Aksenov et al, 2000	AD	SMT	TH	homogenated in 10mM HEPES buffer dissolved in 8.7M urea, 1.0% DTT, 2.0% pharmalyte 3–10, 0.5% Triton X-100, bromophenol blue	Coomassie blue	NA	Imaging Research
Aksenov et al, 2001	AD	SMT	TH	homogenated in HEPES	Coomassie blue	NA	NA
Castegna et al, 2002a	AD	IPL	TH	homogenated in HEPES dissolved in 8.7M urea, 1.0% DTT, 2.0% pharmalyte 3–10, 0.5% Triton X-100, bromophenol blue	Coomassie blue	MALDI-TOF	HT Analyzer 2D PAGE software
Castegna et al, 2002b	AD	IPL	TH	homogenated in HEPES dissolved in 8.7M urea, 1.0% DTT, 2.0% pharmalyte 3–10, 0.5% Triton X-100, bromophenol blue	Coomassie blue	MALDI-TOF	HT Analyzer 2D-PAGE software
Castegna et al, 2003	AD	IPL	TH	homogenated in HEPES dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 20mM DTT, 0.2% biolytes 3–10, 2% CHAPS, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	HT Analyzer 2D-PAGE software
Choi et al, 2004b	AD	FC	TH	homogenated in 50 mM Tris-HCl	Sypro Ruby	MALDI-TOF/MS HPLC-ESI/MS/MS	program PD Quest
Choi et al, 2005	AD	FC	TH	homogenated in 50mM Tris-HCl	Sypro Ruby	MALDI-TOF-(ESI) tandem MS/MS	PD Quest
Pamplona et al, 2005	AD Stages V-VI/C	FC	TH	homogenated in 9 M urea, 4% CHAPS, 0.8% 3–11 IPG NL, 1% DTT dissolved in 8M urea, 0.5% CHAPS, 0.5% 3–11 IPG NL buffer, 15mM DTT, 2% bromophenol blue	Silver stain	MALDI-reTOF MS	PDQuest Analysis software

Table S11. Tauopathies

Reference	Disease/stage	Region	Fraction	Buffer	Gel staining	MS	Type of analysis
Muntané et al, 2006	PiD	FC OC	TH	homogenated in 40 mM Tris pH 7.5 containing 7 M urea, 2 M thiourea dissolved in 0.2% byolites, 4% CHAPS, 2 mM TBP, 8M urea, bromophenol blue	Silver stain	MALDI-TOF	NA
Ilieva et al, 2009	PiD	FC OC	TH	according to Pamplona et al, 2005	Silver stain	MALDI-TOF	NA
Martínez et al, 2008b	PSP	FC	TH	homogenated in 10mM Tris-HCl pH 7.4, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% NP-40	Silver stain	MALDI-TOF	NA
Santpere, Ferrer, 2008	AGD PSP, early-PSP	Amg Str	PHF TH	homogenated in 40mM Tris, pH 7.5, 7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS	Coomassie	CapLC + Q-TOF	NA
Martínez A. et al, 2008a	FTLD-tau FTLD-J FTLD-MND	FC	TH	homogenated in 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 4% CHAPS	Coomassie	CapLC + Q-TOF	NA

Korolainen et al., 2005	AD	FC	TH	homogenated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA dissolved in 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% 4-7 buffer, 20 mM DTT, blue bromophenol	Sypro Ruby	LCQ quadrupole ion trap mass spectrometer	NA
Korolainen et al, 2006	AD Braak stages V-VI	FC	TH	homogenated in 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA dissolved in 7M urea, 2M thiourea, 4%CHAPS, 0.5% 3.10 NL buffer, 2mM DTT, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	ImageMaster 2D Elite
Butterfield et al, 2006c	AD MCI Braak stages III, V, VI	HC	TH	homogenated in HEPES buffer	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PDQuest software
Butterfield et al, 2006b	Familial AD with mutations in PS1	FC	TH	homogenated in HEPES buffer dissolved in 8M urea, 20mM DTT, 2.0% CHAPS, 0.2% biolytes, 2M thiourea, bromophenol blue	Coomassie blue	MALDI-TOF	HT analyzer
Sultana et al, 2006b	AD Hippocampus	HC Cebl	TH	homogenated in HEPES dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2%CHAPS, 0.2% biolytes, 50mM DTT, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PD Quest software
Sultana et al, 2006a	AD	HC	TH	homogenated in 10mM HEPES buffer dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% biolytes, 50mM DTT, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PDQuest software
Sultana et al, 2006d	AD	HC	TH	homogenated in 10 mM HEPES buffer dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% biolytes, 50mM DTT, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PD Quest software
Choi et al, 2006	AD	FC	TH	Homogenated in 50 mM Tris-HCl	Sypro Ruby	MALDI/TOF MALDI/TOF/TOF	PD Quest

Newman et al, 2007	AD	IPL	TH	homogenated in HEPES dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% biolytes, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PDQuest software
Santpere et al, 2007	AD Braak stage V CAA	FC	TH PHF	<u>TH</u> : homogenated in 40mM Tris, pH 7.5, 7M urea, 2M thiourea, dissolved in 0.2% biolytes, 4% CHAPS, 2mM TBP, 8M urea, bromophenol blue <u>PHE</u> : homogenated in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.8M NaCl, 1 mM EGTA, 10% sucrose, mixed with 0.1% N-lauroyl- sarcosinate dissolved in 40mM Tris, pH 7.5, 9M urea, 2M thiourea, 0.2% biolytes, 4% CHAPS, 2mM TBP, bromophenol blue	Coomassie	Q-TOF	NA
Reed et al, 2008b	AD Braak stage V	IPL	TH	homogenated in HEPES buffer dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% biolytes, 50mM DTT, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI TOF	PDQuest
Reed et al, 2008a	AD MCI Braak stages III, IV, V, VI	HC IPL	TH	homogenated in HEPES dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 20mM DTT, 2.0% CHAPS, 0.2 % biolytes, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PDQuest 2D
Terni et al., 2009	AD Braak stages I/II	EC	enriched in mitochondria	homogenated in 8M Urea, 2M thiourea, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 4% CHAPS, 1mM PMSF dissolved in 2% biolytes 3/10 ampholytes, 4mM TBP, bromophenol blue	Coomassie blue	MALDI-TOF/TOF	NA
Choi et al, 2004a	ApoE-deficient mice	HC Cx	TH	NA	Sypro Ruby	MALDI-TOF/MS	2-DE gel analysis program Melanie

Shin et al, 2004	Tg2576 mice bearing the APP Swedish mutation	FC	TH	dissolved in 2% CHAPS, 7M urea, 2M thiourea, 40 mM Tris-base, 20mM DTT, 0.5 % IPG buffer, bromophenol blue	Coomassie blue	MALDI/TOF	PDQuest software
Boyd-Kimball et al, 2005b	Intracerebral injection of A β (1-42) to 3-month-old Wistar rats	NBM Cx HC	TH	homogenated by sonication in 10mM HEPES pH 7.4, 137 mM NaCl, 4.6mM KCl, 1.1mM KH ₂ PO ₄ , 0.6mM MgSO ₄ dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% biolytes, 50mM DTT, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PDQuest software
Boyd-Kimball et al, 2005a	Intracerebral injection of A β (1-42) to <i>Morgolian gerbils</i> . Study of synaptosomal fractions	NA	isolated synaptosomes	dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% biolytes, 50mM DTT	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PDQuest software
Boyd-Kimball et al, 2006	<i>C.elegans</i>	NA	-	homogenated in 10mM HEPES pH 7.4, 137mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.1mM KH ₂ PO ₄ , 0.6mM MgSO ₄ dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2% biolytes, 50mM DTT, bromophenol blue	Coomassie Blue	MALDI-TOF	PDQuest software
Sultana et al, 2006c	Primary neuronal cultures treated with A β (1-42)	NA	-	homogenated in 10 mM HEPES buffer pH 7.4 containing 137mM NaCl, 4.6mM KCl, 1.1 mM KH ₂ PO ₄ , 0.6Mm MgSO ₄ dissolved in 8M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.2 % biolytes, 50mM DTT, bromophenol blue	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PDQuest software

Table SIII. Synucleopathies

Reference	Disease/stage	Region	Fraction	Buffer	Gel staining	MS	Type of analysis
Choi et al., 2004a	PD	FC	TH	homogenated in 50 mM Tris-HCl	SYPRO Ruby	MALDI-TOF/MS HPLC-ESI/MS/MS analyses	program PD Quest
Chung et al., 2004	PD	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Yao et al., 2004	PD	TC	TH	homogenated in 250 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine 0.4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate or 1% Triton X-100	NA	NA	NA
Choi et al., 2005	PD	FC	TH	homogenated in 50 mM Tris-HCl	SYPRO Ruby	MALDI-TOF-(ESI) tandem MS/MS	PD Quest
Dalfó et al., 2005	iPD	FC	TH	homogenated in 40 mM Tris pH 7.4 containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1 mM EDTA dissolved in 0.2% byolites, 2 mM TBP, bromophenol blue	Silver staining	MALDI-TOF/TOF or ESI-MS-MS	Investigator HT analyzer
Choi et al., 2006	PD	FC	TH	according to Choi et al., 2004a	SYPRO Ruby	MALDI/TOF MALDI/TOF/TOF	PDQuest
Keeney et al., 2006	PD	FC	Mitochondrial enrichment	homogenated in 0.15 M KCl, 20 mM K phosphate, 1 mM EDTA, pH 7.6 dissolved in RIPA	SYPRO Ruby	LC-MS mass spectrometry	NA
Dalfó and Ferrer, 2008	iPD, PD, DLB	FC SN	TH	homogenated in PBS, 1 mM EDTA	NA	NA	NA
Gómez, Ferrer, 2009	iPD, PD, DLB	FC	Mitochondrial enrichment	homogenated in 20 mM HEPES-KOH, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT dissolved in 40 mM Tris pH 7.5 containing 7 M urea, 2 M thiourea, 0.2% byolites, 4% CHAPS, 2 mM TBP, 0.1% bromophenol blue	Silver staining	Q-TOF	NA
Poon et al., 2005a	A30P α -synuclein transgenic mice	LH	TH	homogenated in TBS, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM sodium pyrophosphate, 30 mM glycerol 2-phosphate, 30 mM sodium fluoride, 1 mM EDTA	Sypro Ruby	MALDI-TOF	PD Quest

VI. DISCUSSIÓ

1. Sensibilitat del RNA i de les proteïnes del teixit cerebral humà als factors post mortem

L'estudi de les malalties neurològiques té un alt grau de complexitat per la dificultat de desenvolupar un model animal que reproduïxi la patologia o els símptomes i els marcadors histopatològics que es troben en els humans. La utilització de material post mortem dels bancs de teixit és una molt bona opció per tal de realitzar els experiments directament en el teixit en el que s'ha donat el desordre. Ara bé, la utilització d'aquesta mostra presenta una sèrie de variables que s'han de tenir en compte. El tipus i el temps de fixació de la mostra, la inclusió en parafina, la congelació, el temps de retardament post mortem (RPM) i la temperatura, són una sèrie d'elements post mortem que necessiten ser caracteritzats per saber fins a quin punt poden o no modificar les diferents molècules. D'aquests factors, el temps de RPM i la temperatura són les variables més fàcils de poder controlar necessitant, per tant, estudis per determinar la seva importància pel que fa a la preservació i a la degradació del DNA, del RNA i de les proteïnes.

