

Neurowetenschap. Auteurs manuscript; verkrijgbaar in PMC van 10 Augustus 2007.
Gepubliceerd in definitieve bewerkte vorm als:
[Neuroscience. 2007 February 9; 144\(3\): 991–1003.](#)
On-line gepubliceerd op 5 December 2006. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.09.064.
[Copyright notice](#) en [Disclaimer](#)

Uitputting van verminderd Glutathion verhoogt Motor Neuron degeneratie *in vitro* en *in vivo*

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

¹ Departement of Anatomy and Cell Biology, University van 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

*Corresponderend auteur: 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, Telefoon: (701)-777-2559, Fax: (701)-777-2477, E-mail: rliu@medicine.nodak.edu

Afdelingsredacteur: Dr. Werner Sieghart

De uitgevers definitief geredigeerde versie van dit artikel is verkrijgbaar op [Neuroscience](#).

[Publisher's Disclaimer](#)

Samenvatting

De werking van selectieve en leeftijds afhankelijke motor neuron degeneratie in de menselijke amyotrope lateraal sclerose (ALS) werd niet vastgelegd en de rol van glutathion (GSH) in combinatie met motor neuron sterfte blijft voornamelijk onbekend. Een cultuur systeem verwant aan het motor neuron en een transgenetisch muismodel werden gebruikt om het effect op de wijziging van het cellulair GSH op motor neuron cel sterfte te onderzoeken. Blootstelling van de NSC34 motor neuron verwante cellen aan het Ethacrynic zuur (EA) of L-Buthionine Sulfoximine verminderden het GSH niveau drastisch en werd vergezeld door een gestegen produktie van zuurstof reagerende species (ROS) gemeten door de DCF fluorescerend oxidatie analyse. Bovendien, GSH uitputting verminderde de oxidatieve stress tellers, AP-1 transcriptionele activatie, c-Jun, c-Fos en HO-1 uitdrukking in NSC34 cellen geanalyseerd door een luciferase rapporteur, westers blotting en respectievelijke kwantitatieve PCR analyses. De uitputting van GSH verminderde ook de mitochondriale functie, het bevorderde de plaatsverandering van de tot celdood veroorzakende factor, het vrijmaken van het cytochroom c en de caspase 3 activatie en leidde als gevolg tot de celdood van de motor neuron verwante cellen. In een ALS-soortgelijk transgenetisch muismodel met overexpressie van het G93A-SOD1 mutant gen, toonden we aan dat de vermindering van GSH in het ruggemerg en de motor neuron cellen in verband staan met AIF verplaatsing, caspase 3 activatie en motor neuron degeneratie gedurende het begin en het verloop van de ALS soortgelijke ziekte. Samengevat, de *in vitro* en *in vivo* gegevens voorgesteld in het huidige rapport toonden aan dat het verminderde GSH diverse wegen tot celdood ondersteunt en bijdraagt, op zijn minst gedeeltelijk, tot de motor neuron degeneratie in ALS.

Inleiding

Amyotropische lateraal sclerose (ALS) is een fatale neurodegeneratieve ziekte dat primair de motor neuronen in de hersencortex, de hersenstam en het ruggemerg aantast ([Williams and](#)

