

γ Glutamyltransferasi e stress ossidativo

Irene Fornaciari¹, Maria Franzini¹, Aldo Paolicchi²

¹Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa;

²Dipartimento di Patologia Sperimentale B.M.I.E., Università di Pisa

RIASSUNTO Recenti studi hanno messo in evidenza il ruolo pro-ossidante svolto dalle specie molecolari originate durante il catabolismo del glutatione (GSH) mediato dalla γ GT, un enzima normalmente presente nel siero e sulla superficie della membrana plasmatica di alcuni tipi cellulari. La riduzione del ferro da parte dei cataboliti del GSH è capace di indurre l'inizio di processi ossido-riduttivi che portano alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e altri radicali liberi, i quali possono produrre modificazioni ossidative su una varietà di bersagli molecolari, che coinvolgono in primo luogo l'ossidazione e/o S-tiolazione di gruppi tiolici delle proteine di membrana. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dalle reazioni GSH/ γ GT dipendenti inoltre possono indurre la perossidazione lipidica e stimolare l'ossidazione delle lipoproteine LDL che hanno un ruolo centrale nell'aterogenesi e nel danno vascolare. In aggiunta l'attività di γ GT di membrana promuove l'assorbimento cellulare dell'acido ascorbico (AA) in cellule di melanoma (dove la γ GT è espressa ad alti livelli). Per quanto riguarda la γ GT presente nel plasma, si sa che è da tempo utilizzata come marcatore di patologie epatiche e di eccessivo abuso di alcool. Recenti studi epidemiologici hanno suggerito una correlazione positiva tra livelli di γ GT, nell'intervallo fisiologico, con marcatori molecolari di infiammazione e stress ossidativo (F2-isoprostani, Proteina C reattiva, etc.).

Parole chiave: γ Glutamyltransferasi, Glutatione, Stress ossidativo, Specie reattive dell'ossigeno, Perossidazione lipidica

ABSTRACT **Glutamyltransferase and oxidative stress** Recent studies have provided evidence for the prooxidant roles played by molecular species originating during the catabolism of glutathione (GSH) effected by γ GT, an enzyme normally present in serum and on the outer surface of numerous cell types. The reduction of metal ions by GSH catabolites is capable of inducing the redox cycling processes, leading to the production of reactive oxygen species and other free radicals. Through the action of these reactive compounds, cell membrane γ GT activity can ultimately produce oxidative modifications on a variety of molecular targets, involving oxidation and/or S-thiolation of protein thiol groups in the first place. It is widely recognized that pro-oxidants can play a modulatory role on the transduction of proliferative/ apoptotic signals, due to their ability to interact with redox-sensitive regions of growth factor receptors, protein kinases and transcription factors. Membrane γ GT activity (often expressed at high levels in human malignancies) can oxidize extracellular ascorbic acid (AA), an antioxidants in scavenging reactive oxygen species (ROS) and as an important cofactors in various enzymatic reactions, and promote its uptake. Redox cycling of iron is also a recognized factor in initiation of lipid peroxidation. Accordingly, GSH/ γ GT dependent iron reduction was repeatedly shown to result in the promotion of lipid peroxidation, in several distinct experimental models furthermore γ GT/GSH-dependent iron reduction was also found to stimulate GSH/iron-dependent LDL oxidation that it has a central role in atherogenesis and vascular damage, thus supposing potential role of γ GT in pathogenesis of atherosclerosis. As regards plasmatic γ GT, the relationship with γ GT binding plasmatic membrane is not known yet, now we know that it is a marker of liver diseases and abuse of alcohol. Recent epidemiological studies have suggested a positive correlation between level of γ GT in normal range with molecular marker of inflammation and oxidative stress (F2-isoprostan, reactive protein C, etc.).

Key words: γ Glutamyltransferase, Glutathione, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Lipid peroxidation

INTRODUZIONE

In questi ultimi dieci anni sono state accumulate molte prove riguardo al numero di funzioni cellulari che possono essere modulate da agenti pro-ossidanti (ROS) a concentrazioni considerevolmente più basse di quelle capaci di indurre danno ossidativo. Così gli agenti pro-ossidanti non possono più essere considerati semplicemente come specie che recano un danno a livello cellulare, ma la loro azione biologica deve essere inquadrata in un contesto più ampio, che includa anche il ruolo degli agenti antiossidanti.

Il GSH (forse il principale antiossidante cellulare conosciuto) sembra essere l'esempio ideale per illustrare questa prospettiva. La presenza del gruppo tiolico della cistei-

na conferisce al GSH proprietà antiossidanti che gli permettono di interagire con specie reattive dell'ossigeno o con altre sostanze elettrofile nell'ambito di numerosi sistemi antiossidanti intracellulari. D'altra parte, il GSH ha anche funzioni non-antiossidanti come la modulazione della proliferazione cellulare, la risposta immunitaria e la neurotrasmissione. Per completare questo quadro, studi recenti hanno messo in evidenza gli effetti pro-ossidanti del GSH extracellulare, che possono derivare dal suo catabolismo mediato dall'enzima di membrana γ GT (EC 2.3.2.2).

Infatti, è stato dimostrato che durante il catabolismo del GSH sono prodotte specie pro-ossidanti (come anione superossido, perossido di idrogeno e radicali generati dal gruppo SH), come risultato dell'interazione dei metaboliti

del GSH (in primo luogo cisteinil-glicina) con metalli di transizione come il ferro presenti in tracce nell'ambiente cellulare.

GENERAZIONE DI ROS E ALTRI RADICALI LIBERI MEDIATA DALLA γ GT (AZIONE PRO-OSSIDANTE)

La γ GT è una glicoproteina dimerica sintetizzata da un unico propeptide¹ che viene scissa in 2 subunità mature, una pesante (55-62 KDa) e una leggera (20-30 KDa), prima di raggiungere la membrana plasmatica^{2,3}; la subunità leggera, che presenta un dominio carbossi-terminale con attività catalitica, è unita alla subunità pesante mediante interazioni elettrostatiche⁴; sulla porzione amino-terminale della catena pesante è presente un dominio idrofobico che permette l'inserzione dell'enzima sul lato esterno della membrana cellulare, in questo modo entrambe le subunità risultano in contatto con l'ambiente extracellulare³.

L'enzima γ GT, che normalmente è presente sia nel siero come sulla membrana plasmatica di molti tipi cellulari, catalizza il primo passaggio di degradazione del GSH extracellulare, in particolare l'idrolisi del legame gammaglutammilico tra glutammato e cisteina⁵. In questo modo viene rilasciato il dipeptide cisteinil-glicina, che è successivamente scisso in cisteina e glicina dall'attività delle dipeptidasi di membrana.

Le prime evidenze sperimentali di una possibile funzione pro-ossidante della γ GT risalgono a esperimenti condotti *in vitro* in cui viene descritta la capacità della γ GT di determinare la produzione di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno, che a loro volta producono ossidazione delle proteine e la perossidazione dei lipidi poliinsaturi della membrana plasmatica.

