

Neuroscience. auteur manuscrit; disponible en PMC 2007 Aout 10.
Publié en forme éditée finale comme:
[Neuroscience. 2007 Février 9; 144\(3\): 991–1003.](#)
Publié online 2006 Décembre 5. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.09.064.
[Copyright notice](#) et [Disclaimer](#)

Déplétion de Glutathion relève dégénération neurones moteurs *in vitro* et *in vivo*

Liyang Chi,¹ Yan Ke,² Chun Luo,¹ David Gozal,² et Rugao Liu^{1*}

¹ Department of Anatomy and Cell Biology, University of North Dakota School of Medicine, 501 N. Columbia Road, Grand Forks, ND 58202

² Kosair Children Hospital Research Institute, Department of Pediatrics, University of Louisville, 570 S. Preston St., Suite 204, Louisville, KY 40202

*auteur correspondant: Rugao Liu, Ph.D., Associate Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, University of North Dakota School of Medicine, 501 N. Columbia Road, Grand Forks, ND 58202, Téléphone: (701)-777-2559, Fax: (701)-777-2477, E-mail: rliu@medicine.nodak.edu

Editeur de section : Dr. Werner Sieghart

► La version éditée finale de cet article est disponible à [Neuroscience](#).

[Publisher's Disclaimer](#)

Résumé

Le mécanisme de dégénération de neurones moteurs sélectives et dépendant de l'âge dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) n'a pas encore été défini et le rôle de glutathion (GSH) en association avec la morte de neurones moteurs reste largement inconnu. Un système de culture cellulaire pareil aux neurones moteurs et un modèle de souris transgénique étaient utilisés pour étudier l'effet d'altération GSH cellulaire sur la morte de cellules neurones moteurs. Exposition de cellules pareilles aux neurones moteurs NSC34 à Ethacrynic Acid (EA) ou L-Buthionine Sulfoximine (BSO) a forcément réduit les niveaux cellulaires GSH, et était accompagné d'une production augmentée de sortes réactives oxygènes (ROS) mesurées par le dosage oxydation fluorescent. En plus, la déplétion GSH a relevé les marqueurs de stress oxydative, l'activation transcriptionnelle AP-1, c-Jun, c-Fos et expression HO-1 dans des cellules NSC34 analysé par un rapporteur luciférase, western blotting et dosages quantitatives PCR respectivement. En plus, la déplétion de GSH a diminué la fonction mitochondriale, l'apoptose facilitée, facteur produit translocation (AIF), release cytochrome c, et activation caspase 3, et par conséquent a mené à une apoptose de cellules pareilles aux neurones moteurs. Dans un modèle de souris transgénique pareil à la SLA avec des gènes surexprimés mutantes G93A-SOD1, nous avons montré que la réduction de GSH dans la moelle épinière et les cellules neurones moteurs est reliée à la translocation AIF, l'activation caspase 3, et la dégénération neurones moteurs pendant le commencement et la progression de la maladie pareille à la SLA. Tous ensemble, les données *in vitro* et *in vivo* présentées dans le rapport actuel ont démontré que GSH diminué promouvait plusieurs routes apoptiques qui contribuent, au moins partiellement, à la dégénération de neurones moteurs dans la SLA.

Introduction

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale qui attaque surtout les neurones moteurs dans le cortex du cerveau, le tronc cérébral et la moelle épinière (Williams et Windebank, 1991). Les mécanismes derrière la dégénération de neurones moteurs sélectives et dépendant d'âge, restent largement non identifiés, et une thérapie effective pour la SLA n'est pas encore disponible. Mutations du gène Cu,Zn-superoxyde dismutase (SOD1) causent la dégénération des neurones moteurs et ont été liées à 2-5% des cas de la SLA (Rosen et al., 1994; Rosen et al., 1993). Plusieurs mécanismes potentiels de dégénération des neurones moteurs dans la SLA ont été proposés basés sur des études cliniques, des modèles animaux et des analyses de systèmes de culture cellulaire. Le stress oxydatif augmenté, la toxicité glutamate, l'agrégation protéine et la cytotoxicité Cu/Zn ont tous été suggérés pour contribuer à la dégénération des neurones moteurs. (Cleveland et Rothstein, 2001; Li et al., 2003; Liu et al., 2002; Shaw et al., 2001; Shaw et Eggett, 2000; Shibata et al., 2000). De ceux-ci, le stress oxydatif augmenté semblait d'être un fait tôt et durable en association avec la mort des neurones moteurs dans la SLA (Bogdanov et al., 1998; Liu et al., 1998), bien que le mécanisme spécifique qui mène au dommage oxydatif sur des restes de neurones moteurs reste à être défini. Le stress oxydatif peut potentiellement être augmenté par une production accrue des espèces oxygénées réactives (ROS), systèmes d'enzymes antioxydantes diminués ou une combinaison des deux. Glutathione (GSH), un tripeptide de γ -glutamylcysteinylglycine, est un des antioxydants les plus étendus dans les cellules et les tissus. Réduction de GSH relève la production ROS et promouvait le dommage oxydatif. Une étude précédente a démontré une liaison GSH augmentée dans les moelles épinières des patients avec la SLA sporadique (Lanius et al., 1993), suggèrent que GSH peut jouer un rôle dans la pathogénèse de la SLA. Dans un modèle de culture cellulaire, on a démontré que l'expression du gène SOD1 mutante a diminué les niveaux cellulaires de GSH, suggèrent que la réduction dans la disponibilité bio GSH peut participer dans la dégénération des neurones moteurs à médiation SOD1 mutante. (Lee et al., 2001).