En estudis multicèntrics de l'*European Brain Bank Network* es va veure que el DNA era relativament resistent a la degradació post mortem i que resultava ser útil per fer estudis genètics, encara que les mostres estiguessin guardades a -80°C durant diversos anys. En solucions líquides, però, el DNA resultava vulnerable recomanant que la mostra es fixi durant un temps curt (un mes) en formol al 4% per preservar-la. Pel que fa a al protocol d'extracció de DNA el mètode de QIAmp Micro Qiagen va ser el sistema que donava resultats més reproduïbles (Ferrer i col. 2007). El 2005 es va publicar que les modificacions epigenètiques com la metilació de les cues d'histones i l'estabilitat dels nucleosomes es mantenen estables en el teixit després de la mort del pacient, sense veure's afectades pel RPM (Stadler i col. 2005). Barrachina i col. 2009 també van demostrar que la metilació de les illes CpG dels gens promotors es troben conservades amb el RPM.

A nivell del RNA es troben resultats antagònics: diferents estudis han suggerit que és estable en mostres humanes de cervell post mortem (Cummings i col. 2001, Yasojima i col. 2001) i, per altra banda, altres treballs han demostrat que la integritat del RNA és en gran part depenent de diferents factors tant pre mortem com poden ser l'estat agònic, coma, l'hospitalització, la hipòxia,...com post mortem tals com el temps de RPM, la temperatura,... (Durrenberger i col. 2010, Harrison i col. 1995, Preece i col. 2003). Tenint en compte aquests últims resultats és important determinar que per millorar la preservació del RNA es recomana fer una ràpida immersió de la mostra en Trizol després d'extreure-la i que l'anàlisi de la seva qualitat es faci utilitzant el

VI.DISCUSSIÓ

Bioanalyzer que resulta ser una eina molt més eficaç i sensible que no pas els gels d'agarosa. En aquest context de possibles alteracions del RNA, es van plantejar dos estudis per fer en el nostre treball: el primer es va centrar en determinar les modificacions del RNA segons el temps de RPM i la temperatura per guardar el teixit. Es van utilitzar *microarrays* de RNA de mostres humanes de cervell congelades a les 2h després de la mort del pacient, guardades a 4°C o bé a temperatura ambient durant diferents hores i més tard congelades a -80°C. Hi havia una disminució de l'expressió de diferents RNAs depenent del temps de RPM i de la temperatura d'emmagatzematge de la mostra i l'expressió de petits RNAs augmentava quan també ho feia el temps de RPM. Aquests resultats indiquen una vulnerabilitat del RNA pel RPM corroborada també pel grup de Buesa i col. 2004 on van fer estudis de RPM en mostres humanes finalment congelades en nitrogen líquid.

L'objectiu del segon estudi va ser el d'identificar canvis en la qualitat del RNA en diferents regions del cervell d'un mateix pacient. Es van utilitzar els valors del RIN (*RNA Integrity Number*) a través del Bioanalyzer com a indicador de la preservació del RNA. El valor del RIN va mostrar que no era depenent del temps de RPM i que aquest valor variava entre les diferents zones. Aquesta diferència individual no se sap a què pot ser deguda. Una explicació podria ser que les estructures internes del cervell triguen més a refredar-se a 4°C i que, per altra banda, l'escorça cerebral es refreda més ràpidament gràcies a la seva localització superficial podent mantenir més preservat el RNA.

Pel que a les proteïnes, s'han realitzat estudis en models animals (rata, ratolí) per veure com afecta el RPM en el teixit on es va demostrar una sensibilitat de les proteïnes a la degradació, comportant-se diferent unes que d'altres (Fountoulakis i col. 2001, Hilbig i col. 2004). En el cas del cervell humà post mortem s'ha pogut concloure que la temperatura en la que s'han guardat les mostres afecta a la preservació de les proteïnes. En un treball de la degradació proteïca, emmarcat dins del *BrainNet Europe*, Ferrer i col. 2007a van utilitzar mostres humanes de cervell per realitzar un estudi del temps de RPM i de la temperatura (congelació directa a -80°C, a temperatura ambient, a 4°C, a 1°C en diferents temps i finalment congelació a -80°C). Es va determinar que a 1°C les mostres eren més estables i que hi havia una diferència de vulnerabilitat en les proteïnes sent unes més resistents que altres a la degradació. Altre cop va quedar patent la importància d'aquests dos factors pel que fa a la preservació de les proteïnes on s'observava una disminució de l'expressió de determinades proteïnes però també un augment del nivell d'altres (Crecelius i col. 2008). El fet que hi hagi una disminució de l'expressió de certes proteïnes és esperable en estudis de degradació proteïca, ara

bé un augment del seu nivell és més difícil d'explicar: una disminució del recanvi de la proteïna o de l'eliminació normal d'aquestes proteïnes, un augment de la seva síntesi donada per la situació cel·lular en que es troba, la formació de proteïnes truncades,...podrien ser possibles explicacions d'aquest increment.

Les modificacions post translacionals de les proteïnes també poden estar subjectes a possibles alteracions degudes al RPM i a la temperatura. Aquestes són importants en les malalties neurodegeneratives ja que les proteïnes que formen les inclusions presenten aquest tipus d'alteracions. En el cas de les taupaties, per exemple, la proteïna tau es desfosforila ràpidament en condicions normals però la tau hiperfosforilada és més resistent a la degradació. En la MA el triplet de 60, 64 i 68 kDa, i les bandes de baix pes molecular, presenten una bona preservació durant les primeres 24h i una disminució de la seva intensitat cap a les 48h a 4°C (Santpere i col. 2006). En aquest context, ens vam proposar de valorar les modificacions d'oxidació i de nitració que podien patir les proteïnes exposant les mostres d'escorça frontal, diagnosticades per la MA, a 2h, 5h, 8h i 20h a temperatura ambient per ser després congelades a -80°C. Els marcadors utilitzats de lipoxidació (MDA-L, CML), de glicoxidació (CEL, CML, AGE) i de nitració (N-Tyr) reconeixien una sèrie de bandes on cadascun d'ells tenia un patró propi. En general, però, s'observava que durant les primeres 8h la densitat i la distribució de les bandes es mantenia bastant uniforme i que a partir de les 20h hi havia variacions en el marcatge. Com en el cas de la degradació proteïca, en algun marcador es podia veure la disminució de la intensitat de les bandes (CEL, CML), en d'altres un augment (MDA-L, CEL) i també l'aparició de noves (MDA-L, N-Tyr) podent ser les proteïnes possibles dianes d'oxidació durant el RPM. En un treball publicat al 2009 van fer estudis en mostres de cervells humans (controls que no presentaven desordres neurològics) per valorar també l'efecte del temps de RPM (4-18h) en la nitració proteïca (Chandana i col. 2009): van utilitzar *slot blot* amb l'anticòs de la 3-nitrotirosina com a marcador de nitració proteïca. Es va trobar un increment significatiu en els nivells de nitració en la substància negra, un augment més suau en el cerebel però sense canvis en l'escorça frontal. Pel que fa a l'anàlisi dels grups carbolins de les proteïnes, el temps de RPM va influir només en la substància negra amb valors més elevats. Aquests dades concorden, en part, amb els nostres resultats de les mostres d'escorça frontal: el rang de temps de RPM que van utilitzar per l'estudi va de les 4 a les 18h, sense observar canvis durant aquest temps, i en el nostre cas va ser de les 2 a les 20h començant a trobar alteracions importants a partir de les 20h. Ara bé, per poder estar segurs d'aquests resultats es necessitarien fer altres estudis on les hores de RPM fossin més contínues doncs en el nostre experiment va haver-hi un salt de les 8h a les 20h.

VI.DISCUSSIÓ

El fet que trobessin modificacions en la substància negra podria suportar la idea que les regions profundes del cervell poden tenir més tendència a patir modificacions oxidatives i alteracions enzimàtiques per la diferència de refrigeració, podent alterar la integritat d'algunes proteïnes.

Així doncs és important caracteritzar els diferents factors post mortem per saber com poden modificar a les diferents molècules (DNA, RNA, proteïnes) i buscar les vies per minimitzar aquestes variacions. Aquests estudis prenen especial rellevància si es consideren una via per estandaritzar protocols entre els diferents hospitals i bancs de teixit, ajudant a l'homogeneïtat de les mostres entre diversos centres i permetent una millor reproductibilitat de resultats entre grups.

2. Efecte de l'estrès oxidatiu en les proteïnes a la malaltia de PSP

Havent caracteritzat el patró de certs marcadors d'oxidació en funció del RPM a temperatura ambient, es va passar a estudiar l'efecte d'aquests en les proteïnes de determinades malalties neurodegeneratives. Per a dur a terme el nostre objectiu es va fer ús d'eines proteòmiques per tal de poder seleccionar i identificar quina era la proteïna diana de l'oxidació.

La primera patologia que es va estudiar va ser la PSP, del grup de les taupaties, on es va realitzar un estudi dels diferents marcadors d'oxidació en mostres d'escorça frontal de patològics i dels respectius controls. Es van trobar diferències significatives amb el marcatge de lipoxidació, anticòs anti-HNE, en les mostres patològiques. Odetti i col. 2000 van descriure un augment d'aquest marcador en la zona del mesencèfal de teixit de PSP. D'altres estudis també havien observat un augment de lesió lipoxidativa en mostres de pacients al nucli subtalàmic (Albers i col. 1999) i a l'escorça frontal superior (Albers i col. 2000), utilitzant ambdós estudis tècniques d'HPLC i el MDA com a marcador de dany lipoxidatiu. El fet que en els nostres resultats no s'hagués observat un augment de MDA en les mostres patològiques pot ser degut a la separació de les diferents regions de l'escorça frontal, en el nostre estudi no es va fer i potser es van emascarar resultats o bé per possibles diferències individuals.

En el nostre cas es va prosseguir l'estudi passant a localitzar i determinar les proteïnes modificades per l'HNE. Es van identificar dos enzims implicats en la ruta metabòlica de la glicòlisi: la fructosa 1,6-difosfat aldolasa A (aldolasa A) i la fosfoglicerat cinasa-1 (FGC-1).