Questi eventi, che possono innescarsi esclusivamente all'esterno della membrana plasmatica, ma le cui conseguenze si ripercuotono su tutta la cellula, sono basati sulla capacità dei tioli, come il GSH, ma anche dei prodotti derivanti dalla sua idrolisi ad opera della γ GT, quali la cisteinil-glicina e la cisteina, di interagire con i metalli di transizione, ed in particolare con il Fe^{3+} ⁶ (Fig. 1). Infatti, la disso-

ciazione del gruppo tiolico $-SH$ ad anione tiolato $-S^-$ consente la cessione, da parte di quest'ultimo, di un elettrone al Fe^{3+} , che viene ridotto a Fe^{2+} , dando luogo contemporaneamente alla formazione di un radicale tiile $-S^{\cdot}$.

Il radicale tiile e il Fe^{2+} sono in grado di innescare una successione di eventi che portano alla produzione di anione superossido e quindi di acqua ossigenata per azione dell'enzima superossido dismutasi. L'anione superossido e l'acqua ossigenata, in presenza di Fe^{3+} , libero (reazione di Fenton) o chelato all'ADP (reazione di Haber-Weiss), possono generare radicali idrossili che insieme al radicale tiile danno inizio alle reazioni a catena della perossidazione lipidica, con conseguente perdita della struttura e della stabilità della membrana cellulare, nonché delle sue importanti funzioni⁷.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DI γ GT IN CAMPIONI BIOLOGICI

Procedura biochimica per la determinazione dell'attività di γ GT solubile e legata alla membrana plasmatica

Sebbene il substrato fisiologico della γ GT sia il GSH, l'attività di γ GT è di solito determinata mediante l'idrolisi del substrato sintetico γ -glutammi-p-nitroanilide (GPNA). In seguito all'azione enzimatica viene rilasciato il prodotto p-nitroanilina (coefficiente di estinzione molare 9200), che presenta un picco di assorbanza intorno a 380 nm⁸.

Per la determinazione dell'attività dell'enzima γ GT solubile presente nel plasma, 50 μ l di campione sono aggiunti a 1 mL di GPNA 4,6 mM (in tampone Tris-HCl 0,1M pH 7,8 contenente di e 10 mM di $MgCl_2$). La reazione viene fatta iniziare aggiungendo 100 μ l di glicil-glicina 575mM a pH 7,8 come accettore della reazione di transpeptidazione. La soluzione ottenuta è incubata a 37°C e la reazione è monitorata spettrofotometricamente a 405 nm contro un bianco appropriato. L'attività è espressa in U/L, un'unità di attività enzimatica essendo definita come la quantità di enzima che può catalizzare l'idrolisi di un μ mol di substrato al minuto.

Per la determinazione dell'attività di γ GT legata alla

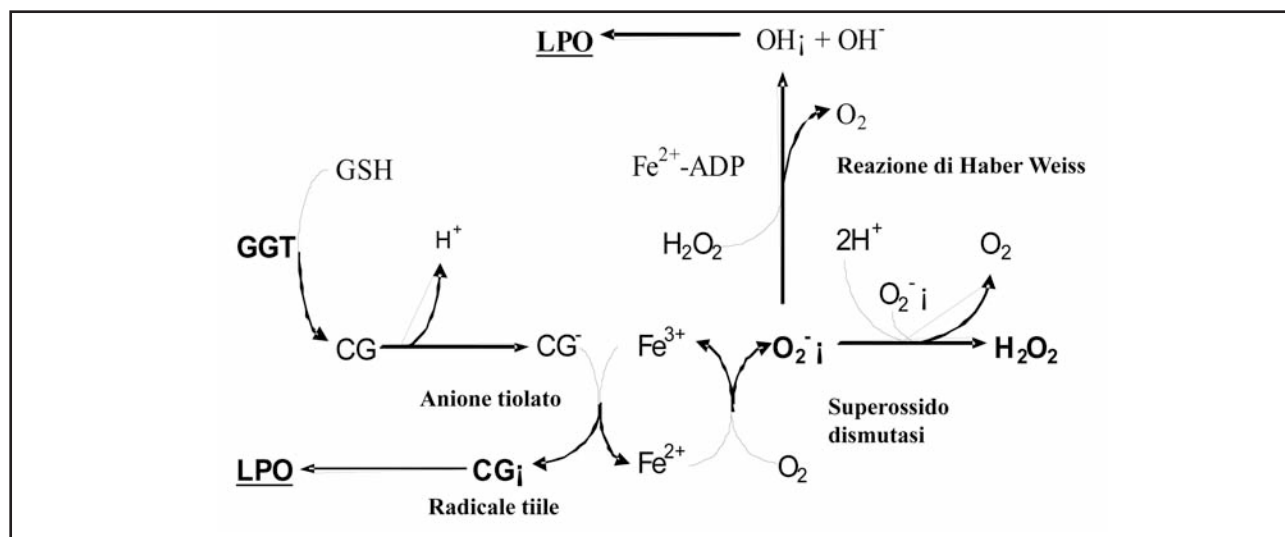


Figura 1
Reazioni pro-ossidanti conseguenti all'attività della γ GT⁷

membrana plasmatica viene usato lo stesso procedimento con un passaggio aggiuntivo per la preparazione delle cellule. Le cellule sono infatti lavate con il tampone-fosfato di Dulbecco, risospese in Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) e successivamente omogeneizzate e centrifugate per separare le cellule intatte e i nuclei. I precipitati ottenuti sono risospesi e utilizzati per la determinazione cinetica. La stessa procedura può essere usata per la determinazione dell'attività di γ GT in omogenati di tessuti, anche se la lettura può essere complicata dalla torbidità del campione.

DETERMINAZIONE FLUORIMETRICA DELLA PRODUZIONE DEL PEROSSIDO DI IDROGENO PER DIMOSTRARE LA PRODUZIONE DI ROS DA PARTE DELLA γ GT

Tra le numerose procedure biochimiche, i metodi fluorimetrici sono i più adatti per la determinazione dell' H_2O_2 prodotto da cellule viventi in coltura.

Buoni risultati sono stati ottenuti con i metodi fluorimetrici utilizzando la perossidasi di rafano (HRP), che riduce H_2O_2 presente nel campione e in concomitanza ossida un donatore di idrogeno fluorescente (scopoletina)^{8,9}. Tale metodo è basato sul monitoraggio della diminuzione della fluorescenza della scopoletina durante la sua ossidazione catalizzata dalla HRP di tipo II (EC 1.11.1.7)¹⁰.

Le cellule sono poi incubate a 37°C in presenza di substrati della γ GT (GSH e glicil-glicina, e.g., 0.1 and 1 mM, rispettivamente) e possono includere specifici inibitori (AT125; complessi acido borico/serina), come agenti antios-

sidanti (Fig. 2). La scopoletina può essere sostituita con altre sonde [e.g., N-acetil-3,7-diidrossifenoxazine, A6550; sonde molecolari, Eugene, 50mM conc.finale; (OR, USA)]¹¹.