GSH est le balayeur le plus grand et le plus effectif contre ROS directement dans des cellules mammifères. En plus, GSH est aussi un substrat clef pour les enzymes antioxydantes qui neutralisent le peroxyde hydrogène et le peroxyde lipidique catalysé par la peroxydase glutathion. Récemment, on a démontré que GSH participe dans les routes de transduction signal cellulaire, et module une fonction récepteur ion tropique (Bains et Shaw, 1997; Grima et al., 2003; Janaky et al., 1993). GSH est synthétisé en deux réactions enzymatiques séquentielles catalysées par γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) et GSH synthétase. L-Buthionine Sulfoximine (BSO) est un inhibiteur sélectif de γ -GCS. Manifestation de cellules vers BSO suspende la synthèse GSH et diminue les niveaux intracellulaires de GSH. Alors, BSO a fréquemment été utilisé pour étudier le rôle de GSH en association avec des cellules neuronales induit par stress oxydatif et mort d'autres cellules. De l'autre côté, parce que BSO n'épuise pas complètement le GSH mitochondrial et nucléaire, d'autres agents, y compris l'acide étacrynique (EA) ont été utilisés pour effectivement épuiser GSH cellulaire, mitochondrial et nucléaire (Keelan et al., 2001; Rizzardini et al., 2003). Des altérations dans la synthèse GSH, ou dans des pools GSH, ont été associées avec la mort cellulaire neuronale et font de GSH une variété de maladies neurodégénératives humaines, comme la maladie de Parkinson (Bharath et al., 2002; Jha et al., 2000; Mytilineou et al., 2002; Paik et al., 2003), la

maladie d'Alzheimer(Adams, Jr. et al., 1991; Cecchi et al., 1999; Janaky et al., 1999; Karelson et al., 2002) et Schizophrénie (Do et al., 2000). Néanmoins, le rôle de GSH dans la pathogénèse de dégénération neurones moteurs dans la SLA reste largement non identifié. Jusqu'à présent, nous avons focalisé sur un système de culture cellulaire et un modèle de souris transgénique pareil à la SLA pour étudier l'effet de GSH sur la morte de cellules neurones moteurs. Nous avons montré que la réduction de GSH intracellulaire augmente le stress oxydatif, diminue la fonction mitochondriale, active plusieurs routes apoptiques, et par conséquent contribue à la dégénération neurones moteurs *in vitro* et *in vivo*.

Matériaux et méthodes

Substances chimiques et réactifs

Acide éthacrynique (EA), L-Buthionine-SR-Sulfoximine (BSO) et d'autres substances chimiques étaient acquis de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Un médium de culture cellulaire et d'autres réactifs étaient acquis d'Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA).

Animaux

Des souris transgéniques surexprimés mutantes G93A-SOD1 étaient initialement acquis de Jackson Laboratory (Stock #002726, Bar Harbor, ME). Les souris étaient conservées et cultivées dans le Centre de Recherche Biomédicale à l'Université de North Dakota School of Medicine. Cette ligne de souris transgénique exprime un nombre de copy haute de G93A-SOD1 mutante et développe un commencement de maladie et une progression vite (Gurney et al., 1994). Basé sur une caractérisation pathologique et une manifestation symptomatique, nous avons partagé le temps de vie des souris transgéniques G93A-SOD1 mutante en des étapes libre de maladie clinique (avant 60 jours d'âge), commencement de maladie (70-90 jours d'âge), et progression de maladie (100-130 jours d'âge) (Gurney et al., 1994; Liu et al., 1998). Les régions dans la moelle épinière lombaires de ces étapes dans la G93A-SOD1 mutante et des souris de contrôle adapté à l'âge étaient utilisées pour GSH, GSSG, et des dosages apoptiques. Les protocoles expérimentaux pour utiliser des animaux laboratoires était approuvés par l'Institutional Animal Use and Care Committee et étaient en relation proche avec les directives du National Institutes of Health pour les soins et l'utilisation d'animaux laboratoires. Tous les efforts étaient faits pour minimaliser le stress des animaux, les désagréments, et le nombre d'animaux utilisés.

Culture cellulaire et traitements

Des cellules souris pareil au neurones moteurs NSC34 (Passages 15 à 40) (gentiment fournies par Dr. Neil Cashman, Université de Toronto) étaient cultivées dans une atmosphère humidifié de 95% air-5% CO₂ dans un incubateur 37°C en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémenté avec 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 unités/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (DMEM complète medium) comme décrit auparavant (Bishop et al., 1999; Cashman et al., 1992). Le médium de culture cellulaire était remplacé tous les 3-4 jours. Une fois que la confluence 80-90% était atteinte, les cellules étaient interrompues avec 0.15% trypsine et 1mM EDTA pour 3-5 minutes. Des cellules

dissociées étaient filé et replanté dans de nouvelles coupes culture ou flacons (Corning Life Sciences, NY).

Déplétion GSH et dosage GSH

Deux méthodes indépendantes, déplétion EA et inhibition BSO étaient utilisé pour réduire GSH cellulaire respectivement (Lucas et al., 1998; Roychowdhury et al., 2003; Seyfried et al., 1999; Tukov et al., 2004). Brièvement, pour la déplétion par passage EA GSH, des cellules NSC34 étaient incubées avec une concentration EA de 20 à 100 μM pour jusqu'à 12 heures. Pour des inhibitions par passage BSO de synthèse GSH, des cellules NSC34 étaient incubé avec une concentration BSO de 25 à 200 μM pour jusqu'à 48 heures. Des cellules traitées EA ou BSO étaient récoltées et préparées pour une variété d'analyses décrits dans la section suivante.

Deux méthodes indépendantes étaient effectué pour mesurer GSH cellulaire. Pour le dosage colorimétrique, contrôle, des cellules traitées EA ou BSO étaient incubées avec 40 μM monobromobimane (MBM) pour 30 minutes. Après, l'intensité fluorescente était directement mesuré avec un fluor mètre (Molecular Device Inc., Sunnyvale, CA) (Svardal et al., 1990; Yan et Huxtable, 1995). Une unité arbitraire d'intensité fluorescente était utilisé pour exprimes les niveaux relatifs de GSH cellulaire après les traitements EA ou BSO. Pour le dosage biochimique, un kit Bioxytech GSH/GSSG-412 était utilisé et les procédures proposées par les constructeurs étaient suivies (Oxis International, Inc., Foster City, CA). Brièvement, des cellules de contrôle 10×10^6 NSC34, des expériences traitées EA ou BSO étaient homogénéisé complètement dans un tampon MES [200 mM 2-(N-morpholino)acide éthanesulphonique, 50 mM phosphate, et 1 mM EDTA, pH 6.0]. Après centrifugation à 12,000g pour 10 min à 4 °C, le surnageant était déproteinated et procédé pour des dosages GSH (ou GSSG) avec un cocktail tampon premixed selon les suggestions du constructeur. Les mêmes dosages biochimiques étaient aussi utilisés pour déterminer les niveaux de GSH (ou GSSG) dans la région de la moelle épinière lombaire de souris transgéniques G93A-SOD1 et des souris de contrôle normaux adapté à l'âge dans de différents étapes correspondantes à libre de maladie, commencement de maladie et progression de maladie (Gurney et al., 1994).