Windebank, 1991). De mechanismen die de selectieve en ouderdoms afhankelijke motor neuron degeneratie veroorzaken blijven grotendeels onverklaard. Een effectieve therapie voor ALS is nog steeds niet voorhanden. Mutaties van Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) genen veroorzaken motor neuron degeneratie en vormen een schakel tot 2-5% van de ALS gevallen (Rosen et al., 1994; Rosen et al., 1993). Gebaseerd op klinische studies, diermodellen en cel cultuur analyses, verschillende potentiële mechanismen van motor neuron degeneratie in ALS werden voorgesteld. Gestegen oxidatieve stress, glutamaat vergiftiging, eiwit groepering en Cu/Zn celvergiftiging werden allemaal genoemd als bijdragende factoren tot motor neuron degeneratie (Cleveland and Rothstein, 2001; Li et al., 2003; Liu et al., 2002; Shaw et al., 2001; Shaw and Eggett, 2000; Shibata et al., 2000). Hiervan blijkt gestegen oxidatieve stress een vroegtijdig en aanhoudend verschijnsel te zijn in combinatie met motor neuron sterfte in ALS (Bogdanov et al., 1998; Liu et al., 1998). Toch moet het specifiek mechanisme dat leidt tot oxidatieve beschadiging van motor neuronen nog steeds gedefinieerd worden. Oxidatieve stress kan potentieel verhoogd worden door versterkte productie van reactieve oxygen species (ROS), verlaagde antioxidant enzym systemen of een combinatie van beiden. Glutathione (GSH), een tripeptide van γ -glutamylcysteinylglycine, is één van de overvloedigste antioxidanten in cellen en weefsels. Vermindering van GSH versterkt ROS productie en bevordert oxidatieve beschadiging. Een voorgaande studie toonde gestegen GSH binding aan in het ruggemerg van patiënten met sporadische ALS (Lanius et al., 1993) en wijst er op dat GSH een rol kan spelen in de pathogenese van ALS. In een cel cultuur model werd aangetoond dat de uitdrukking van het SOD1 mutant gen het cellulair niveau van GSH verlaagde en dat de vermindering van GSH bioaanwezigheid een rol speelt in de mutant SOD1-bemiddelde motor neuron degeneratie (Lee et al., 2001).

GSH is de overvloedigste en effectiefste aaseter van ROS in zoogdiercellen. Daarnaast is GSH ook een belangrijke onderlaag voor antioxidant enzymes die hydrogeen peroxide ontgiften en lipide peroxide catalyseren bij glutathion peroxidase. Recenter werd ook aangetoond dat GSH deelneemt in cellulaire signaal transduktie wegen en de ionotropische receptor functies regelt (Bains and Shaw, 1997; Grima et al., 2003; Janaky et al., 1993). GSH is gesynthetiseerd in twee sequentiele enzymatische reacties versterkt door γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) en GSH synthetase. L-Buthionine Sulfoximine (BSO) is een selectieve remmer van γ -GCS. Blootstelling van cellen aan BSO remt GSH synthese en verlaagt het intracellulair niveau van GSH. BSO werd als gevolg regelmatig gebruikt om de rol van GSH in samenhang met oxidatieve stress-inducerende neuronale cellen en andere cel sterftes te bestuderen. Daarnaast, omdat BSO de mitochondriale en nucleaire GSH niet volledig uitput, werden andere middelen, zoals ethacrynic acid (EA) gebruikt om de cellulaire, mitochondriale en nucleaire GSH volledig uit te putten (Keelan et al., 2001; Rizzardini et al., 2003).

Veranderingen in GSH synthese, of in GSH pools, werden gekoppeld met neuronale cel sterfte en simuleerd een variëteit van humane neurodegeneratieve ziektes, zoals de ziekte van Parkinson (Bharath et al., 2002; Jha et al., 2000; Mytilineou et al., 2002; Paik et al., 2003), de ziekte van Alzheimer (Adams, Jr. et al., 1991; Cecchi et al., 1999; Janaky et al., 1999; Karelson et al., 2002) en Schizofrenie (Do et al., 2000). Niettegenstaande blijft de rol van

GSH in de pathogenese van motor neuron degeneratie in ALS grotendeels onverklaard. Als laatste concentreerden we ons op een cel cultuur systeem en een ALS-soortgelijk transgenetisch muismodel om het effect van GSH op de motor neuron cel sterfte te bestuderen. We toonden aan dat de vermindering van intracellulair GSH de oxidatieve stress verhoogt, de mitochondriale functie vermindert, de veelvoudige afstoting van celweefsels activeert en als gevolg bijdraagt tot motor neuron degeneratie in vitro en in vivo.

Materialen en Methodes

Chemicalien en Reagens

Ethacrynic acid (EA), L-Buthionine-SR-Sulfoximine (BSO) en andere chemicalien werden verkregen bij Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Cel cultuur middelen en andere reagens werden verworven bij Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA).