No hi ha estudis previs de proteïnes que representin possibles dianes afectades pels radicals lliures i que estiguin implicades en el metabolisme glicolític a PSP. Ara bé Albers i col. 2000 van observar una disminució en l'activitat de l' α -cetoglutarat deshidrogenasa demostrant una alteració mitocondrial en mostres d'escorça frontal quedant patent una disfuncionalitat del metabolisme energètic. Pel que fa a estudis *in vitro* de cèl·lules cíbrides, introducció de mitocondris de teixit de pacients de PSP en línies cel·lulars que no tenen DNA mitocondrial, es va descriure una reducció de l'activitat del complex I i del III del mitocondri (Chirichigno i col. 2002).

L'aldolasa A catalitza la conversió reversible de la fructosa 1,6-difosfat a gliceraldehid 3-fosfat i a dihidroxiacetona fosfat. Se n'han descrit tres d'isoformes: la isoforma A es produeix durant el desenvolupament embrionari i està molt expressada en el múscul de l'adult (podent representar el 5% de la proteïna cel·lular total), la B es troba majoritàriament en el fetge, en els ronyons i l'intestí. Pel que fa al cervell i al sistema nerviós l'aldolasa A i la C estan expressades per igual. En mostres de pacients amb MA es van mesurar els grups carbonils. Es van trobar diferències en determinades proteïnes: en el cas de l'aldolasa A, i de la isoforma C, es van observar canvis en el contingut de carbonils però no arribaven a presentar diferències estadísticament significatives degut als canvis en la quantitat de proteïna (Korolainen i col. 2006). Després d'haver publicat el nostre treball, Reed i col. 2008b van trobar l'aldolasa A modificada per nitració en el lòbul parietal inferior de cervells afectats per la MA. Pel que fa a la FGC-1, és un dels enzims més importants de la via glicolítica participant en la catalització de la reacció de l'1,3-difosfoglicerat a 3-fosfoglicerat amb la formació d'una molècula d'ATP. Es van detectar una sèrie de proteïnes modificades per l'HNE en mostres d'Alzheimer (hipocamp), sent la FGC-1 una d'elles (Reed i col. 2008a).

Diferents enzims relacionats amb la glicòlisi i la glicogènesi han estat identificats per estar modificats oxidativament en diferents sistemes com per exemple en sinaptosomes tractats amb A β (1-42) (Boyd-Kimball i col. 2005), en cultius primaris de rates amb inducció d'estrès oxidatiu per l'amiloide β 1-42 (Sultana i col. 2006a), en ratolins envellits (Poon i col. 2006), en models de ratolins que mimetitzen la malaltia d'Huntington (Perluigi i col. 2005), en models murins d'envelliment accelerat (SAMP-8) de A β (Poon i col. 2004).

Sobre els anys 80 es va descriure en un estudi, amb *Escherichia coli*, el fet que certs enzims metabòlics es podien inactivar per efectes de sistemes d'oxidació. Es van trobar la FGC, l'alcohol deshidrogenasa, l'enolasa, la piruvat cinasa entre d'altres,

VI.DISCUSSIÓ

emfatitzant que molts d'aquests enzims presenten una histidina o un altre residu fàcilment oxidable en el seu centre catalític (Fucci i col. 1983). Anys després s'ha anat demostrant que diversos enzims són susceptibles a ser inactivats per l'acció d'adductes d'HNE com per exemple la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, la glutatió S-transferasa, la glutatió reductasa, l'aldosa reductasa (Uchida K. 2003a).

En el cas de l'aldolasa A, una reducció de l'activitat enzimàtica pot provocar un augment dels nivells de fructosa 1,6-difosfat induïnt una inhibició de la glicòlisi i una disminució d'ATP. Pel que fa a la FGC-1, la seva disfuncionalitat podria comportar una davallada en la producció d'energia.

L'any 1992 Karbe i col. 1992 van determinar l'índex metabòlic de la glucosa en cervells de pacients de PSP, a través de tècniques de neuroimatge com la FDG (¹⁸F-2-Fluoro-2-deoxi-D-Glucosa) i la PET (tomografia d'emissió de positrons). Van descriure en els individus patològics un hipometabolisme molt sever en les estructures subcorticals i una afectació menor, però igualment significativa, en l'escorça frontal corroborant d'aquesta manera estudis anteriors d'altres grups. Resultats publicats recentment, demostren *in vivo* una disminució de metabòlits rics energèticament (ATP, ADP, creatina fosforilada, creatina no fosforilada, fosfat inorgànic, lactat) en l'escorça frontal de cervells patològics (Stamelou i col. 2009) aportant més informació pel que fa a l'alteració del metabolisme energètic d'individus amb PSP.

En el cas de la MA també s'ha descrit una marcada disfuncionalitat del metabolisme de la glucosa cerebral (Pietrini i col. 2000) que pot ser donada per l'alteració de les activitats enzimàtiques de certs enzims claus en la glicòlisi (Bigl i col. 1999) o per una reducció en la densitat de les diferents classes de transportadors de glucosa corticals GLUT1 i GLUT3 (Mooradian i col. 1997).

Fa 30 anys es van fer estudis en sistemes biològics utilitzant models d'envelliment cel·lular, per tal de determinar els nivells de proteïnes modificades oxidativament. Per una banda, es van fer servir eritròcits d'individus normals de diferents edats per determinar els valors de proteïnes oxidades i, com a segon experiment, cultius cel·lulars de fibroblasts de pacients amb el síndrome de Werner (o progènia, desordre associat a l'envelliment accelerat). Els resultats van mostrar que els nivells de proteïnes modificades oxidativament augmentaven amb l'edat en els eritròcits i que aquests canvis estaven correlacionats amb una pèrdua de marcadors d'activitat enzimàtica. Pel que als estudis dels cultius de fibroblasts es va trobar una pujada dels

valors de carbonils a partir dels 60 anys d'edat, obtenint valors molt més alts i significatius en els patològics (Oliver i col. 1987). Al llarg de tots aquests anys s'han anat realitzant altres estudis on s'ha corroborat l'augment d'oxidació en funció de l'envelliment, com per exemple en el cas de l'enzim aldolasa trobant-se modificat oxidativament en el bulb olfatori de ratolins envellits (Vaishnav i col. 2007). Un altre treball per destacar fa referència a models murins d'envelliment on es va trobar una disminució de les activitats enzimàtiques mitocondrials (òxid nítric sintasa mitocondrial, NADH deshidrogenasa, citocrom oxidasa) directament relacionada amb el contingut de productes d'oxidació en els animals vells (Navarro A. 2004). En aquest context s'enquadren els nostres resultats on es va observar la presència de l'aldolasa A i de la FGC-1 oxidades en 3 dels 8 casos controls podent-se relacionar amb l'envelliment propi d'aquests individus.

3. Efecte de l'estrès oxidatiu en les proteïnes de les malalties englobades dins de la degeneració frontotemporal lobar (DFTL)

Seguint en la línia d'estudiar l'efecte de l'estrès oxidatiu sobre les proteïnes a l'escorça frontal de diferents malalties, es van caracteritzar tres grups de malalties englobades dins del marc de la DFTL: DFTL-tau (amb inclusions de tau), DFTL-U (sense inclusions de tau però immunoreactives per la ubiquïtina) i DFTL-ELA (sense inclusions de tau però positives per la ubiquïtina amb afectació de les motoneurones). Com a resultat de l'estudi de diferents marcadors d'estrès oxidatiu, es va observar la presència de lesió lipoxidativa (augment de la immunoreactivitat de l'anticòs anti-HNE) en l'escorça frontal de mostres patològiques però mostrant una gran diferència entre les diferents classes de malalties.

Pocs treballs s'han centrat en el paper de l'estrès oxidatiu en aquestes malalties. En ratolins transgènics amb mutació de la tau P301L es van medir els nivells de ROS (radical anió superòxid i peròxid d'hidrogen) de manera indirecta, a través de la DHE - DiHidroEtidi- que s'oxida a catió etidi fluorescent per l'anió superòxid i la H₂DCF - DiClorFluoresceïna- pels peròxids citosòlics, trobant-se augmentats ambdós marcadors en els ratolins transgènics (David i col. 2005). A través d'estudis funcionals i proteòmics també van observar defectes en el mitocondri amb una reducció de l'activitat del complex I i del complex V, corroborant l'alteració de l'activitat d'aquest últim en cervells humans diagnosticats amb DFTL-tau (mutació P301L) (David i col. 2005).

VI.DISCUSSIÓ

Pel que fa al grup de DFTL-U no s'han realitzat treballs previs semblants, en el subgrup de DFTL-ELA Ilieva i col 2007 van demostrar la presència de lesió oxidativa, anormalitats del mitocondri i estrès del reticle endoplasmàtic en la medul·la espinal de pacients.

Al fer la identificació dels diferents punts es va trobar que corresponien a la GFAP (glial fibrillary acidic protein), confirmant-ho per la col·localització de l'anticòs anti-HNE amb la GFAP en els astròcits gràcies al doble marcatge d'immunofluorescència i a la microscopia confocal, per gel d'electroforesis i western blot.

La GFAP és un filament intermedi que, juntament amb els microtúbuls i els microfilaments, formen part del citoesquelet. Representa la proteïna més important dels astròcits, havent-hi expressades d'altres com la nestina i la vimentina però en menor grau. Els astròcits són molt més abundants que les neurones, amb un ràtio d'astròcit-neurona de 1:10, en la majoria de regions del cervell.

Aquest tipus cel·lular és el principal sistema homeostàtic del cervell exercint diferents papers en el sistema nerviós: control del moviment dels fluids entre l'espai intracel·lular i l'extracel·lular, capacitat d'acceptar el glutamat i reduir l'excitotoxicitat, els astròcits estan interconnectats via *gap junctions* permetent la redistribució d'ions i de metabòlits perjudicials a llarga distància, participant en la regulació de la barrera hematoencefàlica, defensa del sistema nerviós central, alliberament de substàncies vasoactives que controlen el flux sanguini, coordinar també l'activitat neuronal (Anderson i col. 2003, Pekny i col. 2004, Pekny i col. 2005).