Dosage de production cellulaire de sortes d'oxygène réactivé (ROS)

Un dosage dichlorofluorescein (DCF) était utilisé pour déterminer la génération de sortes d'oxygène réactive cellulaire dans des cellules NSC34. Brièvement, 2×10^5 control, EA ou BSO cellules traitées/bien cultivé dans une plaque 93-well étaient incubé avec 100 μM de 6-Carboxy-2',7'-dicholorfluorescein diacetate (DCFH-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR) pendant 1 heure dans le noir. Après les cellules étaient mesurées pour l'oxydation de DCFH-DA dans un fluor mètre aux longueur d'onde d'excitation et émission de 485 nm et 530 nm respectivement. Analyse de données était exécutée comme décrit par Wang et Joseph (Wang et Joseph, 1999). L'intensité fluorescent qui mesure l'oxydation de DCFH-DA par ROS représente l'état relativement constant de génération ROS dans des cellules.

Transfection transitoire et dosage d'activité luciférase

Une transfection transitoire était exécuté avec un electroporator (BTX, San Diego, CA) comme décrit auparavant (Liu et al., 2002). Brièvement, des cellules 10×10^6 étaient incubées avec 50 µg contrôle vecteur et vecteur contenant 2×AP-Luciférase plasmide DNA dans 0.4 ml Opti-MEM (Invitrogen) à température de chambre pour 10 minutes, après les cellules étaient electroporated utilisant un mode de voltage bas à 240 V, 1 pulse, et 25 msec/V de longueur de pulse. Après electroporation, les cellules étaient gardées à température de chambre pour 30 minutes et ensuite cultivé dans un médium complète.

Dosage adhésion

Vingt-quatre plaques bonnes étaient traitées avec fibronectin, collagène, ou laminin un jour en une solution tampon de 1x phosphate (PBS) respectivement. Après lavage, 2×10^6 control ou cellules EA traitées étaient cultivé dans chaque puits de la plaque pour 12 heures. Le medium de culture cellulaire était enlevé et les puits étaient brièvement lavé avec 1xPBS deux fois. Les cellules attachées au substrat étaient désassociées avec trypsine et comptées. Le pourcentage d'adhésion était calculé par le nombre de cellules attaché à chaque plaque traitée divisé par le nombre totale de cellules seeded (n=4).

Analyse real time quantitative PCR d'expression de gènes

Vehicle control ou cellules traitées EA étaient récoltées pour purification RNA. Le RNA purifié en totale pour analyse quantitative real-time PCR était soumis à un traitement RNase free DNase (Ambion, Austin, TX). Après la mesure de concentration, une microgramme de RNA totale de chaque échantillon était utilisé pour synthétiser cDNA first-strand en utilisant un kit de synthèse super script first-strand (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR real time était exécuté avec un système MX4000 (Stratagene, San Diego, CA). Les amorces PCR real time avant et retours pour amplification de transcrits était 5'-CTCACTGGCAGGAAATCATCCC-3' and 5'-GAGAGGTCACCCAGGTAGCG, respectivement. Le probe était 5'-6-FAM(CACGCCAGCCACACAGCACTATGTAAAGC)BHQ-1-3'. Actin était utilisé comme un contrôle endogène. Les amorces PCR real time avant et retours pour amplification de transcrits actin était 5'-TACAATGAGCTGCGTGTGGC-3' and 5'-ATGGCTGGGGTGTGAAGGT-3' respectivement. Le probe était 5'-6-FAM(CACCCTGTGCTGCTCACCGAGGC)BHQ-1 3'.

Fractionnement subcellulaire

Pour un fractionnement subcellulaire entre les mitochondries et cytosol, une méthode légèrement modifié était adoptée (Fujimura et al., 2000). Brièvement, vehicle control ou cellules traitées EA étaient récolté sur glace. Après deux lavages avec de la glace froide 1×PBS, les cellules étaient transgressées dans un buffer lysis (Fujimura et al., 2000) et homogénéisé avec un homogénéiser Dounce sur glace pour 15-20 caresses. Après centrifugation à $2000 \times g$ pour 5 min, le surnageant était transféré à une nouvelle tube et le pellet était transgressé avec un volume de 1/5 du tampon lyses original. Après un deuxième tour de homogénéisation, le pellet était résolu dans le nouveau tampon lyse avec 0.2% triton X-100 (fraction mitochondrial). Les surnageant (fraction Cytosol) étaient combinés et gardés dans un congélateur -20°C . Après mesurage de concentration protéine, western blotting était

exécuté pour analyse le release de cytochrome. Similairement, une approche bien établie pour fractionnement subcellulaire entre mitochondries et nucléide était adoptée (Nur-E-Kamal et al., 2004; Saunders et al., 1997). Analyse occidentale était exécuté pour analyser le release cytochrome c et la translocation AIF.

Analyse Immun histochimique

Pour coloration immun histochimique, vehicule control et cellules traitées EA étaient récoltées et lavées deux fois dans de la glace 1×PBS suivi par fixation en 4% para formaldéhyde (PFA) pour 1 heure sur glace. Après perméabilisations avec 0.2% triton X-100 dans PBS et blocage avec 10% goat serum, les cellules étaient incubé avec des anticorps spécifique le jour à 4 °C (AIF, cytochrome c et anticorps caspase active 3 étaient tous à dilution 1:300; Chemicon Inc.). Les sections étaient lavées 5 fois avec 0.2% triton X-100 dans PBS pour 5 minutes pour chacun et après incubé avec des anticorps spécifiques secondaires conjugués avec Fluorescéine ou Rhodamine pour 2 heures à une température de chambre dans le noir. Après lavages extensives, les cellules étaient incubé avec 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) pour colorage nucléide et porté avec un médium anti-fade. Tous les images étaient rassemblés et analysés avec un microscope optique Nikon (modèle E800) équipé avec le caméra digitale Spot (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) et le logiciel Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