Dieren

Transgenetische muizen met het kenbaar gemaakt mutant G93A-SOD1 werden hoofdzakelijk verkregen bij het Jackson Laboratory (Stock #002726, Bar Harbor, ME).

De muizen werden verzorgd en gevoed in het Biomedisch Onderzoekingscentrum van de Medische faculteit aan de Universiteit van Noord Dakota.

Deze transgenetische muizen vertoonden een hoog aantal van het G93A-SOD1 mutant en ontwikkelden een snel begin en verloop van de ziekte (Gurney et al., 1994). De levensduur van de transgenetische G93A-SOD1 mutant muis werd, gebaseerd op de pathologische karakterisatie en symptomatische manifestatie, ingedeeld in het klinisch ziekte vrij stadium (eerste 60 levensdagen), het ziektebegin (tussen 70 en 90 levensdagen) en het ziekteverloop (tussen 100 en 130 levensdagen) (Gurney et al, 1994; Liu et al., 1998). De lumbale ruggemerg regionen van de G93A-SOD1 mutant en de leeftijdsoortgelijke controlemuis van deze verschillende stadia werden gebruikt voor GSH, GSSG en celdood analyses. De experimentele protocols, voor het gebruik van laboratorium dieren, werd goedgekeurd door het Institutional Animal Use and Care Committee en waren in nauwe overeenkomst met de richtlijnen voor de zorg en gebruik van laboratoriumdieren van het National Institutes of Health. Er werd uitzonderlijk op geacht dat de stress en het discomfort bij de dieren zo laag mogelijk gehouden werd. Slechts een minimaal aantal dieren werd gebruikt.

Cel kulturen en behandelingen

NSC34 motor neuron-soortgelijke cel muizen (15 tot 40 plaatsen) (verschaft door Dr. Neil Cashman, University of Toronto) werden gekultiveerd in een vochtige atmosfeer van 95% lucht-5% CO₂ in een 37°C incubator in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) aangevuld met 10% warmte geïnactiveerd foetaal runder serum (FBS), 100 eenheden/ml penicilline en 100 µg/ml streptomycine (DMEM complete medium) zoals voorheen beschreven werd (Bishop et al., 1999; Cashman et al., 1992). Het cel cultuur medium werd elke 3-4 dagen vervangen. De cellen werden, eens een samenvloeiing van 80-90% werd bereikt, uiteengerokken door 0.15% trypsine en 1 mM EDTA gedurende 3-5 minuten. Ontbonden cellen werden geproduceerd en in nieuwe cultuur schalen of flessen geplaatst

(Corning Life Sciences, NY).

GSH uitputting en GSH analyse

Twee onafhankelijke methoden, EA uitputting en BSO inhibitie werden gebruikt om het cellulair GSH respectievelijk te verminderen (Lucas et al., 1998; Roychowdhury et al., 2003; Seyfried et al., 1999; Tukov et al., 2004). In het kort, voor EA-bemiddelde GSH uitputting werden NSC34 cellen geïncubeerd met een EA concentratie van 20 tot 100 μM voor meer dan 12 uren. Voor BSO bemiddelde inhibitie van GSH synthese werden NSC34 cellen geïncubeerd met een BSA concentratie van 25 to 200 μM voor meer dan 48 uren. EA of BSO behandelde cellen werden verkregen en bewerkt voor een variëteit van analyses beschreven in de volgende hoofdstukken.