Els filaments intermedis de GFAP tenen importància en el manteniment mecànic o estructural del sistema nerviós quan aquest està sotmés a estressors mecànics greus. Pekny i col. 2004 van trobar en experiments amb ratolins *knock out* de filaments intermedis, on se'ls hi havia aplicat un estrès mecànic sever, que les retines dels controls estaven intactes però que les dels ratolins GFAP *-/-* Vim *-/-* es trobaven alterades. Els astròcits també tenen un paper molt important en el sistema de defensa antioxidant del cervell amb concentracions altes d'antioxidants comparant amb d'altres tipus cel·lulars del cervell (Dringen i col. 2000). Aquesta idea es basa en estudis de cultius de neurones que resulten més vulnerables al dany produït per H₂O₂, peroxinitrit o 6-hidroxidopamina que els cultius de cèl·lules astroglials (Bolanos i col. 1995). A més a més, els astròcits contribueixen als sistemes de defensa contra l'estrès oxidatiu de cèl·lules endotelials: en un model *in vitro* de la barrera hematoencefàlica els astròcits tenien augmentades les activitats de la SOD, la catalasa i la GPx amb una disminució de la quantitat de radicals produïts per peroxidació

lipídica (Schroeter i col. 1999). L'expressió de GPX i de catalasa estan augmentades en cultius cel·lulars d'astròcits després de l'exposició a H₂O₂ (Rohrdanz i col. 2001), la inhibició de catalasa redueix el ràtio d'eliminació del H₂O₂ pels astròcits.

Els astròcits estan implicats en una gran varietat de malalties del sistema nerviós central com per exemple en un trauma, isquèmia o bé en malalties neurodegeneratives (mutacions en el gen de la GFAP donen lloc a una patologia anomenada Alexander (Liem i col. 2009)). En aquestes situacions les cèl·lules de la glia s'activen: la microglia produeix resposta inflamatòria i els astròcits canvien la seva morfologia (hi ha una hipertrofia dels seus processos cel·lulars i un augment de la producció de filaments intermedis, principalment de la GFAP encara que també de la nestina i de la vimentina). Aquest procés s'anomena *gliosi reactiva* i quan es parla només de l'activació dels astròcits es fa referència a l'*astrocitosi* (astrogliosi). És una reacció de defensa del cervell per tal d'aïllar la zona afectada de la resta del teixit del sistema nerviós central, reconstruir la barrera hematoencefàlica i ajudar a modificar els circuits del cervell en regions al voltant de la zona lesionada (Rodríguez i col. 2009). S'han descrit cinc isoformes de la GFAP: α , β , γ , δ i ϵ (Nielsen i col. 2002) on l' α és la més abundant en situacions d'astrocitosi, encara que en el nostre treball no se sap quina de les cinc isoformes es va identificar.

Tot i que està descrit que hi ha un augment de l'expressió de GFAP amb l'envelliment (Major i col. 1997), s'ha vist un increment molt més marcat en diferents patologies. Schweitzer i col. 2006 van detectar, en cervells diagnosticats de DFTL-tau, un augment dels nivells de GFAP (multiplicada 5.4 vegades la seva expressió) respecte dels controls. Els nostres resultats d'immunohistoquímica mostren una pèrdua neuronal consistent amb una forta presència d'astròcits podent indicar un canvi de població cel·lular. Aquesta astrocitosi està molt accentuada (resultats també corroborats per l'anàlisi de western blot) en les mostres de DFTL-tau i també en els casos de DFTL-U i de DFTL-ELA observant una gran variabilitat en aquestes últimes patologies. Aquest augment dels nivells d'expressió de la GFAP correlaciona amb la intensitat de la lesió oxidativa (lipoxidativa). Es va intentar fer un anàlisi quantitatiu de l'expressió de la GFAP, i també de l'HNE, però no va ser possible: l'astrocitosi era molt severa en uns casos i en d'altres no tant i, a més a més, els diferents casos expressaven més una banda que unes altres presentant problemes de quantificació.

VI.DISCUSSIÓ

La GFAP ha estat descrita oxidada en d'altres malalties neurodegeneratives, en algunes taupaties com en la MA (Pamplona i col. 2005), la malaltia de Pick (Muntané i col. 2006) i en la PSP (Santpere i col. 2009). Ara bé, també s'ha trobat la GFAP com a diana d'oxidació en d'altres tipus de patologies no associades a inclusions de tau com, per exemple, en la malaltia de Huntington on els nivells dels grups carbonils es van trobar doblats en la zona de l'estriat dels patològics comparant amb els controls (Sorolla i col. 2008). En mostres d'escorça de pacients amb ceruloplasminèmia (un desordre autosòmic recessiu on està afectat el metabolisme del ferro per mutacions en el gen de la ceruloplasmina) es va trobar la GFAP com una de les proteïnes més importants carbonilades (Kaneko i col. 2002). S'han descrit d'altres modificacions, a part de l'oxidació, com són l'O-glicosilació, la N-glicosilació o la fosforilació: es va observar un augment de la GFAP N-glicosilada i fosforilada en mostres de MA (Korolainen i col. 2005). Ara bé, aquestes modificacions oxidatives que pateix la GFAP encara que no se sap quin tipus d'efecte produeix en la seva funcionalitat, indiquen que els astròcits són dianes d'estrès oxidatiu.

Seguint aquesta línia, es va analitzar la composició d'àcids grassos de la membrana trobant un canvi en el seu perfil comparant les mostres de DFTL-tau amb els controls: es va determinar un contingut menor d'àcids grassos saturats i de PUFA (majoritàriament de PUFA n-3) amb una disminució en els índexs de dobles enllaços i de peroxidabilitat. Aquests resultats donen suport als valors de MDA analitzats per GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry) on es van trobar significativament elevats en els casos de DFTL-tau, ja que és un aldehid que es forma a partir de la peroxidació lipídica dels ω -3 i també dels ω -6. Segurament per la diferència de sensibilitat de les tècniques, aquestes resultats no es van trobar per western blot. Pel que fa als casos de DFTL-ELA, només van resultar significatius els baixos continguts de PUFA n-3 i l'augment de PUFA n-6. Els marcadors indicadors de dobles enllaços i de peroxidació lipídica van disminuir respecte als controls però no significativament.

No se sap l'origen dels canvis en la composició dels àcids grassos de les membranes però podrien ser deguts per una combinació de diferents factors: desplaçament d'una població cel·lular per una altra on cada una conté patrons específics d'àcids grassos (pèrdua neuronal i astrocitosi), canvis produïts perquè la membrana cel·lular s'adapti a l'estat patològic, alteracions del metabolisme i del transport dels àcids grassos essencials, acció directa de lesió oxidativa en la membrana cel·lular, una disfunció mitocondrial podria promoure la fugida de ROS podent atacar a les membranes amb el consegüent augment de peroxidació lipídica i producció d'adductes (HNE, MDA-L).

En el nostre treball es va trobar un augment de l'expressió, per western blot, de l'enzim catalasa en la majoria de casos de DFTL que correlacionava amb els resultats obtinguts amb l'HNE. Aquest increment indica una resposta de les cèl·lules per tal de compensar la situació de desequilibri provocat per l'augment de radicals lliures reactius. Pel que fa als enzims antioxidants SOD, la SOD-1 col·localitzava amb la GFAP en mostres de DFTL-tau i de DFTL-U i la SOD-2 es trobava tant en els astròcits (col·localització amb GFAP) com en les neurones (reconegudes per la morfologia del citoplasma) de DFTL-tau i de DFTL-U.

4. Proteïnes modificades nitro/oxidativament en les malalties neurodegeneratives

En el marc dels estudis presentats, junt amb d'altres treballs del grup i veient la gran quantitat d'informació publicada, ens vam plantejar de fer una revisió dels diferents treballs de proteòmica redox en les malalties neurodegeneratives.

La tècnica dels gels bidimensionals va ser desenvolupada sobre els anys 70 però la seva aplicació útil va arribar uns anys després amb l'ús d'eines microanalítiques que poguessin identificar les proteïnes. A mitjans dels anys 90 la introducció de determinades tècniques, com la separació de proteïnes a través de gels 2D-PAGE amb gradients de pH immovilitzats (IPGs) i l'espectrometria de masses per analitzar proteïnes i pèptids, van permetre el desenvolupament del camp de la proteòmica. El terme de *proteoma* es va utilitzar per primer cop l'any 1995 per definir el "conjunt de *PROTEïnes* d'un *genOMA*, una cèl·lula o un teixit", donant lloc a la seva corresponent disciplina: la *proteòmica*, on el seu objectiu és l' "estudi a gran escala dels productes gènics d'un genoma a través de mètodes bioquímics, on la idea final és obtenir una visió global i integrada dels processos cel·lulars".

S'han publicat interessants treballs (Butterfield i col.. 2006a, Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield DA. 2006, Sultana i col. 2009) que han llistat les proteïnes modificades nitro/oxidativament de diferents patologies, principalment de la MA, utilitzant gels bidimensionals.

En el nostre cas es va voler emfatitzar:

- actualitzant les dades fins ara obtingudes i ampliant la revisió a d'altres taupaties, sinucleopaties, malaltia d'Huntington i a l'ELA. També pel que fa als models animals i cel·lulars que mimetitzen les malalties.

VI.DISCUSSIÓ

- identificant vies metabòliques i proteïnes vulnerables a la nitració/oxidació, comuns en les diferents patologies.
- examinant els resultats descrits en estadiatges primerencs de les malalties.
- analitzant si les dianes proteïques identificades estan vinculades a estudis d'activitat enzimàtica.
- revisant la metodologia utilitzada en els diferents estudis.
- discutint les limitacions de la proteòmica redox i suggerint millores per futurs estudis.

Les majoria de treballs que han identificat proteïnes que són dianes de nitració/oxidació, s'han centrat en la MA. Per tal de fer més entenedor el gran volum d'informació que hi ha al respecte, les proteïnes modificades es van classificar en diferents grups: *a)* metabolisme de la glicòlisi i energètic, *b)* cadena de transport d'electrons, fosforilació oxidativa i elements mitocondrials, *c)* proteïnes estructurals, *d)* xaperones, proteïnes d'estrès i de resposta a l'estrès, *e)* sistema ubiquitina-proteasoma, *f)* altres proteïnes aïllades dins de vies metabòliques concretes.

En les altres malalties no va ser necessari agrupar les proteïnes ja que hi ha pocs estudis al respecte.