Analyse Western blotting

Vehicule control ou cellules traitées étaient grattés des puits, et récolté dans 1xPBS froid de glace. Les cellules étaient alors centrifugé à 2500×g à 4 °C pour 5 minutes. Le surnageant était renvoyé, et le pellet cellulaire était suspendu dans 400 µl de tampon lyse (10mM K₂HPO₄, pH 7.2/1mM EDTA/5mM EGTA/10mM MgCl₂/50mM Glycérophosphate/1mM Na₃VO₄/2mM DTT/1% Triton X-100) avec inhibiteur protéase (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN). Le lysate cellulaire était filé dans une centrifuge de table à 12,000×g à 4°C pour 10 minutes, et la concentration protéine dans le surnageant était mesurée en utilisant un kit de dosage protéine BioRad (BioRad, Hercules, CA). Les échantillons de (20 µg) étaient séparés dans un gel 12.5% SDS PAGE et transféré sur un membrane nitrocellulose. Le membrane était bloqué avec 5% lait-sec dissolu dans TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) pour 1 heure à un température de chambre sur une plaque secoueur et après incubé avec l'anticorps spécifique le soir à 4°C. Le membrane était lavé trois fois pour 5 minutes chaque fois avec TBST à température de chambre et après incubé avec raifort peroxydase (HRP)-anticorps secondaire conjugué (KPL, Gaithersburg, MD) pour 1 heure à température de chambre. Le membrane a été lavé trois fois avec TBST pour 5 min chaque, et visualisé dans des indicateurs ECL (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

Dosage viabilité cellulaire

Viabilité cellulaire de cellules NSC34 dans le traitement était déterminée par dosage d'exclusion trypan bleu. Brièvement, les cellules étaient incubées avec 0.1% des pigments trypan bleu pour 10 min à température de chambre et étaient comptées sur un hemacytomètre

avec un microscope. La viabilité cellulaire était exprimé comme le nombre de cellules viables (excluant-pigment) partagé par le nombre totale de cellules. En plus, la viabilité cellulaire était aussi mesuré par le dosage release LDH basé sur les instructions du constructeur (Sigma Chemicals, St. Louise, MO) pour confirmer le dosage d'exclusion trypan bleu.

Dosage apoptose cellulaire

Dosages apoptose dans control ou cellules traitées EA était exécuté suite à l'instructions du constructeur en utilisant un dosage formaté ELISA qui détecte des fragments DNA associé-histone (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN). En plus, un dosage terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) était aussi exécuté pour analyser la morte de cellules apoptiques. Deux dosages apoptiques indépendants ont généré des résultats très similaires.

Analyse statistique

Les valeurs étaient exprimé comme Mean \pm SE. Des comparaisons spécifiques entre control et expériment individuel étaient analysées par des testes Student-t avec un valeur p de moins de 0.05 considéré comme signifiante statistique.

Résultats

Déplétion de GSH intracellulaire dans des cellules pareil aux neurones moteurs NSC34 par conjugaison chimique et inhibition biochimique approche.

Un modèle de culture cellulaire pareil aux neurones moteurs (Cashman et al., 1992; Bishop et al., 1999) et un modèle de souris transgénique pareil à SLA (Gurney et al., 1994) étaient utilisé pour étudier le rôle de GSH dans la morte de neurones moteurs associées avec le commencement de la maladie SLA et la progression. Dans le système de culture cellulaire, deux approches expérimentaux différentes, déplétion à médiation chimique et inhibition de synthèse GSH, étaient utilisé pour diminuer les niveaux cellulaires de GSH. Des cellules NSC34 exposées à EA et BSO avaient une réduction dépendante de dose et dépendante de temps de GSH cellulaire mesuré par un dosage colorimétrique et un dosage biochimique respectivement. (Illustration 1A–1G).

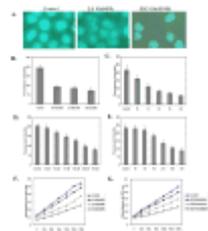


Illustration 1

Déplétion chimique de production GSH et inhibition biochimique de synthèse GSH dans des cellules pareil aux neurones moteurs NSC34

Déplétion GSH a élevé la production cellulaire ROS dans des cellules NSC34

Le dosage DCF était appliqué pour mesurer les cinétiques de production ROS dans des cellules déplétées GSH (Wang and Joseph, 1999). Comme montré dans Illustration 2, l'oxydation de DCF était dramatiquement augmenté comme GSH cellulaire était déplété par exposition de cellules à de différents doses de EA et BSO respectivement. EA a apparemment réduit GSH intracellulaire plus effectivement (Illustration 1) et a promu plus de production ROS (Illustration 2A) que BSO (Illustration 2B). Alors, déplétion GSH à

médiation chimique EA était subséquentement utilisé pour étudier le rôle d'altération GSH dans la morte de cellules pareil aux neurones moteurs.

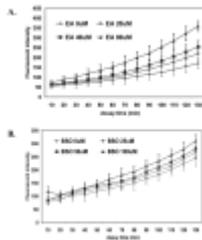


Illustration 2

Déplétion GSH améliore la production des espèces réactives oxygènes (ROS) dans des cellules NSC34.

Réduction GSH a augmenté le marqueur stress oxydative d'expression génétique

Nous avons examiné des changements des gènes de réponse stress oxydative tôt et secondaire pour confirmer le stress oxydative augmenté déclenchant par déplétion GSH. Traitement EA a amélioré l'activation transcriptionnelle-AP-1, comme détecté par un dosage génétique rapporteur luciférase ([Illustration 3A](#)), c-Jun ([Illustration 3B](#)) et expression c-Fos (données non montrées) comme détecté par analyse occidentale. Similairement, déplétion GSH a aussi augmenté l'expression HO-1 comme détecté par une réaction real-time PCR quantitative et des analyses western blotting, respectivement ([Illustration 4](#)).

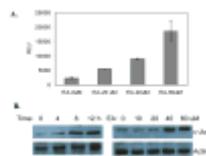


Illustration 3

Déplétion GSH par EA augmente l'expression de réponse génétique oxydative tôt.

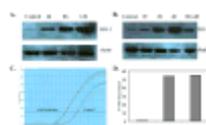


Illustration 4

Déplétion GSH par EA augmente l'expression de réponse génétique oxydative secondaire.