Twee onafhankelijke methoden werden uitgevoerd om het cellulair GSH te meten. Voor de colorimetrische analyse, controle, EA of BSO behandelde cellen werden geïncubeerd met 40 μM monobromobimane (MBM) gedurende 30 minuten. Nadien werd de fluorescente intensiteit gemeten met een fluorometer (Molecular Device Inc., Sunnyvale, CA) (Svardal et al., 1990; Yan and Huxtable, 1995). Een willekeurige eenheid van fluorescente intensiteit werd gebruikt om de relatieve niveaus van cellulaire GSH na EA of BSO behandelingen uit te drukken. Voor de biochemische analyses werd een Bioxytech GSH/GSSG-412 kit gebruikt en de door de fabrikant voorgestelde procedure werd gevolgd (Oxis International, Inc., Foster City, CA). In het kort, 10×10^6 NSC34 controle cellen, EA of BSO behandelde experimenten werden volledig gehomogeniseerd in een MES buffer [200 mM 2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid, 50 mM phosphate, en 1 mM EDTA, pH 6.0]. Na centrifuge aan 12,000g gedurende 10 min aan 4 °C werd de top ontnomen van eiwitten en verder gebruikt voor GSH (of GSSG) analyses met een reeds bereide cocktail buffer in overeenkomst met de voorstellen van de fabrikant. Dezelfde biologische analyses werden gebruikt om het niveau van GSH (of GSSG) in de lumbale ruggemerg omgeving van de G93A-SOD1 transgenetische muis en de leeftijdsovereenkomstige normale controle muizen te bepalen, dit zowel in het ziektevrij stadium, het ziektebegin en het ziekteverloop (Gurney et al., 1994).

Analyse van cellulaire productie van reactieve zuurstof species (ROS)

Een dichlorofluoresceïne (DCF) analyse werd gebruikt om de voortplanting van cellulaire zuurstof species (ROS) in NSC34 cellen te bepalen. In het kort, 2×10^5 controle, EA of BSO behandelde cellen/ goed gecultiveerd in een 96-well-plaat werden geïncubeerd met 100 μM van 6-Carboxy-2',7'-dichlorofluoresceïne diacetate (DCFH-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR) gedurende 1 uur in het donker. Nadien werden de cellen gemeten voor oxidatie van DCFH-DA in een fluorometer aan de excitatie en emissie van golflengtes van respectievelijk 485nm en 530nm. Data analyse werd uitgevoerd en beschreven door Wang en Joseph (Wang and Joseph, 1999).

De fluorescerende intensiteit dat de oxidatie van DCFH-DA bij ROS meet stelt de relatieve vaste status van ROS generatie in cellen voor.

Voorbijgaande transfectie en luciferase activiteits analyse

Voorbijgaande transfectie werd uitgevoerd met een electroporator (BTX, San Diego, CA) zoals voorheen beschreven (Liu et al., 2002). In het kort, 10×10^6 cellen werden geïncubeerd

met 50 µg vector controle en vector bevattende 2×AP-Luciferase plasmide DNA in 0.4 ml Opti-MEM (Invitrogen) dit op kamertemperatuur gedurende 10 minuten. Nadien werden de cellen geelectroporeerd door een laag voltage modus aan 240 V, 1 pulse, en 25 msec/V aan pulselengete. Na electroporatie werden de cellen op kamertemperatuur gehouden gedurende 30 minuten en vervolgens gecultiveerd in een volledig medium.

Adhesie analyse

24 well-platen werden tijdens de nacht beslagen met fibronectine, collageen of laminine in een respectievelijk 1×phosphate buffer oplossing (PBS). Na het wassen werden 2×10⁶ controle of EA behandelde cellen gecultiveerd in elke well van de plaat gedurende 12 uren. Het cel cultuur medium werd verwijderd en de wellen werden 2x kortstondig gewassen met 1×PBS. Cellen die vastkleefden aan het substraat werden losgemaakt met Trypsine en vervolgens geteld. Het percentage van vasthechting werd berekend door het aantal vastgehechte cellen aan elke behandelde plaat gedeeld door het totaal aantal bezaaide cellen (n=4).