BERSAGLI MOLECOLARI DELLE REAZIONI PRO-OSSIDANTI GSH/ γ GT DIPENDENTI

Azione modulatoria della γ GT sui gruppi tiolici delle proteine

L'azione pro-ossidante GSH/ γ GT dipendente può interferire con lo stato ossido-riduttivo dei gruppi tiolici delle proteine di membrana. Infatti queste sono il bersaglio primario delle molecole pro-ossidanti generate extracellularmente dall'azione della γ GT. L'ossidazione dei gruppi sulfidrilici delle proteine è infatti aumentato in seguito alla stimolazione dell'attività di γ GT mentre il processo è prevenuto dalla sua inibizione¹². Il coinvolgimento dell' H_2O_2 nel processo è indicato dal fatto che l'ossidazione dei gruppi tiolici delle proteine è significativamente inibita dalla catalasi, mentre un decremento della riduzione dei gruppi tiolici delle proteine può essere ottenuto mediante l'inibizione della γ GT con l'aggiunta di acivicina.

L'ossidazione dei tioli proteici della superficie cellulare non sembra essere dovuta alla sola interazione dell' H_2O_2 , prodotta dall'attività della γ GT, con i gruppi tiolici delle proteine^{13,14}, ma è anche legata a processi di S-tiolazione proteica promossi dalla γ GT.

Il glutatione disolfuro (GSSG) che si accumula in seguito a condizioni di elevata attività di γ GT, può interagire con i residui di cisteina delle proteine: si formano in que-

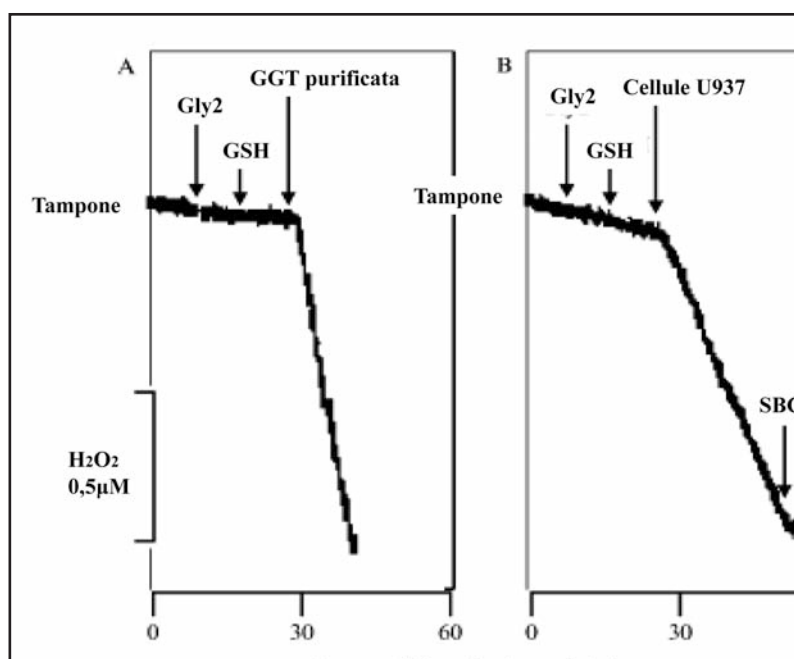


Figura 2

Produzione di perossido di idrogeno GSH- and γ GT -dipendente. Diminuzione della fluorescenza di scopoletina in presenza della perossidasi di rafano^a

^aLe linee verticali indicano la diminuzione della fluorescenza corrispondenti alle concentrazioni di H_2O_2 0,5 μ M, come stabilito da esperimenti preliminari di calibrazione usando standard in diluizioni scalari. (A) Produzione di H_2O_2 dopo l'aggiunta di γ GT purificata (corrispondente a un'attività enzimatica di 18mU/mL) a una soluzione tampone di Hank contenente il substrato GSH (100 μ M) e il gamma-glutammina-accettore glicil-glicina (gly2, 1mM); (B) Produzione di H_2O_2 dopo l'aggiunta di una quantità equivalente di attività di γ GT legata alla membrana plasmatica, espressa sulla superficie di cellule U937 di linfoma istiocitico (3x10⁶/mL); Il fenomeno viene inibito con l'aggiunta di un inibitore competitivo della γ GT, complesso acido borico/serina (SBC, 10/20 mM conc. finale)¹¹

sto modo dei disolfuri misti tra il glutatone e i gruppi tiolici delle proteine. Il processo, definito S-glutatioilazione, può essere così schematizzato:



Poiché anche altri tioli non proteici, a basso peso molecolare, come cisteina, omocisteina e cisteamina, possono partecipare a questo processo, si parla più in generale di S-tiolazione.

Un numero sempre maggiore di molecole è riconosciuto essere modulato tramite S-tiolazione, sia proteine di membrana che proteine citosoliche¹⁵. La S-glutatioilazione può, infatti, interessare componenti cellulari implicati nella trasduzione di segnali implicati nella proliferazione cellulare, come H-ras¹⁶, la chinasi p59 delle cellule T¹⁷, la fosfatasi *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTPB)¹⁸, c-jun¹⁹, il fattore di trascrizione *nuclear factor kappa-B* (NF-kB)²⁰ e la caspasi 3, implicata in processi apoptotici²¹. I residui di cisteina, presenti sul dominio di legame al DNA di p53 possono subire modificazioni derivanti dall'ossidazione, con specifici effetti sulla capacità di legare il DNA²².

In maniera del tutto analoga anche la cisteinil-glicina originatasi dal catabolismo del GSH ad opera della γ GT può concorrere alla formazione di ponti disolfuro con le proteine^{23,24}.

La S-cisteinil-glicilazione così come la S-tiolazione può assumere due significati. In primo luogo, la trasformazione dei gruppi SH derivanti dall'ossidazione può essere interpretata come un meccanismo di difesa nei confronti dei danni ossidativi irreversibili.²⁵⁻²⁷ In quest'ottica, essendo la γ GT espressa ad alti livelli sia nei tumori che nelle metastasi, potrebbe contribuire alla resistenza delle cellule cancerogene nei confronti degli effetti citotossici dello stress ossidativo come nel caso di molti farmaci antitumorali ad attività pro-ossidante.²⁹⁻³¹ In secondo luogo, la S-cisteinil-glicilazione può avere una funzione regolatoria. È stato osservato che, l'aumento della S-cisteinil-glicilazione comporta una diminuzione della S-glutatioilazione, ciò potrebbe essere considerato un meccanismo mediante il quale le cellule esprimono attività di γ GT, come le cellule tumorali³¹, riescono a modulare lo stato ossido-riduttivo e la funzione di proteine importanti presenti nella matrice extracellulare e sulla superficie di altri tipi cellulari, quali per es. le cellule del sistema immunitario o endoteliali²⁴.