Déplétion GSH a diminué l'adhésion cellulaire et a augmenté la morte cellulaire

Adhésion cellulaire aux substrats est critique pour la survie cellulaire. Alors, nous avons examiné les effets de réduction GSH sur l'adhésion de cellules NSC34 à 3protéines extracellulaires major, c'est-à-dire fibronectin, collagen et laminin. Comme montré dans l'[Illustration 5A](#), les cellules traitées avec EA ont montrées une diminution dépendant de dose et dépendant de temps (données non montrées) dans l'adhésion à tous les trois protéines extracellulaires. Similairement, les cellules exposées à EA ont diminué la fonction mitochondriale comme mesuré par un dosage MTT ([Illustration 5B](#)), et ont augmenté la morte cellulaire détectée par un dosage d'exclusion trypan bleu ([Illustration 5C](#)) et dosage release histone (Apoptosis) ([Illustration 5D](#)) respectivement.

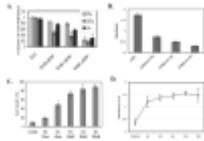


Illustration 5

Déplétion GSH par EA augmente la morte cellulaire NSC34

Déplétion GSH a promu la redistribution AIF, release cytochrome c, activation caspase 3 et morte cellulaire apoptique

Un dosage biochimique et une analyse immunohistochimique étaient utilisés pour identifier les routes moléculaires d'apoptose cellulaire par déplétion GSH. Des fractionnements mitochondriaux et nucléaires couplés avec analyse occidentale ont montré une augmentation de translocation AIF vers nucleus suivant déplétion GSH dans des cellules NSC34 (**Illustration 6A**). Tachage immunohistochimique a confirmé l'augmentation de translocation AIF vers le nucleus du mitochondrie sur déplétion GSH (**Illustration 6B**).

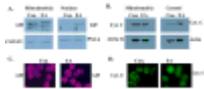


Illustration 6

Déplétion GSH par EA lance la redistribution de facteurs pro-apoptiques dans des cellules NSC34.

Similairement, fractionnement mitochondrial et cytosolique couplés avec analyse western blotting et chimie immunohisto, ont montré que release cytochrome C était concerné dans l'apoptose cellulaire NSC34 causé par la déplétion GSH (**Illustration 6C, 6D**). Activation d'activité caspase contribue à la morte de cellules apoptiques dans beaucoup de systèmes y inclus CNS (**Parikh et al., 2003**). Déplétion GSH a diminué l'activation caspases-3 relevé par tachage immunohistochimique avec anticorps anti-active caspase-3 (**Illustration 7A-7C**). En plus, réduction GSH améliore l'apoptose comme déterminé par dosage release histone (**Illustration 5D**) et dosage terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) (**Illustration 7D et 7E**) dans des cellules NSC34.

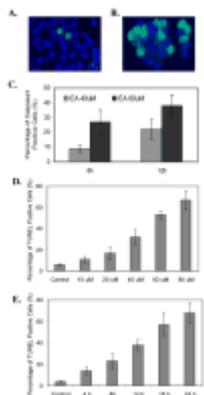


Illustration 7

Déplétion GSH par EA lance l'apoptose dans des cellules NSC34

Réduction de GSH et augmentation de GSSG dans les moelles épinières des souris transgéniques G93A-SOD1 était associé avec morte de neurones moteurs et un commencement et progression d'une maladie comme la SLA

Le modèle souris transgénique mutant G93A-SOD1 bien-établi de la maladie SLA était utilisé pour analyser les niveaux de GSH dans le cours du commencement de la SLA et la progression. Comparés à des contrôles normales d'âge littermate, les niveaux GSH dans les régions lombaires étaient légèrement réduits au commencement de la maladie, et étaient sensiblement diminué pendant la progression de la maladie dans un souris transgénique G93S-SOD1 ([Illustration 8A et 8C](#)). De l'autre coté, les niveaux oxydés GSH (GSSG) étaient sensiblement augmentés pendant le commencement de la maladie SLA et la progression ([Illustration 8B and 8D](#)).

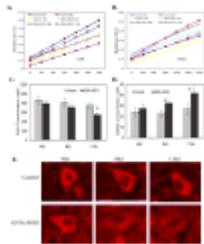


Illustration 8

Niveaux GSH dans le souris transgénique G93A-SOD1 au moment libre de maladie (45 jours d'âge), commencement de la maladie (80 jours d'âge) et progression de la maladie (110 jours d'âge) comparé aux contrôles de souris normales de même âge.

Comparé à d'autres contrôles littermate de même âge, les niveaux intracellulaires GSH dans les cellules neurones moteurs des souris transgéniques G93A-SOD1 étaient diminué au commencement de la SLA et pendant la progression ([Illustration 8E](#)). GSH diminué était associé avec translocation nucléaire AIF, activation caspase 3, et morte de cellules neurones moteurs ([Illustration 9](#)) dans des souris transgéniques pareil à la SLA

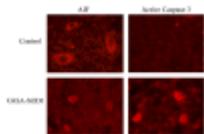


Illustration 9

Redistribution de AIF et caspase 3 active dans des cellules neurones moteurs de souris pareil à la SLA

Discussion

Plusieurs lignes de preuves suggèrent que le stress oxydative augmenté joue un role important dans la dégénération neurones moteurs qui mène au commencement de la maladie SLA et la progression ([Hall et al., 1998](#); [Tu et al., 1997](#)). Néanmoins, ce qui cause le stress oxydative augmenté et comment le stress oxydative spécifiquement contribue à la dégénération neurones moteurs reste largement inconnu. En plus, la relation entre les altération dans les niveaux GSH intracellulaires et la morte de neurones moteurs n'a pas encore été déterminée. De cette raison, l'étude actuel était conçu pour analyser le processus moléculaire de réduction de neurones moteurs à médiation GSH (pareil neurones moteurs) morte cellulaire en utilisant un modèle de culture cellulaire et un modèle de souris récapitulant la SLA humaine. Les données présentées dans cette étude démontres trois résultats importants : 1). Stress oxydative augmenté par altération de niveaux intracellulaires de GSH était associé avec la morte de cellules neurones

moteurs (apoptose) *in vitro* et *in vivo*; 2). Réduction dans GSH était associée avec redistribution de AIF de mitochondrie vers nucléide; 3). Cytochrome c-à médiation activation caspase 3, élicité par réduction GSH a aussi contribué à la morte cellulaire neurones moteurs (apoptose). Alors, réduction de GSH se présente comme un facteur important associé avec dégénération neurones moteurs dans la SLA par activation de plusieurs routes apoptiques.