Kwantitatieve Real-time PCR analyse van Gen Expressie

De controledrager of EA behandelde cellen werden verkregen en bewerkt voor RNA purificatie. Het totaal gezuiverd RNA voor kwantitatieve Real-time PCR analyse werd onderworpen aan RNase vrij DNase behandeling (Ambion, Austin, TX). Na het opmeten van de concentratie werd 1 microgram totaal RNA van elk monster gebruikt om de eerst gestrande cDNA te synthetiseren door het gebruiken van een superscript eerst gestrande synthese kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Real time PCR werd uitgevoerd met het MX4000 systeem (Stratagene, San Diego, CA). De voorwaartse en terugkerende Real-time PCR primeur voor amplificatie van HO-1 transcripten werden respectievelijk 5'-CTCACTGGCAGGAAATCATCCC-3' en 5'-GAGAGGTCACCCAGGTAGCG. De test was 5'-6-FAM(CACGCCAGCCACACAGCACTATGTAAAGC)BHQ-1-3'. Actine werd gebruikt als endogene controle. De voorwaartse en terugkerende Real-time PCR primeuren voor amplificatie van actine transcripten waren respectievelijk 5'-TACAATGAGCTGCGTGTGGC-3' en 5'-ATGGCTGGGGTGTGAAGGT-3'. De test was 5'-6-FAM (CACCTGTGCTGCTACCGAGGC) BHQ-1 3'.

Subcellulaire fractionatie

Voor subcellulaire fractionatie tussen mitochondria en cytosol, werd een licht aangepaste methode aangenomen (Fujimura et al., 2000). In het kort, controledrager of EA behandelde cellen werden verkregen op ijs. Na 2x wassen met ijs koud 1×PBS werden de cellen opnieuw uitgesteld in een lysis buffer (Fujimura et al., 2000) en gehomogeniseerd met een Dounce homogeniseerder op ijs voor 15–20 slagen. Na centrifuge aan 2000xg gedurende 5min werd de top getransfereerd naar een nieuwe tube en de rest werd opnieuw opgehangen met 1/5 volume van het originele Lysis buffer. Na een 2^e ronde van homogenisatie was de rest opgelost in een nieuwe Lysis buffer met 0.2% triton X-100 (mitochondriale fractie). De top (Cytosolic fractie) werd gecombineerd en opgeslagen in een vriezer aan -20°. Na het meten van de eiwit concentratie werd westers blotting uitgevoerd om de Cytochroom c loslating te analyseren. Simultaan werd een goed ontwikkelde aanpak voor subcellulaire fractie tussen mitochondria en kernen aangenomen (Nur-E-Kamal et al., 2004; Saunders et al., 1997). Westerse analyse werd uitgevoerd om de cytochroom c loslating en AIF translocatie te

analyseren.

Immunohistochemische analyse

Voor immunohistochemische bevestiging, de controledrager en EA behandelde cellen werden verkregen en 2x gewassen in ijs koud 1×PBS gevolgd door een fixatie in 4% paraformaldehyde (PFA) gedurende 1 uur op ijs. Na permeabilisatie met 0,2% triton X-100 in PBS en geblokkeerd met 10% geit serum werden de cellen gedurende de nacht geïncubeerd met specifieke antilichamen aan 4°C (AIF, cytochrome c en actief caspase 3 antilichamen werden allen gedilueerd aan 1:300; Chemicon Inc.). Secties werden 5x gewassen met 0,2% triton X-100 in PBS elk gedurende 5 minuten en dan geïncubeerd met specifieke secundaire antilichamen gepaard met Fluoresceïne of Rhodamine gedurende 2 uren in het donker en op kamertemperatuur. Na uitvoerig wassen werden de cellen geïncubeerd met 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) voor kern bevestiging en gemonteerd met een anti-fade medium. Alle beelden werden samengenomen en geanalyseerd met een Nikon optische microscoop (E800 model) uitgerust met de Spot digitale camera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) en de Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