En la nostra revisió es va observar la identificació de la β -actina (Aksenov i col. 2001, Castegna i col. 2003, Korolainen i col. 2005, Pamplona i col. 2005, Reed i col. 2008a), la β -tubulina (Aksenov i col. 2001, Pamplona i col. 2005), la GFAP (Korolainen i col. 2005, Pamplona i col. 2005), l' α -enolasa (Butterfield i col. 2006b, Castegna i col. 2003, Korolainen i col. 2005, Newman i col. 2007, Pamplona i col. 2005, Reed i col. 2008a, Reed i col. 2008b, Sultana i col. 2006b, Sultana i col. 2009), la γ -enolasa (Butterfield i col. 2006c, Castegna i col. 2003, Pamplona i col. 2005), l'aldolasa A (Korolainen i col. 2006, Reed i col. 2008b), la glutamat deshidrogenasa (Korolainen i col. 2006, Pamplona i col. 2005), la glutamina sintetasa (Butterfield i col. 2006b, Pamplona i col. 2005), l'ATP sintasa (Pamplona i col. 2005, Reed i col. 2008a, Sultana i col. 2006b, Terni i col. 2009), la piruvat cinasa (Butterfield i col. 2006b, Reed i col. 2008a), l'UCL-1 (Butterfield i col. 2006c, Sultana i col. 2009), la CK BB (Aksenov i col. 2001, Korolainen i col. 2005, Pamplona i col. 2005), la Pin 1 (Butterfield i col. 2006b, Sultana i col. 2006c, Sultana i col. 2009) en, com a mínim, dos estudis diferents en pacients de la MA demostrant la reproductibilitat dels resultats i també que determinades proteïnes tenen tendència a modificar-se.

També es va poder veure l'elevada presència de les mateixes proteïnes modificades (aldolasa A, enolasa, GAPDH,...) relacionades amb la glicòlisi i el metabolisme

energètic, en diferents malalties (en la MA, en la MP, a Huntington, a PSP, a la malaltia de Pick). Els nostres resultats de la malaltia de PSP queden emmarcats dins d'aquesta categoria d'enzims identificats i relacionats amb la glicòlisi. Així doncs s'observen dianes d'oxidació comuns entre patologies i per altra banda determinades proteïnes, com per exemple del mitocondri on el complex V (ATP sintasa) que estava modificat en la MA mentre que la subunitat del complex I ho estava en la MP, específiques de patologia.

Petrak i col. 2008 van dissenyar un interessant estudi: un meta-anàlisi proteòmic *in silico* per valorar si la presència de les mateixes proteïnes en diferents experiments, teixits i espècies era una resposta comú de la cèl·lula o bé un reflex de certes limitacions tècniques dels gels bidimensionals. Van recollir i llistar les proteïnes diferencialment expressades, detectades per gels bidimensionals, dels treballs publicats en tres volums de la revista *Proteomics*. Dins de les "TOP 15" es trobaven enzims glicolítics (enolasa 1, piruvat cinasa 1), proteïnes d'estrès (HSP 27, peroxiredoxin) i proteïnes relacionades amb el citoesquelet (vimentina). Van passar a fer també un anàlisi computacional dels resultats dels respectius RNAm que hi havia publicats. Trobant valors dels RNAm alterats de les proteïnes majoritàries, van suggerir una relació entre la diferent expressió a nivell de proteïna i la patologia (Petrak i col. 2008).

El fet que s'hagin utilitzat models animals murins (ratolins i rates) i cultius cel·lulars primaris, obtenint resultats semblants als de les mostres humanes, indica que aquesta modificació proteïca està relacionada principalment amb el procés degeneratiu i no amb possibles factors pre i/o post mortem.

No se sap el perquè de la vulnerabilitat a l'oxidació de determinades proteïnes però alguns dels següents factors podrien donar una possible explicació: la presència de llocs d'unió als metalls, la pròpia conformació molecular proteïca que augmenti la predisposició, l'índex de proteòlisi, l'abundància de determinats aminoàcids susceptibles a l'oxidació catalitzada per metalls i la quantitat de la proteïna.

Aquesta última variable és important de comentar una mica més ja que les proteïnes abundants són més fàcils d'identificar que les minoritàries. El fet de carregar més quantitat de proteïna a la tira (per córrer la primera dimensió) no comporta que les proteïnes (minoritàries) esdevindran en punts més visibles. Això es deu a que, per una banda, les tires tenen un lllindar a partir del qual la concentració de proteïna total no interfereix amb la capacitat de la solució tampó i, per altra banda, pot haver-hi una possible fusió de punts i comigració que poden portar a identificacions ambigües

VI.DISCUSSIÓ

(Corthals i col. 2000). Així doncs, potser proteïnes importants però menys presents podrien estar emmascarades i no poder-se detectar.

La majoria d'experiments s'han fet en homogenats totals de cervell (taula d'informació adicional de l'article) de la regió seleccionada, una via alternativa podria ser la de fer enriquiment o fraccionament cel·lular (Gomez i col. 2009, Santpere i col. 2007, Terni i col. 2009) per poder augmentar la quantitat total de les possibles proteïnes minoritàries (Rabilloud T. 2002). Possibles mètodes que es poden aplicar podrien ser la separació per gradients de densitats, immuno-aïllament, citometria de flux, extracció seqüencial de cèl·lules i de teixit utilitzant solucions tampons amb diferents detergents (Corthals i col. 2000). Aquesta seria una possible estratègia per poder ajudar a entendre la vulnerabilitat selectiva *vs* de la no selectiva.

En la mateixa línia, Bland i col. 2006 van fer estudis comparatius de diferents solucions tampons per homogenitzar i enfocar la mostra (teixit cardíac) en gels bidimensionals. Van concloure que homogenitzant el teixit en el tampó A (5 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 2% amfolits 3-10, 0.2% biolits, 1% DTT) i enfocant en el tampó B (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 1% ASB 14, 0.2% biolits) s'augmentava el número de punts. Per altra banda també van determinar que tots els gels tenien la majoria de proteïnes en el rang de pI de 5-7. Així doncs si s'optimitzessin les condicions es podria augmentar el nombre de proteïnes per identificar i, per altra banda, combinant les diferents solucions tampons es milloraria la reproductibilitat dels extrems àcids o bàsics augmentant la resolució. Fer ús d'aquests diferents protocols seria molt útil i interessant en el cas del nostre treball d'oxidació en la DLFT. La identificació que es va fer de la GFAP com a diana oxidativa proporciona una bona informació descriptiva, lligada amb la pèrdua neuronal i la modificació del perfil dels àcids grassos de membrana. Ara bé, és una proteïna molt expressada en les malalties neurodegeneratives i aquests nivells alts podrien enmascarar d'altres proteïnes també modificades oxidativament.

Per altra banda, es fa patent la importància de detectar els residus específics de les modificacions oxidatives de les proteïnes identificades gràcies a la combinació de MALDI-TOF/MS i d'anàlisis d'HPLC-ESI/MS/MS (Choi i col. 2004). Aquesta informació podria ajudar a relacionar l'oxidació de determinats residus amb la seva importància en la funcionalitat de la proteïna.

Els enzims poden patir modificacions nitro/oxidatives que modifiquin la seva activitat, ara bé s'haurien de fer estudis d'activitat per poder verificar la seva disfuncionalitat.

Aquesta disminució de l'activitat enzimàtica podria ser deguda a una reducció del nombre de cèl·lules específiques, a una distribució tissular, a una reducció de la quantitat d'enzim,...En la revisió feta la majoria d'estudis enfocats a identificar l'oxidació de proteïnes no anaven acompanyats d'estudis funcionals. En els treballs que sí la feien, un augment de la lesió oxidativa en certes proteïnes correlacionava amb una disminució de l'activitat enzimàtica com en el cas de la CK BB (Aksenov i col. 2000), l'enolasa 1 (Butterfield i col. 2006b, Newman i col. 2007, Sultana i col. 2006b), la glutamina sintetasa (Butterfield i col. 2006b), la Pin-1 (Butterfield i col. 2006b, Sultana i col. 2006c), la CA II (Sultana i col. 2006b), l'UCHL-1 (Sultana i col. 2006b), la GAPDH (Newman i col. 2007), la GDH (Reed i col. 2008b), la LDH (Reed i col. 2008a), l'ATP sintasa (Reed i col. 2008a), la piruvat cinasa (Butterfield i col. 2006b, Reed i col. 2008a, Terni i col. 2009) en la MA. Ara bé, cal tenir en compte els nivells de la proteïna total: una disminució de l'activitat amb una reducció del nivell total de proteïna no permetria concloure que aquest descens ve donat per l'oxidació que pateix l'enzim. Seria interessant a partir de la identificació de la proteïna modificada oxidativament, determinar el seu nivell d'expressió i la seva activitat enzimàtica. En el cas del nostre estudi de la PSP, l'aldolasa A i la FGC-1 van presentar iguals nivells proteïcs en els controls que en els patològics (aquests resultats no estan a l'article). No es van realitzar, però, estudis funcionals de les activitats. Aquests dada seria molt útil per tal de poder relacionar més fermement que la lesió lipoxidativa produïa disminució de l'activitat dels enzims glicolítics junt amb l'hipometabolisme descrit en aquests pacients. La lesió oxidativa proteïca relacionada amb la disfuncionalitat del metabolisme també ha estat descrita en casos de la MA i de la MP, així que una correlació d'estudis neurològics, de neuroimatge i bioquímics seria clau per reconèixer l'important paper de l'estrès oxidatiu amb la conseqüent clínica. Anant un pas més enllà, permetria tenir identificades les dianes per futures aplicacions terapèutiques.

VII. CONCLUSIONS

VII.CONCLUSIONS

- La integritat del RNA en el cervell post mortem varia en les diferents regions del cervell d'un mateix individu sent una informació molt valuosa a l'hora de fer estudis comparatius entre zones. És necessari l'estudi individual de cada una de les mostres d'estudi per tal de valorar la conservació del RNA amb paràmetres del valor del RIN.
- Les modificacions d'oxidació i de nitració de les proteïnes són sensibles al temps de RPM podent ser les proteïnes dianes d'alteracions en el post mortem.
- Les mostres d'escorça frontal de paràlisi supranuclear progressiva (PSP) presenten un augment de la lesió oxidativa, concretament de lipoxidació, comparant amb els controls.
- L'aldolasa A i la fosfoglicerat cinasa-1 (FGC-1) són dianes de lipoxidació en els patològics, suggerint una possible disfunció de la via glicolítica.
- Aquests enzims es poden trobar modificats lipoxidativament amb l'edat, indicant una alteració associada amb l'envelliment.
- L'escorça frontal de pacients amb degeneració frontotemporal lobar (DFTL) tenen nivells més alts de lesió lipoxidativa comparant amb els controls.
- La GFAP és una diana de lipoxidació en les diferents patologies estudiades de DFTL (DFTL amb parkinsonisme lligada al cromosoma 17 associada a mutacions de la tau -DFTL-tau-, DFTL amb inclusions positives d'ubiquitina -DFTL-U-, DFTL associada a patologia de motoneurona i esclerosi lateral amiotròfica -DLFT-ELA-).
- La lesió lipoxidativa correlaciona amb l'astrocitosi en cada grup de patologies.
- Les mostres de DFTL-tau i de DFTL-ELA tenen alteracions en la composició dels àcids grassos de membrana.
- S'observa la presència de respostes antioxidants com la sobreexpressió de catalasa en els patològics correlacionant amb els casos amb més lesió oxidativa.
- Pel que fa a les respostes de les superòxids dismutases (SODs), la SOD-1 col·localitza amb la GFAP en mostres de DFTL-tau i de DFTL-U i en el cas de la SOD-2 es troba tant en astròcits com en neurones.