Culture cellulaires et modèles souris transgéniques pour étudier le rôle de GSH altéré dans la dégénération neurones moteurs

Un modèle de culture cellulaire était utilisé comme une marche initiale pour tester le rôle d'altération GSH dans la morte cellulaire neurones moteurs en utilisant les approches d'inhibition biochimique et la déplétion chimique pour réduire la présence cellulaire de GSH. ([Illustration 1](#)). BSO est un inhibiteur de γ -glutamylcysteine synthétase (γ -GCS) ce qui bloque la synthèse GSH. Exposition de cellules vers BSO mène à la réduction de GSH cytosolique, mais pas de GSH mitochondrial. EA, une molécule réactive thiol, conjugue directement vers GSH et diminue les niveaux intracellulaires et mitochondriaux de GSH ([Schafer and Buettner, 2001](#)). De cette raison, nous focalisons sur l'approche EA pour dépléter GSH intracellulaire et pour étudier les effets de stress oxydative augmenté sur la morte de cellules neurones moteurs.

Nous avons aussi utilisé un modèle de souris transgénique mutant G93A-SOD1 pour analyser le rôle de GSH dans la dégénération neurones moteurs ([Gurney et al., 1994](#)). Le temps de vie de souris SLA ont été caractérisé dans 3 étapes, c'est-à-dire, libre de maladie (avant 60 jours d'âge), commencement de maladie (70-90 jours d'âge) et progression de maladie (100-130 jours d'âge) ([Liu et al., 1998](#); [Gurney et al., 1994](#)). Basé sur les manifestations pathologiquement bien-établis, nous avons analysé les niveaux de GSH dans les régions lombaires de souris transgéniques G93A-SOD1 dans les différents étapes, et ont ensuite comparé à ceux-ci des contrôles littermate normales de même âge. En plus, nous avons aussi appliqué une méthode immunohistochimique pour détecter des changements GSH dans des cellules neurones moteurs dans les souris transgéniques G93A-SOD1 et des contrôles littermate normales de même âge. Alors la combinaison de modèle culture cellulaire et modèle de souris transgénique permet al délinéation de contributions potentielles de stress oxydative augmenté par réduction de GSH intracellulaires à la morte neurones moteurs (apoptose) dans la SLA.

Réduction de GSH a augmenté le stress oxydative et a induit une apoptose neurones moteurs

GSH est l'antioxydant cellulaire le plus abondant et le plus effectif, et des altérations dans GSH souvent résultent en des changements redox. Comme montré dans [Illustration 1](#) que l'exposition de cellules NSC34 à BSO ou EA a

diminué GSH cellulaire dramatiquement comme mesuré par des dosages biochimiques et colorimétriques. GSH est bio synthétisé de L-glutamate catalysé γ -GCS et glutathionne synthétase (GS) dans le cytosol. Plusieurs organelles contiennent leurs propres pools GSH qui sont temporairement indépendant de synthèse GSH cytosolique. Par exemple, tous les deux le mitochondrie et le nucleus ont leurs propres pools GSH, et traitement BSO ne déplete pas GSH de ces pools, bien que EA fait bien ça. GSH diminué change le statut redox vers la direction d'un état plus oxydé dans des expériences culture cellulaire. Comme montré dans [Illustration 2](#), la réduction GSH a dramatiquement augmenté la génération ROS comme mesuré par le dosage DCF. En plus, déplétion GSH a augmenté l'expression des marqueurs de stress oxydative, c-Jun, c-Fos (données non montrées) et activation AP-1 ([Illustration 3](#)), et marqueurs de stress oxydatives secondaires, comme l'expression HO-1 ([Illustration 4](#)). Tous ensemble, ces expériences suggèrent fortement que la disponibilité GSH diminué mène à stress oxydative intracellulaire augmenté, et promu la propagation de stress oxydative, par exemple ,oxydation protéine, peroxydation lipide, et oxydation acide nucléique (données non montrées).

L'environnement cellulaire oxydé induit par déplétion GSH a résulté en une inhabilité de cellules d'adhérer à des protéines extracellulaires matrix ([Illustration 5A](#)). Aptitude préservée de cellules d'adhérer à des protéines substrats est essentiel pour la survie des cellules, et la perte d'adhésion cellulaire peut mener à la morte des cellules. En effet, la réduction GSH cause la dysfonction mitochondriale ([Illustration 5B](#)) et la morte de cellules ([Illustration 5C and 5D](#)). Pour identifier les mécanismes de morte cellulaire, potentiellement induit par déplétion GSH, nous avons évalué la redistribution AIF, et nous avons trouvé qu'il y a avait une augmentation dans la translocation AIF de mitochondrie vers nucléide sur déplétion GSH ([Illustration 6A–6C](#)). AIF est une flavo protéine résident dans l'inter membrane mitochondriale ([Cande et al., 2004](#); [Lindholm et al., 2004](#); [Vahsen et al., 2004](#)). Translocation de AIF initie l'apoptose cellulaire par clivage internucléosomique SNA à des fragments relativement larges. Translocation nucléaire AIF a été observé dans une variété de systèmes de culture cellulaire et des modèles animaux sujet à une variété de conditions de stress. La redistribution AIF détectée dans les cellules traitées EA, et aussi observée dans le modèle souris mutant G93A-SOD1 est plus probablement élicité par stress oxydative augmenté associé avec GSH diminué. Le GSH diminué couplé avec stress oxydative augmenté par G93A-SOD1 mutant qui facilite la translocation nucléaire AIF peut se trouver à la base de certains des événements liés au commencement de la SLA et à la progression.

L'augmentation dramatique dans le release cytochrome c vers cytosol a été détecté par le dosage de fractionnassions et l'analyse immun histochimique

(Illustration 6B and 6D) reflètent probablement l'activation augmentée de caspase 3, et conséquemment contribue à l'augmentation d'apoptose élicite par la réduction de GSH dans des cellules NSC34 (Illustration 7). Cytochrome c-à médiation activation caspase a aussi été montré à mener la dégénération neurones moteurs dans des souris SLA et des patients humains SLA (Guegan et al., 2001; Li et al., 2000).