Westers blotting analyse

Controledrager of EA behandelde cellen werden van de bronnen gescreend, en verkregen in ijskoud 1× PBS. De cellen werden dan gecentrifugeerd aan 2500×g aan 4°C gedurende 5 minuten. De top werd weg gegooid, en de cel rest werd opgehangen in een 400 µl ijskoud lysis buffer (10mM K₂HPO₄, pH 7.2/1mM EDTA/5mM EGTA/10mM MgCl₂/50mM Glycerophosphate/1mM Na₃VO₄/2mM DTT/1% Triton X-100) met complete protease inhibitor (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN). De cel lysisatie werd versneld in een tafel centrifuge aan 12,000×g aan 4°C gedurende 10 minuten, en de eiwit concentratie in de top werd gemeten door gebruik te maken van een BioRad eiwit analyse kit (BioRad, Hercules, CA). De eiwit monsters (20 µg) werden gescheiden in een 12.5% SDS PAGE gel en getransfereerd op een nitrocellulose membraan. Het membraan werd geblokkeerd met 5% droge melk opgelost in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) gedurende 1 uur aan kamertemperatuur op een shaker plaat en dan gedurende de nacht geïncubeerd met een specifiek antilichaam aan 4°C. Het membraan werd 3x gewassen gedurende elke keer 5 minuten met TBST aan kamertemperatuur en dan geïncubeerd met een secundair mierikswortel peroxidase (HRP)- gepaard antilichaam (KPL, Gaithersburg, MD) gedurende 1 uur aan kamertemperatuur. Het membraan werd 3x gewassen met TBST voor telkens 5 minuten en kenbaar gemaakt in ECL reagens (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ).

Cel viabiliteit analyses

Cel viabiliteit van NSC34 cellen op behandelingen werd bepaald door de trypaan blauw exclusie analyse. In het kort, cellen werden geïncubeerd met een 0,1% trypaan blauw verf gedurende 10 minuten aan kamertemperatuur en werden geteld op een hemacytometer met een microscoop. De cel viabiliteit werd uitgedrukt in het aantal levensvatbare cellen (verfuitsluiting) gedeeld door het totaal aantal cellen. Daarnaast werd cel levensvatbaarheid ook gemeten door de LDH loslatings analyse gebaseerd op de handleiding van de fabrikant (Sigma Chemicals, St. Louise, MO) om zo de trypaan blauw exclusie analyse te bevestigen.

Cel afstervings analyse

Gecontroleerde afstervings analyse of EA behandelde cellen werden uitgevoerd in samenhang met de instructies van de fabrikant en gebruik makend van de ELISA geformatteerde analyse dat histone geassocieerde DNA fragmenten opspoor (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN). Daarnaast werd ook een terminaal deoxynucleotidyl transferase-gemediateerd kerf en labeling (TUNEL) analyse uitgevoerd om zo afstervende cel sterfte te analyseren. Twee onafhankelijke celsterfte analyses verschafden gelijkaardige resultaten.

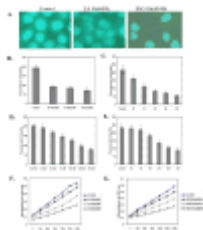
Statistische analyses

Waarden werden uitgedrukt als Mean \pm SE. Specifieke vergelijkingen tussen controle en individuele experimenten werden geanalyseerd door Student t-tests met een *p*-waarde van minder dan 0,5 beschouwd als statistisch significant.

Resultaten

Uitputting van intracellulair GSH in NSC34 motor neuron-soortgelijke cellen door chemische samenvoegings en biochemische inhibitie benaderingen

Een motor-neuron soortgelijk cel cultuur model (Cashman et al., 1992; Bishop et al., 1999) en een ALS-soortgelijk transgenetisch muis model (Gurney et al., 1994) werden gebruikt om de functie van GSH in motor neuron sterfte in samenhang met de ALS ziekte te bestuderen. In het cel cultuur systeem, 2 verschillende experimentele aanpakken, chemisch-gemediateerde uitputting en GSH synthese inhibitie, werden gebruikt om de cellulaire niveaus van GSH te verminderen. NSC34 cellen, blootgesteld aan EA en BSO, hadden dosis-afhankelijke en tijds-afhankelijke vermindering van cellulair GSH gemeten door de respectievelijke colorimetrische en biochemische analyse (Afbeelding 1A–1G).