Tecniche utilizzate per dimostrare l'ossidazione dei gruppi tiolici delle proteine indotta dalla γ GT

L'attività di γ GT è orientata verso proteine presenti sulla superficie cellulare; reazioni pro-ossidanti originate dal metabolismo del GSH mediate dalla γ GT coinvolgono in primo luogo le proteine presenti sulla superficie cellulare. Una valutazione quantitativa dello stato ossido-riduttivo dei gruppi tiolici delle proteine di membrana può essere ottenuto mediante saggio ELISA, utilizzando l'enzima perossidasi maleimide attivo e il suo substrato o-fenilene -diaminodichloride (Sigma Fast tablet sets; SIGMA, Milano)⁹.

Un metodo più dettagliato per valutare lo stato ossido-riduttivo dei gruppi tiolici delle proteine presenti sulla superficie cellulare è stato ottenuto con la procedura SH-biotinilato/immunoblot/Elettrochemiluminescenza⁸. Dopo trattamenti sperimentali, che prevedono l'inibizione o la sti-

molazione della γ GT, le cellule sono esposte al marcatore di tioli N-(Biotinil)-N'-(iodoacetil)etilene diamine (BIA, sonde molecolari; Eugene; OR, USA) che non attraversa la cellula. Le cellule successivamente lisate con un tampone di lisi (0,5% v/v TritonX-100, 5mM Tris, 20mM EDTA, 50mM NEM pH 8,0) vengono usate per separare le proteine cellulari mediante SDS-PAGE 10%. Tali condizioni di separazioni sono adatte per ottenere informazioni sullo stato ossido-riduttivo di proteine presenti sulla superficie cellulare. Le bande di proteine marcate con BIA, ottenute in seguito alla separazione elettroforetica, indicano la presenza di tioli proteici ridotti rivelate mediante l'esposizione a streptavidina-perossidasi coniugata (Roche, Milano).

Altri importanti bersagli molecolari dell'azione pro-ossidante della γ GT

Il complesso proteico NF-kB è un fattore di trascrizione ubiquitario implicato nella regolazione di un ampio numero di geni che controllano vari aspetti delle risposte immunitarie ed infiammatorie³³. Diverse sono le evidenze sperimentali che hanno verificato una modulazione cellulo-specifica dell'attività di questo fattore di trascrizione in relazione all'attività di γ GT. Nella linea cellulare V79- γ GT di fibroblasti polmonari di criceto, trasfettata per l'espressione costitutiva di γ GT umana³³, è stato dimostrato che la produzione di ROS, ed in particolare di H₂O₂, inducono sia la traslocazione del fattore NF-kB nel nucleo sia il suo legame col DNA³⁴. Ulteriori studi su cellule di melanoma umano Me665/2/60 hanno dimostrato che la stimolazione dell'attività dell'enzima, o la sua inibizione, determinano rispettivamente la stimolazione o l'inibizione della traslocazione nucleare di NF-kB⁹. L'aumentata traslocazione conseguente alla stimolazione dell'attività dell'enzima, ottenuta fornendo GSH e cys-gly come substrati, è tuttavia accompagnata da un diminuito legame di NF-kB al DNA. Questo è stato interpretato come un possibile meccanismo di regolazione contro una eccessiva attivazione di NF-kB in condizioni di persistente stress ossidativo³⁵.

Altre evidenze sperimentali hanno mostrato che l'attività di γ GT è in grado di promuovere il legame di *activator protein 1* (AP-1) al DNA; l'acivicina, ma anche altri inibitori della attività di γ GT, sopprimono questo effetto a conferma del coinvolgimento dell'enzima³⁶.

Parallelamente, altri studi sono stati indirizzati a stabilire come la formazione di disolfuri misti, attraverso le reazioni di S-tiolazione, possa modulare l'attività di proteine di membrana e recettori.

Il *tumor necrosis factor receptor 1* (TNFR-1) è un recettore che presenta, nel dominio extracellulare alcuni motivi ricchi in cisteine; è stato dimostrato che alcuni di questi motivi sono direttamente coinvolti nel legame con il *tumor necrosis factor- α* (TNF α)³⁷. Ciò suggerisce che lo stato ossido-riduttivo delle cisteine presenti sul TNFR-1 possa influenzare l'affinità di legame del TNF α al recettore e di conseguenza le risposte cellulari a questa citochina.

La possibile modulazione del TNFR-1 da parte dell'attività di γ GT è stata studiata in due cloni della linea cellulare di melanoma Me665/2 caratterizzati da diversi livelli di attività enzimatica. In queste cellule sono state identificate cinque forme di TNFR-1 distinte per il grado di ossidazione dei residui di cisteina. La forma più ossidata era costitutivamente presente nel clone cellulare 2/60, caratterizzato da

un'elevata espressione di γ GT, ed era possibile osservarla nel clone 2/21 in seguito all'induzione dell'espressione dell'enzima. La modulazione del recettore TNFR-1 in seguito all'attività di γ GT potrebbe modificare l'affinità di legame del TNF α , e quindi modulare la risposta cellulare³⁸.

MODULAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE E DELL'APOPTOSI

L'apoptosi ha un importante ruolo biologico di regolazione nella maggior parte dei processi fisiologici come il differenziamento, l'omeostasi e la rimozione di cellule anormali in tutti i tessuti³⁹. Il controllo del meccanismo di morte cellulare programmata è modificato, se non addirittura eliminato, in cellule tumorali. E' nota da tempo l'interconnessione tra proliferazione cellulare, regolazione del ciclo ed apoptosi, tanto che un'alterazione del ciclo cellulare, peraltro inevitabilmente presente nelle cellule cancerose, può influenzare in maniera diretta la sensibilità della cellula agli stimoli apoptotici⁴⁰. I dati raccolti nel corso di ricerche sulla linea cellulare di carcinoma ovarico umano A2780 hanno messo in evidenza come l' H_2O_2 e l'ossidazione dei tioli, prodotti dall'attività di γ GT durante il catabolismo del GSH, svolgano una azione antiproliferativa⁴¹. D'altra parte, nella linea cellulare U937 di istiocitoma umano, l' H_2O_2 funzionerebbe come un segnale antiapoptotico, infatti, in questo secondo caso, moderate condizioni di stress ossidativo possono neutralizzare gli stimoli apoptotici mentre l'inibizione dell'attività di γ GT determina arresto della crescita, diminuzione di attività ed espressione della poli(ADP-ribosio) polimerasi, frammentazione del DNA e ingresso della cellula in apoptosi. I bassi livelli di H_2O_2 prodotti dalla γ GT sono in grado di generare una sorta di "segnale di vita" nelle cellule U937 al punto da mantenere le cellule in proliferazione e proteggerle dall'apoptosi⁴².