GSH diminué est associé avec dégénération neurones moteurs et commencement de maladie comme SLA et progression dans le modèle souris transgénique G93A-SOD1

Plus récemment, des altérations de glutathionne S-transférase pi activité ont été rapporté dans des patients SLA (Kuzma et al., 2006; Usarek et al., 2005). Néanmoins, les effets de GSH à la dégénération neurones moteurs dans la SLA restent largement inconnus, même si des anomalies dans GSH sont associées avec des mécanismes pathologiques sous-entendus les pertes neuronales dans tous les deux la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. (Paik et al., 2003; Jha et al., 2000; Karelson et al., 2002; Cecchi et al., 1999). A ce point nous avons mesuré les niveaux GSH et GSSG dans les régions de la moelle épinière lombaire de souris transgéniques G93A-SOD1 dans trois étapes définies, c'est-à-dire, libre de maladie, commencement de maladie, et progression de maladie. Une diminution significative de GSH et une augmentation réciproque de GSSG se sont présentées dans les souris SLA pendant les étapes de la progression de la maladie. Le GSH diminué et la cascade résultante de réactions oxydatives peuvent alors contribuer à la mort de cellules neurones moteurs dépendant d'âge dans ce modèle de souris. Pour encore plus confirmer cette possibilité, le stress oxydatif augmenté a été clairement associé avec la dégénération neurones moteurs pendant le commencement de la maladie et la progression (Hall et al., 1998; Liu et al., 1998; Bogdanov et al., 1998; Jung et al., 2001). Plus sensiblement, traitement de souris transgéniques SLA avec des antioxydants comme SOD et mimétiques catalase (Jung et al., 2001), DMPO (Liu et al., 2002), irone porphyrine (Wu et al., 2003), ou manganèse porphyrine (Crow et al., 2005) retarde le commencement de la maladie et étend la survie. Alors, réduction de GSH et augmentation de GSSG, probablement change l'environnement intracellulaire redox, peut jouer un rôle active dans le dommage cumulative encouru par des neurones moteurs, et peut alors mener au commencement de maladie SLA et progression.

Il faut souligner que le stress oxydatif augmenté n'est pas la seule conséquence de la réduction de GSH intracellulaire. Diminution dans la biodisponibilité GSH peut aussi mener à l'activation de récepteurs glutamates, et à la mobilisation de calcium intracellulaire. Alors, réduction de GSH peut inciter plusieurs événements signalant, parmi lesquelles quelques uns peuvent

impliquer une induction de morte cellulaire (Illustration 10). Nonobstant, tels considérations, stress oxydative augmenté induit par réduction GSH se présente comme un événement tôt et durable qui contribue à la dégénération neurones moteurs tous les deux dans *in vitro* et *in vivo*.



Illustration 10

Les routes de transduction signal potentiel de déplétion GSH à médiation apoptose cellules neurones moteurs

En récapitulatif, nous avons montré que le stress oxydative augmenté est un phénomène fréquemment présent dans le moelle épinière de souris SLA G93A-SOD1 qui est temporairement associé au commencement de la maladie et la progression. Altération de GSH peut jouer un rôle important dans la facilitation de morte cellulaires neurones moteur par l'induction de routes pro-apoptiques. Ces résultats supportent en plus l'usage d'approches thérapeutiques antioxydants pour cibler les mitochondrie à une étape tôt pour retarder le commencement de la maladie SLA et la progression.

Remerciements

Nous voulons remercier Dr. Neil Cashman, University of Toronto pour fournir une ligne cellulaire pareil neurones moteurs NSC34. Cette étude était supportée par National Institutes of Health Grants AG23923, NS45829 et HL75034.

Abréviations

AIF	Apoptosis Inducing Factor
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
BSO	L-Buthionine Sulfoximine
DCF	Dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EA	Ethacrynic Acid
FBS	Fetal Bovine Serum
γ -GCS	γ -Glutamylcysteine Synthetase
GSH	Glutathione
GSSG	Oxidized Glutathione
MBM	Monobromobimane
PFA	Paraformaldehyde
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD1	Cu,Zn-Superoxide Dismutase
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Nick End Labeling

Références

1. Adams JD Jr, Klaidman LK, Odunze IN, Shen HC, Miller CA. Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide, and vitamin E. *Mol Chem Neuropathol*. 1991;14:213–226. [[PubMed](#)]
2. Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997;25:335–358. [[PubMed](#)]
3. Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:1037–1048. [[PubMed](#)]
4. Bishop A, Marquis JC, Cashman NR, Demple B. Adaptive resistance to nitric oxide in motor neurons. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:978–986. [[PubMed](#)]
5. Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z, Beal MF. Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 1998;71:1321–1324. [[PubMed](#)]
6. Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ*. 2004;11:591–595. [[PubMed](#)]
7. Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn*. 1992;194:209–221. [[PubMed](#)]
8. Cecchi C, Latorraca S, Sorbi S, Iantomasi T, Favilli F, Vincenzini MT, Liguri G. Glutathione level is altered in lymphoblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1999;275:152–154. [[PubMed](#)]
9. Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:806–819. [[PubMed](#)]
10. Crow JP, Calingasan NY, Chen J, Hill JL, Beal MF. Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice. *Ann Neurol*. 2005;58:258–265. [[PubMed](#)]
11. Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, Holsboer F, Boesiger P, Cuenod M. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci*. 2000;12:3721–3728. [[PubMed](#)]

12. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M, Chan PH. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*. 2000;20:2817–2824. [[PubMed](#)]
13. Grima G, Benz B, Parpura V, Cuenod M, Do KQ. Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: implication for schizophrenia. *Schizophr Res*. 2003;62:213–224. [[PubMed](#)]
14. Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2001;21:6569–6576. [[PubMed](#)]
15. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994;264:1772–1775. [[PubMed](#)]
16. Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Fleck TJ, Gurney ME. Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *J Neurosci Res*. 1998;53:66–77. [[PubMed](#)]
17. Janaky R, Ogita K, Pasqualotto BA, Bains JS, Oja SS, Yoneda Y, Shaw CA. Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS. *J Neurochem*. 1999;73:889–902. [[PubMed](#)]
18. Janaky R, Varga V, Saransaari P, Oja SS. Glutathione modulates the N-methyl-D-aspartate receptor-activated calcium influx into cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett*. 1993;156:153–157. [[PubMed](#)]
19. Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenamyre JT, Liu RM, Forman HJ, Andersen JK. Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. Implications for Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 2000;275:26096–26101. [[PubMed](#)]
20. Jung C, Rong Y, Doctrow S, Baudry M, Malfroy B, Xu Z. Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress and prolong survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model. *Neurosci Lett*. 2001;304:157–160. [[PubMed](#)]
21. Karelson E, Mahlapuu R, Zilmer M, Soomets U, Bogdanovic N, Langel U. Possible signaling by glutathione and its novel analogue through potent stimulation of fontocortical