VII. CONCLUSIONS

- Determinades proteïnes són dianes d'oxidació comuns en diferents malalties neurodegeneratives, per contra n'hi ha d'altres que són selectives de patologia.
- Les proteïnes relacionades amb les vies del metabolisme energètic són les majoritàries dianes vulnerables a l'estrès oxidatiu.
- La utilització de models animals i de cultius cel·lulars demostren que la modificació proteïca no és deguda a factors pre o post mortem sinó que està relacionada amb el procés de degeneració.
- Realitzar protocols d'enriquiment o fraccionament cel·lular, la utilització de diferents solucions tampons, l'augment de la resolució dels extrems àcids i bàsics, poden permetre una millora en la detecció de proteïnes minoritàries.
- Els anàlisis funcionals de les proteïnes oxidades, i la quantitat de proteïna, permeten relacionar la modificació proteïca amb la disfuncionalitat de l'enzim.

VIII. BIBLIOGRAFIA

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Acker T, Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: Physiological and pathological implications. *J Exp Biol* 2004; 207: 3171-88.
- Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2009.
- Ahmed KA, Muniandy S, Ismail IS. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine and coronary atherosclerosis-associated low density lipoprotein abnormalities in type 2 diabetes: Current status. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 44: 14-27.
- Aksenov M, Aksenova M, Butterfield DA, Markesbery WR. Oxidative modification of creatine kinase BB in alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 2000; 74: 2520-7.
- Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR. Protein oxidation in the brain in alzheimer's disease. *Neuroscience* 2001; 103: 373-83.
- Alberts B, Bray D, Lewis J. *Biología molecular de la célula*. Editorial Omega, 1996.
- Albers DS, Augood SJ, Martin DM, Standaert DG, Vonsattel JP, Beal MF. Evidence for oxidative stress in the subthalamic nucleus in progressive supranuclear palsy. *J Neurochem* 1999; 73: 881-4.
- Albers DS, Augood SJ, Park LC, Browne SE, Martin DM, Adamson J, Hutton M, Standaert DG, Vonsattel JPG, Gibson GE, Flint Beal M. Frontal lobe dysfunction in progressive supranuclear palsy: Evidence for oxidative stress and mitochondrial impairment. *J Neurochem* 2000; 74: 878-81.
- Albers DS, Augood SJ. New insights into progressive supranuclear palsy. *Trends Neurosci* 2001; 24: 347-53.
- Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev* 2007; 27: 817-68.
- Alvarez-Garcia O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomas-Zapico C, Camins A, García JJ, Pallàs M, Coto-Montes A. Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology* 2006; 7: 43-52.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
- Andersen O, Markham K. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. CRC Publication, 2005.
- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. Astrocytes and stroke: Networking for survival? *Neurochem Res* 2003; 28: 293-305.
- Aoyama K, Matsubara K, Kobayashi S. Aging and oxidative stress in progressive supranuclear palsy. *Eur J Neurol* 2006; 13: 89-92.
- Armstrong RA, Lantos PL, Cairns NJ. Overlap between neurodegenerative disorders. *Neuropathology* 2005; 25: 111-24.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 457-63.
- Arvanitakis Z. Update on frontotemporal dementia. *Neurologist*. 2010 Jan;16(1):16-22.
- Baker M, Litvan I, Houlden H, Adamson J, Dickson D, Perez-Tur J, Hardy J, Lynch T, Bigio E, Hutton E. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 711-5.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C i col. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006; 442: 916-9.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 663-72.
- Bamburg JR, Bloom GS. Cytoskeletal pathologies of alzheimer disease. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66: 635-49.
- Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med*. 2009 Dec 4. [Epub ahead of print].
- Barghorn S, Zheng-Fischhofer Q, Ackmann M, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* 2000; 39: 11714-21.
- Barrachina M, Ferrer I. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Aug;68(8):880-91.
- Basta G, Castagnini M, Del Turco S, Epistolato MC, Righini P, Sangiorgi GM, De Caterina R, Tanganelli T. High plasma levels of the soluble receptor for advanced glycation endproducts in patients with symptomatic carotid atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 1065-72.
- Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH Jr. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1997 Oct;42(4):644-54.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-81.
- Benistant C, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R, Lagarde M. Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: Effect of the coculture with astrocytes. *J Lipid Res* 1995; 36: 2311-9.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-6.
- Bernoud N, Fenart L, Benistant C, Pageaux JF, Dehouck MP, Moliere P, Lagarde M, Cecchelli R, Lecerf J. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J Lipid Res* 1998; 39: 1816-24.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Bigl M, Bruckner MK, Arendt T, Bigl V, Eschrich K. Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999; 106: 499-511.
- Billingsley ML, Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: Effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 1997; 323 (Pt 3): 577-91.
- Bland AM, D'Eugenio LR, Dugan MA, Janech MG, Almeida JS, Zile MR, Arthur JM. Comparison of variability associated with sample preparation in two-dimensional gel electrophoresis of cardiac tissue. *J Biomol Tech* 2006; 17: 195-9.
- Bohm B. Introduction to flavonoids. Harwood Academic Publishers, 1998.
- Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: Differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 1995; 64: 1965-72.
- Bourre JM. Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: Update on dietary requirements for brain. part 2 : Macronutrients. *J Nutr Health Aging* 2006; 10: 386-99.
- Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm* 2005; 46: 85-95.
- Boyd-Kimball D, Castegna A, Sultana R, Poon HF, Petroze R, Lynn BC, Klein JB, Butterfield DA. Proteomic identification of proteins oxidized by abeta(1-42) in synaptosomes: Implications for alzheimer's disease. *Brain Res* 2005; 1044: 206-15.
- Brenna JT, Diau GY. The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007; 77: 247-50.
- Brun A, Englund B, Gustafson L, Passant U, Mann DMA, Snowden JS, Neary D. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Apr;57(4):416-8.
- Bruun-Jensen L, Skovgaard IM, Skibsted LH, Bertelsen G. Antioxidant synergism between tocopherols and ascorbyl palmitate in cooked, minced turkey. *Z Lebensm Unters Forsch* 1994; 199: 210-3.
- Buesa C, Maes T, Subirada F, Barrachina M, Ferrer I. DNA chip technology in brain banks: Confronting a degrading world. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 1003-14.
- Butterfield DA, Abdul HM, Newman S, Reed T. Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. *NeuroRx* 2006a; 3: 344-57.
- Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: Insights into the development of alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006b; 22: 223-32.
- Butterfield DA, Gnjec A, Poon HF, Castegna A, Pierce WM, Klein JB, Martins RN. Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited alzheimer's disease: An initial assessment. *J Alzheimers Dis* 2006c; 10: 391-7.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ i col. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: Consensus of the consortium for frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 2007a; 114: 5-22.
- Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, Foong C, White CL 3rd, Schneider JA, Kretschmar HA i col. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am J Pathol.* 2007b Jul;171(1):227-40.
- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Giuffrida Stella AM, Butterfield DA. Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation. *Dev Neurosci* 2002; 24: 1-13.
- Candeias LP, Patel KB, Stratford MR, Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett* 1993; 333: 151-3.
- Cantuti-Castelvetri I, Keller-McGandy CE, Albers DS, Beal MF, Vonsattel JP, Standaert DG, Augood SJ. Expression and activity of antioxidants in the brain in progressive supranuclear palsy. *Brain Res* 2002; 930: 170-81.
- Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated proteins in alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 2003; 85: 1394-401.
- Chambers CB, Lee JM, Troncoso JC, Reich S, Muma NA. Overexpression of four-repeat tau mRNA isoforms in progressive supranuclear palsy but not in alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 325-32.
- Chandana R, Mythri RB, Mahadevan A, Shankar SK, Srinivas Bharath MM. Biochemical analysis of protein stability in human brain collected at different post-mortem intervals. *Indian J Med Res* 2009; 129: 189-99.
- Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 1362-7.
- Chirichigno JW, Manfredi G, Beal MF, Albers DS. Stress-induced mitochondrial depolarization and oxidative damage in PSP cybrids. *Brain Res* 2002; 951: 31-5.
- Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, Li L. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem.* 2004 Mar 26;279(13):13256-64. Epub 2004 Jan 13.
- Cleveland DW. From charcot to SOD1: Mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* 1999; 24: 515-20.
- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC. The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 2000; 21: 1104-15.
- Crecelius A, Gotz A, Arzberger T, Frohlich T, Arnold GJ, Ferrer I, Kretschmar HA. Assessing quantitative post-mortem changes in the gray matter of the human frontal cortex proteome by 2-D DIGE. *Proteomics* 2008; 8: 1276-91.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 747-58.
- Cummings TJ, Strum JC, Yoon LW, Szymanski MH, Hulette CM. Recovery and expression of messenger RNA from postmortem human brain tissue. *Mod Pathol* 2001; 14: 1157-61.
- Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Mizani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 55-99.
- Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA. Redox proteomics: From protein modifications to cellular dysfunction and diseases. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2006.
- Danielson SR, Andersen JK. Oxidative and nitrative protein modifications in parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1787-94.
- David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K, Keil U, Rizzu P, Ravid R, Dröse S, Brandt U, Müller WE, Eckert A, Götz J. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J Biol Chem* 2005; 280: 23802-14.
- Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986; 235: 747-54.
- Dayanandan R, Van Slegtenhorst M, Mack TG, Ko L, Yen SH, Leroy K, Brion JP, Anderton BH, Hutton M, Lovestone S. Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett* 1999; 446: 228-32.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324 (Pt 1): 1-18.
- Dib M, Garrel C, Favier A, Robin V, Desnuelle C. Can malondialdehyde be used as a biological marker of progression in neurodegenerative disease? *J Neurol* 2002; 249: 367-74.
- Dickson DW. Neuropathologic differentiation of progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol* 1999; 246 Suppl 2: II6-15.
- Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature* 2003; 426: 884-90.
- Dohm CP, Kermer P, Bahr M. Aggregopathy in neurodegenerative diseases: Mechanisms and therapeutic implication. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 321-38.
- Doorn JA, Petersen DR. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1445-50.
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkov EA, Mandelkov E. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule

VIII. BIBLIOGRAFIA

- interactions and dynamic instability by phosphorylation at the alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 1995; 270: 7679-88.
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 2000a; 62: 649-71.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000b; 267: 4912-6.
- Durrenberger PF, Fernando S, Kashefi SN, Ferrer I, Hauw JJ, Seilhean D, Smith C, Walker R, Al-Sarraj S, Troakes C, Palkovits M, Kasztner M, Huitinga I, Arzberger T, Dexter DT, Kretschmar H, Reynolds R. Effects of antemortem and postmortem variables on human brain mRNA quality: A BrainNet europe study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69: 70-81.
- Ervin JF, Heinzen EL, Cronin KD, Goldstein D, Szymanski MH, Burke JR, Welsh-Bohmer KA, Hulette CM. Postmortem delay has minimal effect on brain RNA integrity. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 1093-9.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* 2000; 106: 1-29.
- Farooqui T, Farooqui AA. Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 203-15.
- Fattman CL, Chu CT, Kulich SM, Enghild JJ, Oury TD. Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1198-207.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U i col. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1997 Nov;69(5):2064-74.
- Ferrer I, Santpere G, Arzberger T, Bell J, Blanco R, Boluda S, Budka H, Carmona M, Giaccone G, Krebs B, Limido L, Parchi P, Puig B, Strammiello R, Ströbel T, Kretschmar H. Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: Implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: A BrainNet europe study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007a; 66: 35-46.
- Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J, Budka H, Ströbel T, Giaccone G, Rossi G, Bogdanovic N, Fakai P, Schmitt A, Riederers P, Al-Sarraj S, Ravid R, Kretschmar H. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: A BrainNet europe study. *Brain Pathol* 2007b; 17: 297-303.
- Ferrer I, Martinez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M. Brain banks: Benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank* 2008; 9: 181-94.
- Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 236-45.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys* 2008; 477: 183-95.
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurodegenerative diseases: A decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 2004; 10: 1055-63.
- Fountoulakis M, Hardmeier R, Hoyer H, Lubec G. Postmortem changes in the level of brain proteins. *Exp Neurol* 2001; 167: 86-94.
- Fratiglioni L, Qiu C. Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Exp Gerontol* 2009; 44: 46-50.
- Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 9982-6.
- Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 1521-5.
- Gao F, Kinnula VL, Myllarniemi M, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 343-54.
- Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, Crook R i col. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Hum Mol Genet.* 2006 Oct 15;15(20):2988-3001. Epub 2006 Sep 1.
- Gendron TF, Petrucelli L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 2009; 4: 13.
- Gerst JL, Siedlak SL, Nunomura A, Castellani R, Perry G, Smith MA. Role of oxidative stress in frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 10 Suppl 1: 85-7.
- Ghetti B, Hutton ML, Wszolek ZK. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 associated with tau gene mutations (FTDP-17). In: Dickson D, editor. *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. Basel: ISN Neuropath Press, 2003 p. 86-102.
- Glomset JA. Role of docosahexaenoic. *Sci STKE* 2006; 7: 1-4.
- Godbolt AK, Josephs KA, Revesz T, Warrington EK, Lantos P, King A i col. Sporadic and familial dementia with ubiquitin-positive tau-negative inclusions: clinical features of one histopathological abnormality underlying frontotemporal lobar degeneration. *Arch Neurol.* 2005 Jul;62(7):1097-101.
- Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 1990; 9: 4225-30.
- Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G. Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem* 1979; 254: 4040-5.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Gomez A, Ferrer I. Increased oxidation of certain glycolysis and energy metabolism enzymes in the frontal cortex in lewy body diseases. *J Neurosci Res* 2009; 87: 1002-13.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1147-50.
- Harrison PJ, Heath PR, Eastwood SL, Burnet PW, McDonald B, Pearson RC. The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: Selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci Lett* 1995; 200: 151-4.
- Hartzler AW, Zhu X, Siedlak SL, Castellani RJ, Avilá J, Perry G, Smith MA. The p38 pathway is activated in Pick disease and progressive supranuclear palsy: a mechanistic link between mitogenic pathways, oxidative stress, and tau. *Neurobiol Aging*. 2002 Sep-Oct;23(5):855-9.
- Hauw JJ. Progressive supranuclear palsy (PSP) or steele-richardson-olszewski disease. In: Dickson D, editor. *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. Basel: ISN Neuropath Press, 2003 p.103-114.
- Henderson JP, Byun J, Williams MV, McCormick ML, Parks WC, Ridnour LA, Heinecke JW. Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: A mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1631-6.
- Hilbig H, Bidmon HJ, Oppermann OT, Remmerbach T. Influence of post-mortem delay and storage temperature on the immunohistochemical detection of antigens in the CNS of mice. *Exp Toxicol Pathol* 2004; 56: 159-71.
- Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 585-600.
- Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1987; 18: 27-79.
- Hsu PC, Guo YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 33-44.
- Ilieva EV, Ayala V, Jove M, Dalfo E, Cacabelos D, Povedano M, Bellmunt MJ, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otín M. Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2007; 130: 3111-23.
- Jackson M, Lennox G, Lowe J. Motor neurone disease-inclusion dementia. *Neurodegeneration* 1996; 5: 339-50.
- Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* 2009; 116: 1111-62.
- Josephs KA, Holton JL, Rossor MN, Godbolt AK, Ozawa T, Strand K, Khan N, Al-Sarraj S, Revesz T. Frontotemporal lobar degeneration and ubiquitin immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 369-73.
- Kaneko K, Nakamura A, Yoshida K, Kametani F, Higuchi K, Ikeda S. Glial fibrillary acidic protein is greatly modified by oxidative stress in aceruloplasminemia brain. *Free Radic Res* 2002; 36: 303-6.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Karbe H, Grond M, Huber M, Herholz K, Kessler J, Heiss WD. Subcortical damage and cortical dysfunction in progressive supranuclear palsy demonstrated by positron emission tomography. *J Neurol* 1992; 239: 98-102.
- Kato S, Shaw PJ, Wood-Allum C, Leigh PN, Shaw C. Motor neuron disorders. In: Dickson D, editor. *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*. Basel: ISN Neuropath Press, 2003 p.349-377.
- Kauffman GB. Moses gomberg (1866–1947), father of organic free radical chemistry: A retrospective view on the 60th anniversary of his death. *Chem. Educator* 2008;13: 28-33.
- Kawashima T, Kikuchi H, Takita M, Doh-ura K, Ogomori K, Oda M, Iwaki T. Skein-like inclusions in the neostriatum from a case of amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Acta Neuropathol* 1998; 96: 541-5.
- Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T, Uchida K. Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 2001; 276: 12076-83.
- Korolainen MA, Auriola S, Nyman TA, Alafuzoff I, Pirttila T. Proteomic analysis of glial fibrillary acidic protein in alzheimer's disease and aging brain. *Neurobiol Dis* 2005; 20: 858-70.
- Korolainen MA, Goldsteins G, Nyman TA, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttila T. Oxidative modification of proteins in the frontal cortex of alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 42-53.
- Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C. Frontotemporal lobar degeneration: Current concepts in the light of recent advances. *Brain Pathol* 2007; 17: 104-14.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1121-59.
- Liem RK, Messing A. Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 1814-24.
- Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009; 674: 137-47.
- Litvan I, Mega MS, Cummings JL, Fairbanks L. Neuropsychiatric aspects of progressive supranuclear palsy. *Neurology* 1996; 47: 1184-9.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 1942-50.
- Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1094-7.
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45: 1594-601.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Lowy J RM. Frontotemporal lobar degeneration. In: Dickson D, editor. Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders. Basel: ISN Neuropath Press, 2003 p.342-347.
- Mackenzie IR. The neuropathology of FTD associated With ALS. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2007a Oct-Dec;21(4):S44-9.
- Mackenzie IR, Rademakers R. The molecular genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: recent developments. *Neurogenetics.* 2007b Nov;8(4):237-48. Epub 2007 Sep 6.
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H i col. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol.* 2007c May;61(5):427-34.
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE i col. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol.* 2009 Jan;117(1):15-8. Epub 2008 Nov 18.
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE i col. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):1-4. Epub 2009 Nov 19.
- Maines MD. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988; 2: 2557-68.
- Major DE, Kesslak JP, Cotman CW, Finch CE, Day JR. Life-long dietary restriction attenuates age-related increases in hippocampal glial fibrillary acidic protein mRNA. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 523-6.
- Markesbery WR. The role of oxidative stress in alzheimer disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 1449-52.
- Markesbery WR, Lovell MA. Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2007; 64: 954-6.
- Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 1984; 222: 649-55.
- Marlatt MW, Lucassen PJ, Perry G, Smith MA, Zhu X. Alzheimer's disease: Cerebrovascular dysfunction, oxidative stress, and advanced clinical therapies. *J Alzheimers Dis* 2008; 15: 199-210.
- Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 278-94.
- Mazanetz MP, Fischer PM. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 464-79.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: A brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 139-42.
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: Report of the work group on frontotemporal dementia and pick's disease. *Arch Neurol* 2001; 58: 1803-9.
- Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003; 22: 5734-54.
- Mirra SS, Murrell JR, Gearing M, Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA i col. Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 335-45.
- Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int* 1999; 55: 389-99.
- Monnier VM. Intervention against the maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 1-15.
- Mooradian AD, Chung HC, Shah GN. GLUT-1 expression in the cerebra of patients with alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 469-74.
- Morris HR, Gibb G, Katzenschlager R, Wood NW, Hanger DP, Strand C, Lashley T, Daniel SE, Lees AJ, Anderton BH, Revesz T. Pathological, clinical and genetic heterogeneity in progressive supranuclear palsy. *Brain* 2002; 125: 969-75.
- Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 11-22.
- Muntane G, Dalfo E, Martinez A, Rey MJ, Avila J, Perez M, Portero M, Pamplona R, Ayala V, Ferrer I. Glial fibrillary acidic protein is a major target of glycoxidative and lipoxidative damage in pick's disease. *J Neurochem* 2006; 99: 177-85.
- Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000; 346 Pt 1: 1-8.
- Nabeshi H, Oikawa S, Inoue S, Nishino K, Kawanishi S. Proteomic analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res* 2006; 40: 1173-81.
- Nasreddine ZS, Loginov M, Clark LN, Lamarche J, Miller BL, Lamontagne A, Zhukareva V, Lee M-Y V, Wilhelmsen KC, Geschwind D-H. From genotype to phenotype: A clinical pathological, and biochemical investigation of frontotemporal dementia and parkinsonism (FTDP-17) caused by the P301L tau mutation. *Ann Neurol* 1999; 45: 704-15.
- Navarro A. Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 37-48.
- Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S i col. Frontotemporal lobar degeneration: A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51: 1546-54.
- Neary D, Snowden J, Mann D. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2005; 4: 771-80.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 6-20.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT i col. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130-3.
- Neumann M. Molecular Neuropathology of TDP-43 Proteinopathies. *Int J Mol Sci.* 2009 Jan;10(1):232-46. Epub 2009 Jan 9.
- Newman SF, Sultana R, Perluigi M, Coccia R, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, Butterfield DA. An increase in S-glutathionylated proteins in the alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach. *J Neurosci Res* 2007; 85: 1506-14.