INTERAZIONE TRA γ GT PRESENTE SULLA MEMBRANA PLASMATICA E VITAMINA C

L'acido ascorbico (AA) gioca un ruolo essenziale negli organismi viventi come agente antiossidante nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno e come importante cofattore in varie reazioni enzimatiche⁴³. Tali funzioni fisiologiche sono legate alla interconversione tra una forma ridotta (AA) e una ossidata (acido deidroascorbico, DHA). Sono state descritte diversi enzimi con attività di deidroascorbato-reduttasi capaci di ridurre il DHA in AA, che rappresenta la forma fisiologicamente attiva della vitamina C⁴⁴.

Sono stati descritti due sistemi a livello della membrana plasmatica per il trasporto dell'AA nella cellula: il cotrasporto di AA Na⁺-dipendente e la diffusione facilitata del DHA^{45,46}. In particolare, è stato dimostrato che la vitamina C viene internalizzata da molti tipi cellulari, incluse le cellule neoplastiche, nella sua forma ossidata come DHA, mediante i trasportatori del glucosio (GLUT)⁴⁷. Una volta presente nel compartimento cellulare il DHA viene ridotto per riformare l'AA. In questo modo, il processo che porta all'ossidazione dell'AA in DHA nell'ambiente extracellulare può essere considerato un meccanismo favorente l'assorbimento e l'accumulo intracellulare della vitamina C^{47,48}.

È stato dimostrato che l'ossidazione dell'AA nell'am-

biente extracellulare può essere svolta dall'enzima di membrana γ GT che, come è stato descritto precedentemente, rappresenta una fonte di ROS e altri radicali liberi, capaci di promuovere reazioni pro-ossidanti nell'ambiente extracellulare^{49,50}.

Questo processo è stato studiato utilizzando due distinti cloni di melanoma metastatico umano. È stato osservato che il clone Me665/2/60, che esprimeva livelli elevati di attività di γ GT, era capace di determinare l'ossidazione dell'AA extracellulare, accompagnato da un marcato aumento dei livelli di AA dentro la cellula. Questo fenomeno non è stato però osservato con le cellule Me665/2/21, prive di attività di γ GT. D'altra parte, in seguito alla trasfezione delle cellule 2/21 con cDNA codificante per la γ GT è stata osservata l'ossidazione e la stimolazione dell'assorbimento di AA. Successivamente il meccanismo di ossidazione di AA mediato dalla γ GT è stato studiato in sistemi cellulari che includevano γ GT e il GSH come substrato fisiologico. Tale processo si verificava in presenza di ferro(II) e di transferrina o ferritina, due importanti risorse fisiologiche di ferro. Così l'attività di γ GT a livello della membrana plasmatica (di solito espressa ad alti livelli in cellule tumorali maligne umane) può ossidare l'AA extracellulare e promuoverne l'assorbimento cellulare⁵¹.

PEROSSIDAZIONE LIPIDICA GSH/ γ GT DIPENDENTE

La capacità della γ GT di stimolare la perossidazione lipidica a seguito del catabolismo del GSH è stata dimostrata in sistemi contenenti complessi di ioni ferrici (Fe³⁺) come catalizzatori e acido linoleico purificato come substrato perossidabile⁶. Tutti questi fenomeni, avvenendo all'esterno della cellula, sono al di fuori della portata dei sistemi di difesa in essa contenuti⁹.

Gli effetti proossidanti sono attribuiti prevalentemente alla formazione della cisteinil-glicina e cisteina che riducono il Fe³⁺ più efficientemente del GSH^{52,53,54}.

Usando molecole di GSH modificate in laboratorio, è stato dimostrato che il GSH sarebbe di per sé un riducente del complesso ADP-Fe³⁺, ma il gruppo α -carbossilico dell'acido glutammico è in grado di bloccare l'interazione tra il gruppo tiolico ed il Fe³⁺. La massima riduzione del complesso Fe³⁺-ADP da parte del GSH si osserva in una miscela nella quale sia presente anche la γ GT che, rimuovendo l'acido glutammico dal GSH, rende libero il gruppo SH della cisteinil-glicina di interagire con il Fe³⁺ (⁵⁴). Inoltre, poiché il pKa della cisteinil-glicina è più basso di quello del GSH (6,4 e 8,56 rispettivamente)⁵⁵, a pH fisiologico la cisteinil-glicina sarà prevalentemente nella forma di anione tiolato⁶.

La cisteinil-glicina è capace di ridurre il complesso ADP-Fe³⁺ più efficacemente del GSH formando Fe²⁺ nella stessa quantità osservata nella miscela contenente GSH e γ GT. Risultati simili sono stati ottenuti con la cisteina che viene prodotta dall'idrolisi della cisteinil-glicina operata dalle dipeptidasi di membrana.

L'interazione del GSH con il Fe³⁺, seppur possibile, è fortemente limitata dalle proprietà chelanti del gruppo α -carbossilico del glutammato⁵³; in accordo a quanto detto il glutatione-dimetilestere (GSH-DME), un derivato del GSH metilato sul residuo di glutammato, è in grado di promuov-

vere la riduzione del Fe³⁺ in modo analogo a quanto osservato per cisteina, cisteinil-glicina e complesso GSH- γ GT⁵⁴.

L'azione pro-ossidante della γ GT è legata alla presenza di metalli ossido riducenti (*redox*) attivi nell'ambiente extracellulare, cosa che in vivo è fortemente prevenuta grazie alla formazione di complessi quali ferritina, transferrina e ceruloplasmina che non permettono ai metalli di catalizzare reazioni con radicali liberi. A tal proposito è interessante osservare che l'attività di γ GT è in grado di ridurre e di promuovere il rilascio degli ioni ferro legati alla transferrina^{56,57} e che l'azione pro-ossidante è stata osservata anche in presenza di ceruloplasmina⁵⁸, ovvero due sorgenti fisiologiche di ioni di metalli di transizione. Inoltre il rilascio di ioni ferro dalle loro forme di immagazzinamento è stato osservato in molte condizioni fisiopatologiche, un processo questo che potrebbe rendere i metalli disponibili per promuovere l'azione pro-ossidante della γ GT³⁶.

Alcuni studi hanno evidenziato l'azione pro-ossidante svolta dalla γ GT riespressa in lesioni pre-neoplastica chimicamente indotte di fegato di ratto. Quando sezioni di fegato erano esposte al GSH, al Fe (III) chelato e alla glicil-glicina, l'attività di γ GT presente in cellule trasformate era capace di catalizzare l'inizio del processo di lipoperossidazione, che poteva essere rivelato mediante reazioni istochimiche⁵⁹. In Figura 3 sono riportati i tipici risultati ottenibili in questi sistemi, usando reazioni istochimiche NAH-FBB⁶⁰.

Studi successivi sono stati estesi su epatociti isolati vivi, in cui una significativa lipoperossidazione si è sviluppata dopo esposizione a γ GT purificata, GSH e Fe (III) chelato. Lo stesso è stato osservato in cellule di epatoblastoma HepG2, con una significativa attività intrinseca di γ GT che era capace di catalizzare l'iniziazione della perossidazione lipidica. In microsomi di fegato di ratto è stato dimostrato lo sviluppo di lipoperossidazione γ GT/GSH dipendente nonché una concomitante ossidazione dei gruppi -SH delle proteine.⁶¹ La lipoperossidazione γ GT dipendente è stata inoltre dimostrata su lipoproteine umane plasmatiche isolate.