- G proteins in normal aging and in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;973:537–540. [[PubMed](#)]
22. Keelan J, Allen NJ, Antcliffe D, Pal S, Duchon MR. Quantitative imaging of glutathione in hippocampal neurons and glia in culture using monochlorobimane. *J Neurosci Res.* 2001;66:873–884. [[PubMed](#)]
23. Kuzma M, Jamrozik Z, Baranczyk-Kuzma A. Activity and expression of glutathione S-transferase pi in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chim Acta.* 2006;364:217–221. [[PubMed](#)]
24. Lanius RA, Krieger C, Wagey R, Shaw CA. Increased [³⁵S]glutathione binding sites in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 1993;163:89–92. [[PubMed](#)]
25. Lee M, Hyun D, Jenner P, Halliwell B. Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative damage and antioxidant defences: relevance to Down's syndrome and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2001;76:957–965. [[PubMed](#)]
26. Li B, Xu W, Luo C, Gozal D, Liu R. VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;111:155–164. [[PubMed](#)]
27. Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science.* 2000;288:335–339. [[PubMed](#)]
28. Lindholm D, Eriksson O, Korhonen L. Mitochondrial proteins in neuronal degeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321:753–758. [[PubMed](#)]
29. Liu R, Althaus JS, Ellerbrock BR, Becker DA, Gurney ME. Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1998;44:763–770. [[PubMed](#)]
30. Liu R, Li B, Flanagan SW, Oberley LW, Gozal D, Qiu M. Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *J Neurochem.* 2002;80:488–500. [[PubMed](#)]
31. Lucas JH, Wheeler DG, Emery DG, Mallery SR. The endogenous antioxidant glutathione

- as a factor in the survival of physically injured mammalian spinal cord neurons. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57:937–954. [[PubMed](#)]
32. Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002;8:385–387. [[PubMed](#)]
 33. Nur-E-Kamal Gross SR, Pan Z, Balklava Z, Ma J, Liu LF. Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279:24911–24914. [[PubMed](#)]
 34. Paik SR, Lee D, Cho HJ, Lee EN, Chang CS. Oxidized glutathione stimulated the amyloid formation of alpha-synuclein. *FEBS Lett.* 2003;537:63–67. [[PubMed](#)]
 35. Parikh NA, Katsetos CD, Ashraf QM, Haider SH, Legido A, Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Hypoxia-induced caspase-3 activation and DNA fragmentation in cortical neurons of newborn piglets: role of nitric oxide. *Neurochem Res.* 2003;28:1351–1357. [[PubMed](#)]
 36. Rizzardini M, Lupi M, Bernasconi S, Mangolini A, Cantoni L. Mitochondrial dysfunction and death in motor neurons exposed to the glutathione-depleting agent ethacrynic acid. *J Neurol Sci.* 2003;207:51–58. [[PubMed](#)]
 37. Rosen DR, Sapp P, O'Regan J, Kenna-Yasek D, Schlumpf KS, Haines JL, Gusella JF, Horvitz HR, Brown RH Jr. Genetic linkage analysis of familial amyotrophic lateral sclerosis using human chromosome 21 microsatellite DNA markers. *Am J Med Genet.* 1994;51:61–69. [[PubMed](#)]
 38. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362:59–62. [[PubMed](#)]
 39. Roychowdhury S, Wolf G, Keilhoff G, Horn TF. Cytosolic and mitochondrial glutathione in microglial cells are differentially affected by oxidative/nitrosative stress. *Nitric Oxide.* 2003;8:39–47. [[PubMed](#)]
 40. Saunders PA, Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Subcellular distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cerebellar granule cells undergoing cytosine arabinoside-induced apoptosis. *J Neurochem.* 1997;69:1820–1828. [[PubMed](#)]
 41. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:1191–1212. [[PubMed](#)]

42. Seyfried J, Soldner F, Schulz JB, Klockgether T, Kovar KA, Wullner U. Differential effects of L-buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on glutathione levels and mitochondrial function in PC12 cells. *Neurosci Lett*. 1999;264:1–4. [[PubMed](#)]
43. Shaw CE, al-Chalabi A, Leigh N. Progress in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2001;1:69–76. [[PubMed](#)]
44. Shaw PJ, Eggett CJ. Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2000;247(Suppl 1):I17–I27. [[PubMed](#)]
45. Shibata N, Hirano A, Yamamoto T, Kato Y, Kobayashi M. Superoxide dismutase-1 mutation-related neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000;1:143–161. [[PubMed](#)]
46. Svardal AM, Mansoor MA, Ueland PM. Determination of reduced, oxidized, and protein-bound glutathione in human plasma with precolumn derivatization with monobromobimane and liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1990;184:338–346. [[PubMed](#)]
47. Tu PH, Gurney ME, Julien JP, Lee VM, Trojanowski JQ. Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease. *Lab Invest*. 1997;76:441–456. [[PubMed](#)]
48. Tukov FF, Rimoldi JM, Matthews JC. Characterization of the role of glutathione in repin-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress and dopaminergic neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neurotoxicology*. 2004;25:989–999. [[PubMed](#)]
49. Usarek E, Gajewska B, Kazmierczak B, Kuzma M, Dziewulska D, Baranczyk-Kuzma A. A study of glutathione S-transferase pi expression in central nervous system of subjects with amyotrophic lateral sclerosis using RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Neurochem Res*. 2005;30:1003–1007. [[PubMed](#)]
50. Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J*. 2004;23:4679–4689. [[PubMed](#)]
51. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:612–616. [[PubMed](#)]

52. Williams DB, Windebank AJ. Motor neuron disease (amyotrophic lateral sclerosis). *Mayo Clin Proc.* 1991;66:54–82. [[PubMed](#)]

53. Wu AS, Kiaei M, Aguirre N, Crow JP, Calingasan NY, Browne SE, Beal MF. Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2003;85:142–150. [[PubMed](#)]

54. Yan CC, Huxtable RJ. Fluorimetric determination of monobromobimane and o-phthalaldehyde adducts of gamma-glutamylcysteine and glutathione: application to assay of gamma-glutamylcysteinyl synthetase activity and glutathione concentration in liver. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995;672:217–224. [[PubMed](#)]