- Nielsen AL, Holm IE, Johansen M, Bonven B, Jorgensen P, Jorgensen AL. A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP epsilon, interacts with the presenilin proteins. *J Biol Chem* 2002; 277: 29983-91.
- Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1119S-24S.
- Odetti P, Garibaldi S, Norese R, Angelini G, Marinelli L, Valentini S, Menini S, Traverso N, Zaccheo D, Siedlak S, Perry G, Smith MA, Tabaton M. Lipoperoxidation is selectively involved in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 393-7.
- Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 1987; 262: 5488-91.
- Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 2001; 357: 241-7.
- Oshino N, Oshino R, Chance B. The characteristics of the "peroxidatic" reaction of catalase in ethanol oxidation. *Biochem J* 1973; 131: 555-63.
- Pamplona R, Dalfo E, Ayala V, Bellmunt MJ, Prat J, Ferrer I, Portero-Otín M. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. effects of alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem* 2005; 280: 21522-30.
- Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777: 1249-62.
- Papp E, Nardai G, Soti C, Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors* 2003; 17: 249-57.
- Pappolla MA, Chyan YJ, Poeggeler B, Frangione B, Wilson G, Ghiso J, Reiter RJ. An assessment of the antioxidant and the antiamyloidogenic properties of melatonin: Implications for alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2000; 107: 203-31.
- Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 2004; 204: 428-37.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; 50: 427-34.
- Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Cini C, De Marco C, Butterfield DA. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: A model of huntington disease. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1849-61.
- Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 937-45.
- Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J, Vulpe CD. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 2008; 8: 1744-9.
- Pietrini P, Alexander GE, Furey ML, Hampel H, Guazzelli M. The neurometabolic landscape of cognitive decline: In vivo studies with positron emission tomography in alzheimer's disease. *Int J Psychophysiol* 2000; 37: 87-98.
- Polidori MC, Mecocci P, Browne SE, Senin U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA in huntington's disease parietal cortex. *Neurosci Lett* 1999; 272: 53-6.
- Poon HF, Castegna A, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB, Butterfield DA. Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience* 2004; 126: 915-26.
- Poon HF, Vaishnav RA, Getchell TV, Getchell ML, Butterfield DA. Quantitative proteomics analysis of differential protein expression and oxidative modification of specific proteins in the brains of old mice. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 1010-9.
- Preece P, Cairns NJ. Quantifying mRNA in postmortem human brain: Influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 118: 60-71.
- Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2002; 2: 3-10.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991; 266: 22028-34.
- Rampello L, Butta V, Raffaele R, Vecchio I, Battaglia G, Cormaci G, Alvano A. Progressive supranuclear palsy: A systematic review. *Neurobiol Dis* 2005; 20: 179-86.
- Reed LA, Wszolek ZK, Hutton M. Phenotypic correlations in FTDP-17. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 89-107.
- Reed T, Perluigi M, Sultana R, Pierce WM, Klein JB, Turner DM, Coccia R, Markesbery WR, Butterfield DA. Redox proteomic identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified brain proteins in amnesic mild cognitive impairment: Insight into the role of lipid peroxidation in the progression and pathogenesis of alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2008a; 30: 107-20.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Reed TT, Pierce WM, Jr, Turner DM, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of nitrated brain proteins in early alzheimer's disease inferior parietal lobule. *J Cell Mol Med* 2008b.
- Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 69-74.
- Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 2000; 23: 209-16.
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* 1989; 52: 515-20.
- Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 116-27.
- Rodriguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A. Astroglia in dementia and alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 2009; 16: 378-85.
- Rohrdanz E, Schmuck G, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch Toxicol* 2001; 75: 150-8.
- Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004 Jul;10 Suppl:S10-7.
- Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 891-8.
- Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovì B, Rossi CA, Toninello A. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem* 2007; 282: 24407-15.
- Sampathu DM, Neumann M, Kwong LK, Chou TT, Micsenyi M, Truax A, Bruce J, Grossman M, Trojanowski JQ, Lee VM. Pathological heterogeneity of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions delineated by ubiquitin immunohistochemistry and novel monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 2006; 169: 1343-52.
- Santacruz P, Uttl B, Litvan I, Grafman J. Progressive supranuclear palsy: A survey of the disease course. *Neurology* 1998; 50: 1637-47.
- Santpere G, Puig B, Ferrer I. Low molecular weight species of tau in alzheimer's disease are dependent on tau phosphorylation sites but not on delayed post-mortem delay in tissue processing. *Neurosci Lett* 2006; 399: 106-10.
- Santpere G, Puig B, Ferrer I. Oxidative damage of 14-3-3 zeta and gamma isoforms in alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Neuroscience* 2007; 146: 1640-51.
- Santpere G, Ferrer I. Delineation of early changes in cases with progressive supranuclear palsy-like pathology. astrocytes in striatum are primary targets of tau phosphorylation and GFAP oxidation. *Brain Pathol* 2009; 19: 177-87.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Schlesinger I, Schlesinger N. Uric acid in parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; 23: 1653-7.
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: A cross-sectional study. *Lancet* 1999; 354: 1771-5.
- Schroeter ML, Mertsch K, Giese H, Muller S, Sporbert A, Hickel B, et al. Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *FEBS Lett* 1999; 449: 241-4.
- Schweitzer K, Decker E, Zhu L, Miller RE, Mirra SS, Spina S, Ghetti B, Wang M, Murrell J. Aberrantly regulated proteins in frontotemporal dementia. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 465-72.
- Shelton SB, Johnson GV. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *J Neurochem* 2004; 88: 1313-26.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T i col. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res*. 2001 Oct 26;917(1):97-104.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213-9.
- Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1315S-21S.
- Siew LK, Love S, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ. Measurement of pre- and post-synaptic proteins in cerebral cortex: Effects of post-mortem delay. *J Neurosci Methods* 2004; 139: 153-9.
- Skoglund L, Brundin R, Olofsson T, Kalimo H, Ingvast S, Blom ES, Giedraitis V, Ingelsson M, Lannfelt L, Basun H, Glaser A. Frontotemporal dementia in a large swedish family is caused by a progranulin null mutation. *Neurogenetics* 2009; 10: 27-34.
- Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 151-70.
- Skulachev VP. Why are mitochondria involved in apoptosis? permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 1996; 397: 7-10.
- Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1998 Oct;44(4):696-9.
- Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of huntington disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 667-78.
- Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1998; 21: 428-33.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Spillantini MG, Van Swieten JC, Goedert M. Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Neurogenetics* 2000; 2(4), 193-205.
- Spiteller G. Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 362-87.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R i col. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* 2000; 275: 41340-9.
- Stadler F, Kolb G, Rubusch L, Baker SP, Jones EG, Akbarian S. Histone methylation at gene promoters is associated with developmental regulation and region-specific expression of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in human brain. *J Neurochem.* 2005 Jul;94(2):324-36.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 2006; 40: 1250-8.
- Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 207-18.
- Stamelou M, Pilatus U, Reuss A, Magerkurth J, Eggert KM, Knake S, Ruberg M, Schade-Brittinger C, Oertel WH, Höglinger GU. In vivo evidence for cerebral depletion in high-energy phosphates in progressive supranuclear palsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 861-70.
- Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 217-30.
- Sultana R, Newman SF, Abdul HM, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, Butterfield DA. Protective effect of D609 against amyloid-beta₁₋₄₂-induced oxidative modification of neuronal proteins: Redox proteomics study. *J Neurosci Res* 2006a; 84: 409-17.
- Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Merchant M, Markesbery WR, Butterfield DA. Redox proteomics identification of oxidized proteins in alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: An approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging* 2006b; 27: 1564-76.
- Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR, Zhou XZ, Lu KP, Butterfield DA. Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging* 2006c; 27: 918-25.
- Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Oxidatively modified proteins in alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: Role of abeta in pathogenesis. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 131-50.
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002; 296: 1991-5.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Terni B, Boada J, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I. Mitochondrial ATP-synthase in the entorhinal cortex is a target of oxidative stress at stages I/II of alzheimer's disease pathology. *Brain Pathol* 2009.
- Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM, King CC. Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. formation of bromamines. *J Biol Chem* 1995; 270: 2906-13.
- Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. *Amino Acids* 2003; 25: 275-81.
- Togo T, Dickson DW. Tau accumulation in astrocytes in progressive supranuclear palsy is a degenerative rather than a reactive process. *Acta Neuropathol* 2002; 104: 398-402.
- Tokoyuni S, Uchida K, Okamoto K, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Stadtman ER. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubes of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; 91:7:2126-2620.
- Tolnay M, Probst A. The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies. *IUBMB Life* 2003; 55: 299-305.
- Traber MG, Sies H. Vitamin E in humans: Demand and delivery. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 321-47.
- Tsuboi Y. Neuropathology of familial tauopathy. *Neuropathology* 2006; 26: 471-4.
- Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* 1999; 274: 2234-42.
- Uchida K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* 2003a; 25: 249-57.
- Uchida K. 4-hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003b; 42: 318-43.
- Vaishnav RA, Getchell ML, Poon HF, Barnett KR, Hunter SA, Pierce WM, Klein JB, Butterfield DA, Getchell TV. Oxidative stress in the aging murine olfactory bulb: Redox proteomics and cellular localization. *J Neurosci Res* 2007; 85: 373-85.
- Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 112-24.
- Vassiliev V, Harris ZL, Zatta P. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 49: 633-40.
- Vlassara H, Palace MR. Glycoxidation: The menace of diabetes and aging. *Mt Sinai J Med* 2003; 70: 232-41.
- Wainwright PE. Dietary essential fatty acids and brain function: A developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 61-9.

VIII.BIBLIOGRAFIA

- Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: What will they think of next? *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 467.
- Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 295-332.
- Wang IF, Wu LS, Chang HY, Shen CK. TDP-43, the signature protein of FTLD-U, is a neuronal activity-responsive factor. *J Neurochem*. 2008 May;105(3):797-806. Epub 2007 Dec 15.
- Wentrup C. Radical chemistry. from reactive intermediates to stable compounds. *Science* 2002; 295: 1846-7.
- Woulfe J. Nuclear bodies in neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 2195-206.
- Wszolek ZK, Tsuboi Y, Ghetti B, Pickering-Brown S, Baba Y, Cheshire WP. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1: 30.
- Wu KH, Penfold PL, Billson FA. Effects of post-mortem delay and storage duration on the expression of GFAP in normal human adult retinae. *Clin Experiment Ophthalmol* 2002; 30: 200-7.
- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Brain Res Brain Res Protoc* 2001; 8: 212-8.
- Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: Possible health implications. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18: 383-99.
- Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 293-303.