OSSIDAZIONE DELLE LDL GSH/ γ GT DIPENDENTE, ATROSCLEROSI E PROGRESSIONE DELLA PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE

L'ossidazione delle LDL gioca un ruolo centrale nel

processo aterogenetico e nel danno vascolare. Composti tiolici come la cisteina e l'omocisteina sono conosciuti per la loro capacità di ridurre il Fe (III) e così promuovere l'ossidazione delle LDL Fe(II) dipendente⁶².

Studi preliminari istochimici hanno dimostrato la presenza di γ GT cataliticamente attiva nell'intima di lesioni aterosclerotiche umane, dove sono espresse cellule schiumose derivate da macrofagi CD60+ (Fig. 4)⁶³. Sono state inoltre trovate cellule schiumose γ GT-positive colocalizzate con LDL ossidate immunoreattive, suggerendo un possibile ruolo della γ GT nel processo di ossidazione delle LDL mediato dal ferro. Ancora più interessante, è stata anche dimostrata γ GT cataliticamente attiva in corrispondenza di microtrombi aderenti alla superficie dell'ateroma (Fig. 5).

Studi successivi sono stati dedicati a verificare la possibilità che la produzione di cisteinil-glicina mediata dalla γ GT durante il catabolismo del GSH potesse essere responsabile di un meccanismo che promuove la riduzione del ferro e perciò la perossidazione delle LDL, rappre-

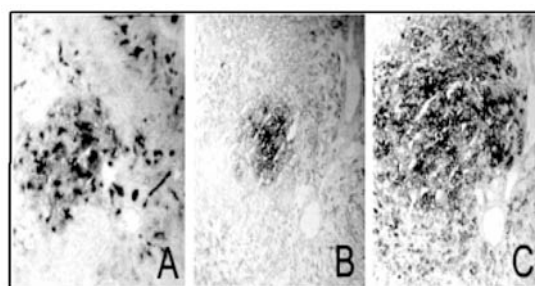


Figura 3

Selettivo coinvolgimento di epatociti γ GT -positivi nella perossidazione lipidica γ GT -dipendente.^a
 aSezioni in serie (non fissate) ottenute da fegato di ratto trattato con dietil-nitrosammina/2-acetil-aminofluorene, sacrificati alla fine di un processo di iniziazione-promozione epatocarcinogenica. (A) attività di γ GT; (B) perossidazione lipidica (reazioni istochimiche NAH-FBB); prima della colorazione la sezione era stata incubata (60min) in presenza di GSH ridotto (100 μ M) e transferrina umana (100 μ M); (C) stesso trattamento di (B), con l'aggiunta di glicil-glicina (1mM) come accettore della reazione di transpeptidazione mediata dalla γ GT; l'area coinvolta dalla lipoperossidazione è considerevolmente aumentata se paragonata a quella con solo incubazione di GSH⁶¹.

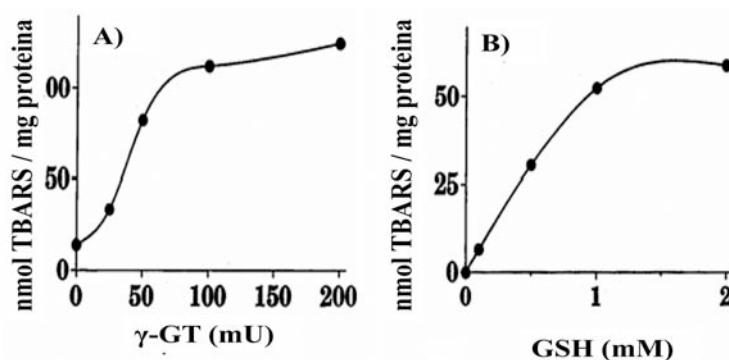


Figura 4

Colocalizzazione (freccie) di γ GT enzimaticamente attiva con elementi cellulari, (macrofagi in una placca aterosclerotica umana).^a
 a(A) reazioni istochimiche; (B) Macrofagi CD68, colorata mediante un sistema di ABC-fosfatasi. Sezioni seriali di arteria coronaria umana, ottenuta dall'autopsia di un paziente deceduto 6 ore dopo embolismo polmonare.⁶³

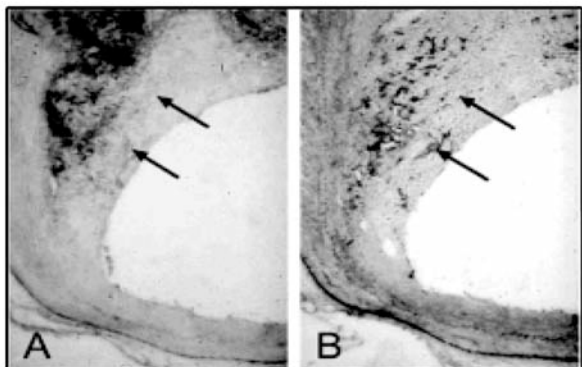


Figura 5
 γ GT cataliticamente attiva in trombi aderenti a una placca aterosclerotica umana.^a
^a(A) ematossilina/eosina; (B) reazione dell'attività di γ GT; (C) come in (B), ma incubate in presenza di un inibitore competitivo della γ GT, complesso serina/borato.

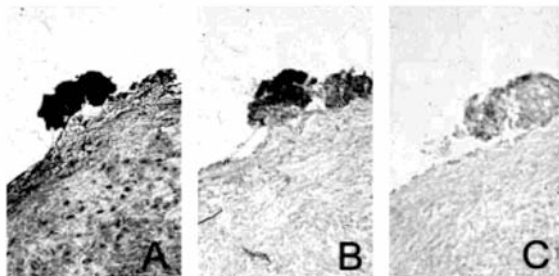


Figura 6
 Ossidazione delle LDL dipendente dal GSH e dalla γ GT.^a
^aIncubazioni (1mL di volume finale) contenenti LDL (0.1 mg prot/mL), Gly-Gly (20 mM) e ADP-Fe(III) (150 μ M ADP-15 μ M FeCl₃) in PBS pH 7.4, 37°C. A) Le reazioni sono state iniziate mediante l'aggiunta di GSH (2mM), in più aumentando le concentrazioni di γ GT. (B) La γ GT era mantenuta costante (50 mU/mL) e le reazioni sono state iniziate aggiungendo concentrazioni crescenti di GSH.⁵⁴

di ioni ferro, sia da cellule esprimenti un elevato livello di attività di γ GT sulla superficie, come ad esempio le cellule di epatoblastoma (HepG2) o le cellule monoblastoidi (U937)⁵⁴. Le cellule in questo caso possono essere considerate come sorgente sia di γ GT che di GSH, quest'ultimo infatti è normalmente rilasciato dalle cellule⁶⁴. Queste ultime due scoperte sono una prima indicazione che l'ossidazione delle LDL mediata dal sistema GSH e γ GT possa avvenire in condizioni fisiologiche (Fig. 6).

In conclusione, sia i risultati ottenuti dalle prove biochimiche che istochimiche sembrano indicare un ruolo della γ GT nel promuovere l'ossidazione delle LDL e quindi il danno vascolare. Queste osservazioni sono di particolare interesse in considerazione del fatto che evidenze epidemiologiche hanno dimostrato una possibile correlazione tra persistenti elevazioni di γ GT sierica e mortalità per patologie cardiache ischemiche^{63,65}.

LA γ GT PLASMATICA E' UN MARCATORE DI STRESS OSSIDATIVO?

Le evidenze sperimentali descritte precedentemente

hanno permesso di descrivere un nuovo aspetto del metabolismo del GSH, in particolare le interazioni ossido-riduttive che coinvolgono i suoi metaboliti originati dall'azione della γ GT presente sulla membrana plasmatica. Con la mediazione del ferro (o di altri metalli di transizione) il catabolismo del GSH porta alla formazione di ROS e radicali liberi, la cui principale azione pro-ossidante è riscontrabile sui gruppi tiolici delle proteine. Questi processi sembrano coinvolgere una varietà di bersagli molecolari, che includono importanti elementi coinvolti nella trasduzione dei segnali cellulari.

Per quanto riguarda la γ GT plasmatica, la relazione esistente tra questa e la γ GT cellulare non è ancora ben conosciuta. L'attività di γ GT plasmatica è da tempo utilizzata come marcatore di disfunzione epatica e di abuso di alcool; recenti studi epidemiologici suggeriscono anche una correlazione positiva tra livelli di γ GT, nell'intervallo fisiologico, e stress ossidativo. Per esempio, è stata osservata una relazione inversamente proporzionale tra la quantità di vitamine antiossidanti presenti nel siero introdotte^{66,67} e i livelli di γ GT plasmatica e una relazione positiva con il ferro eme. Ancora più importante, è risultato che livelli di γ GT, già nell'intervallo di riferimento, sembrano predire positivamente concentrazioni elevate di F₂-isoprostani (prodotto di ossidazione dell'acido arachidonico) del fibrinogeno e della proteina C-reattiva (entrambi marcatori di infiammazione)^{68,69}.

Queste osservazioni suggeriscono una possibile associazione tra la γ GT plasmatica con alcuni marcatori di infiammazione e di stress ossidativo, fenomeni che hanno un importante ruolo nella patogenesi e nello sviluppo della placca aterosclerotica.

BIBLIOGRAFIA

1. **Curthoys NP, Hughey RP.** Characterization and physiological function of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase. *Enzyme* 1979; 24: 383-403
2. **Barouki R, Finidori J, Chobert MN, et al.** Biosynthesis and processing of gamma-glutamyl transpeptidase in hepatoma tissue culture cells. *J Biol Chem* 1984; 259: 7970-4
3. **Finidori J, Laperche Y, Haguenaer-Tsapis R, et al.** In vitro biosynthesis and membrane insertion of gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem* 1984; 259: 4687-90
4. **Tate SS, Meister A.** Gamma-glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol cell Biochem* 1981; 39: 357-68
5. **Whitfield. JB.** Gamma-glutamyltransferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38:263-355
6. **Stark AA, Zeiger E, Pagano DA.** Glutathione metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993;142: 183-9
7. **Zalit I, Glass GA, Stark AA.** The role of chelators in the catalysis of glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by transition metals. *Biochem Mol Biol Int* 1996;40(6): 1123-33

8. **Dominici S, Valentini M, Maellaro E, et al.** Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: The role of γ -glutamyl transpeptidase-dependent H₂O₂ production and S-thiolation. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:623–35
9. **Maellaro E, Dominici S, Del Bello B, et al.** Membrane g-glutamyl transpeptidase activity of melanoma cells: Effects on cellular H₂O₂ production, cell surface protein thiol oxidation and NF κ B activation status. *J Cell Sci* 2000;113:2671–2678
10. **Root RK, Metcalf J, Oshino N, and Chance B.** H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. *J Clin Invest* 1975;55:945–955
11. **Mohanty JG, Jaffe JS, Shulman ES, and Raible DG.** A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods* 1997; 202; 133–41
12. **Dominici S, Pieri L, Comporti M, Pompella A.** Possible role of membrane gamma-glutamyltransferase activity in the facilitation of transferrin-dependent and -independent iron uptake by cancer cells. *Cancer Cell Int* 2003; 3: 7
13. **Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA.** Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls – The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-50
14. **Quesada AR, Byrnes RW, Krezoski SO, Petering DH.** Direct reaction of H₂O₂ with sulfhydryl groups in HL-60 cells: zins-metallothionein and other sites. *Arch Biochem Biophys* 1996;334: 241-50
15. **Sies H, Parker L, editors.** Protein sensor and reactive oxygen species, Part B: Thiol enzymes and proteins. New York: Academic Press *Methods in enzymology* 2002; Vol 348.
16. **Mallis RJ, Buss JE, Thomas JA.** Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem J* 2001;335: 145-53
17. **Hehner FP, Breitzkreuz P, Schubinsky G, et al** Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol* 2000; 165: 4319-28
18. **Barrett WC, DeGnore JP, Koning S, et al.** Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry* 1999;38(20): 6699-705
19. **Klatt P, Molina EP, De Lacoba MG, et al.** Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J* 1999;13: 1481-90
20. **Pineda-Molina E, Klatt P, Vasquez L, et al..** Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 2001;40: 14134-142
21. **Davis DA, Newcombe FM, Starke DW, et al.** Thioltransferase (glutaredoxin) is detect within HIV-1 and can regulate the activity of glutathionated HIV-1 protease in vitro. *J Biol Chem* 1997; 272: 1289-95
22. **Parks D, Bolinger R, Mann K.** Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA but not non-specific or mismatched DNA. *Nucl Acid Res* 1997;25: 1289-95.
23. **Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, et al.** The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66: 1499-503
24. **Corti A, Paolicchi A, Franzini M, et al.** The S-thiolating activity of membrane g-glutamyltransferase: formation of cysteinyl-glycine mixed disulfides with cellular proteins and in the cell microenvironment. *Antiox Redox Signall* 2005;7: 911-8
25. **Coan C, Ji JY, Hidge K, Mehlhorn RJ.** Protein sulfhydryls are protected from irreversible oxidation by conversion to mixed disulfides. *Arch Biochem Biophys* 1992;295(2): 369-78
26. **Thomas JA, Poland B, and Honzatko R.** Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys* 1995;319: 1-9
27. **Seres T, Ravichandran V, Moriguchi T, et al.** Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes-a reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. *J Immunol* 1996; 156: 1973-80
28. **Daufeub S, Leroy P, Paolicchi A, et al.** Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase. *Biochem Pharmacol* 2002;64:207-16
29. **Paolicchi A, Lorenzini E, Perego P, et al.** Extracellular thiol metabolism in clones of human metastatic melanoma with different gamma-glutamyl transpeptidase expression –implication for cell response to platinum-based drugs. *Int J Cancer* 2002;97: 740-45
30. **Paolicchi A, Sotiropoulou M, Perego P, et al.** Gamma-glutamyl transpeptidase catalyses the extracellular detoxification of cisplatin in a human cell line derived from the proximal convoluted tubule of the kidney. *Eur J Cancer* 2003;39: 996-1003
31. **Tew KD, Monks A, Barone L, et al.** Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol Pharmacol* 1996;50: 149-59
32. **Baeuerle PA, Henkel T.** Function and activation of NF-kB in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1994;12: 141-79
33. **Visvikis A, Thioudellet C, Oster T, et al.** High-level expression of enzymatically active mature human gamma-glutamyltransferase in transgenic V79 Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88: 7361-65
34. **Accoui MJ, Enoiu M, Mergny M, et al.** Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF-kB. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276: 1062-67
35. **Dominici S, Visvikis A, Pieri L, et al.** Redox modulation of NF-kappaB nuclear translocation and DNA binding in metastatic melanoma. The role of endogenous and gamma-glutamyl transferase-dependent oxidative stress.

- Tumori 2003;89: 426-33
36. **Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, et al** Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol* 2002;64: 1027-35
 37. **Chen PC, DuBois GC, Chen MJ.** Mapping the domain(s) critical for the binding of human tumor necrosis factor- α to its two receptors. *J Biol Chem* 1995;270: 2874-8
 38. **Dominici S, Pieri L, Paolicchi A, et al.** Endogenous oxidative stress induces distinct redox forms of tumor necrosis factor receptor-1 in melanoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030: 62-68
 39. **Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, Mc Manus BN.** Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998;78: 893-913
 40. **Rudin CM, Thompson CB.** Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Ann Rev Med* 1997;48: 267-81
 41. **Perego P, Paolicchi A, Tongiani R, et al** The cell-specific anti-proliferative effect of reduced glutathione is mediated by gamma-glutamyl transpeptidase-dependent extracellular pro-oxidant reactions. *Int J Cancer* 1997;71: 246-50
 42. **Del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, et al.** Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J* 1999;13: 69-79
 43. **Harris JR.** Ascorbic acid: Biochemistry and biomedical cell biology. *Subcellular Biochemistry* Plenum Press, New York; 1996:vol 25
 44. **Wells WW, Xu DP, Yang Y, Rocque PA.** Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulphide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* 1990;265:15361-4
 45. **Goldenberg H, Schweinzer EJ.** Transport of vitamin C in animal and human cells. *J Bioenerg Biomembr* 1994;26:359-67
 46. **Washko P, Levine M.** Inhibition of ascorbic acid transport in human neutrophils by glucose. *J Biol Chem* 1992;267:23568-74
 47. **Vera JC, Rivas CI, Fischbarg J, Golde DW.** Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature (London)* 1993;364:79-82
 48. **Spielholz C, Golde DW, Houghton AN, et al.** Increased facilitated transport of dehydroascorbic acid without changes in sodium-dependent ascorbate transport in human melanoma cells. *Cancer Res* 1997;57:2529-37
 49. **Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, et al.** Glutathione catabolism as a signalling mechanism. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1029-37
 50. **Dominici S, Paolicchi A, Lorenzini E, et al.** Gamma-glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: a factor in multiple processes. *BioFactors* 2003;17:187-98
 51. **Corti A, Raggi C, Franzini M, et al.** Plasma membrane γ -glutamyltransferase activity facilitates the uptake of vitamin C in melanoma cells. *Free Rad Biol Med* 2004; 37:1906-15
 52. **Tien M, Bucher JR, Aust SD.** Thiol-dependent lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107: 279-85
 53. **Spear N, Aust SD.** Thiol-mediated NTA-Fe(III) reduction and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1994;312: 198-202
 54. **Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, et al.** Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation a potential mechanism in atherosclerosis. *J Invest Med* 1999;47: 151-60
 55. **Stark AA, Arad A, Siskindovich S, et al.** Effect of pH on mutagenesis by thiols in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* 1989;224: 89-94
 56. **Drozd R, Parmentier C, Hachad H, et al.** Gamma-glutamyl transferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferring system. *Free Radic Biol Med* 1998;25: 786-92
 57. **Dominici S, Pieri L, Comporti M, Pompella A.** Possible role of membrane gamma-glutamyltransferase activity in the facilitation of transferrin-dependent and -independent iron uptake by cancer cells. *Cancer Cell Int* 2003;3: 7
 58. **Glass GA, Stark AA.** Promotion of glutathione-gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: the requirement for iron and the effect of antioxidants and antioxidant enzymes. *Environ Mol Mutagen* 1997 ;29: 73-80
 59. **Stark AA, Russell JJ, Langenbach R, et al.** Localization of oxidative damage by a glutathione- γ -glutamyl transpeptidase system in preneoplastic lesions in sections of livers from carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis* 1994;15: 343-8
 60. **Pompella A and Comporti M.** The use of 3-hydroxy-2-naphthoic acid hydrazide and Fast Blue B for the histochemical detection of lipid peroxidation in animal tissues - a microphotometric study. *Histochemistry.* 1991; 95:255-62
 61. **Paolicchi A, Tongiani R, Tonarelli P, et al.** Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *Free Rad Biol Med* 1997; 22:853-60
 62. **Berliner JA and Heinecke JW.** The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad Biol Med* 1996; 20:707-27
 63. **Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, et al.** Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and low density lipoprotein oxidation - a potential mechanism in atherosclerosis. *J Invest Med* 1999; 47:151-60
 64. **Meister A.** Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251: 3-7
 65. **Lee DH, Gross MD, Jacobs DR Jr.** Association of

- serum carotenoids and tocopherols with γ -glutamyltransferase: the Cardiovascular Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. Clin Chem 2004;50:582-8
66. **Lee DH, Steffen LM, Jacobs DRJr.** Association between serum γ -glutamyltransferase and dietary factors: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. Am J Clin Nutr 2004;79:600-5
67. **Corti A, Raggi C, Franzini M, et al.** Plasma membrane γ -glutamyltransferase activity facilitates the uptake of vitamin C in melanoma cells. Free Radic Biol Med 2004. In press.
68. **Lee DH, Jacobs DRJr, Gross M, et al.** γ -Glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension. Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. Clin Chem 2003;49:1358-66
69. **Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR.** Is serum γ -Glutamyltransferase a marker of oxidative stress? Free Radic Res 2004;38:535-9

Per corrispondenza:

Dott.sa Irene Fornaciari
Scuola Superiore Sant'Anna
Istituto di Fisiologia Clinica CNR
Via Moruzzi 1, 56124 Pisa
Tel.: 050 3153309 - Fax: 050 3152166
e-mail: i.fornaciari@sssup.it