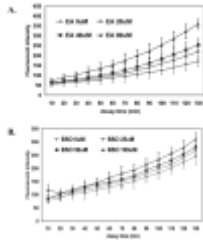


Afbeelding 1

Chemische uitputting van GSH productie en biochemische inhibitie van GSH synthese in NSC34 motor neuron soortgelijke cellen

GSH uitputting verhoogde de cellulaire productie ROS in NSC34 cellen

De DCF analyse werd toegepast om de kinetics van ROS productie in GSH uitgeputte cellen te meten (Wang and Joseph, 1999). Als aangetoond in Afbeelding 2, oxidatie van DCF steeg drastisch als het cellulair GSH uitgeput raakte door blootstelling aan cellen met een verschillende dosis van respectievelijk EA en BSO. EA verminderde schijnbaar het intracellulair GSH effectiever (Afbeelding 1) en promoot meer ROS productie (Afbeelding 2A) dan BSO (Afbeelding 2B). Bijgevolg, EA chemisch-gemediateerd GSH uitputting werd nadien gebruikt om de rol van GSH alteratie in motor neuron soortgelijk cel sterfte te bestuderen.

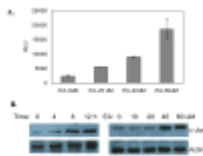


Afbeelding 2

GSH uitputting verhoogt productie van reactieve zuurstof species (ROS) in NSC34 cellen

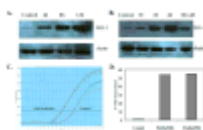
GSH reductie verhoogt oxidatieve stress markeerder gen-expressie

We onderzochten veranderingen in vroege en secundaire oxidatieve stress respons genen om de verhoogde oxidatieve stress, teweeggebracht bij GSH uitputting, te bevestigen. EA behandeling versterkt AP-1 transcriptionale activatie, waargenomen door een luciferase gen rapporteurs analyse ([Afbeelding 3A](#)), c-Jun ([Afbeelding 3B](#)) en c-Fos expressie (data worden niet getoond) als waargenomen door een westerse analyse. Op dezelfde manier, GSH uitputting verhoogd ook de HO-1 expressie zoals werd waargenomen door de respectievelijke kwantitatieve real-time PCR reactie en de westerse blotting analyses ([Afbeelding 4](#)).



Afbeelding 3

GSH uitputting door EA verhoogt vroege oxidatieve respons gen expressie

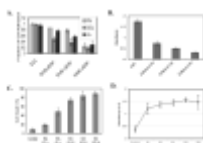


Afbeelding 4

GSH uitputting door EA verhoogt secundaire oxidatieve respons gen expressie

GSH uitputting verlaagt cel adhesie en verhoogt celsterfte

Cel adhesie aan de onderlaag is noodzakelijk voor het overleven van de cellen. Daarom testten we de effecten van GSH vermindering op NSC34 cel adhesie met drie belangrijke extracellulaire eiwitten, namelijk fibronectine, collageen en laminine. Zoals aangetoond in [Afbeelding 5A](#), cellen behandeld met EA toonden een dosis afhankelijke en tijds afhankelijke (data worden niet getoond) vermindering in adhesie tot deze drie extracellulaire eiwitten. Op dezelfde wijze verminderen cellen die blootgesteld staan aan EA de mitochondriale functie zoals gemeten door de MTT analyse ([Afbeelding 5B](#)) en verhoogden de cel sterfte zoals waargenomen door de respectievelijke Trypan blauw exclusie analyse en histon vrijlatings (cellsterfte) analyse ([Figure 5D](#)).



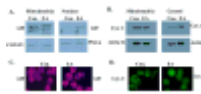
Afbeelding 5

GSH uitputting bij EA verhoogde NSC34 celsterfte

GSH uitputting promoot AIF redistributie, cytochroom c vrijlating, caspase 3 activatie en apoptose celsterfte

Een biochemische analyse en een immunohistochemische analyse werden gebruikt om de moleculaire wegen van celsterfte bij GSH uitputting te identificeren. Mitochondriale en nucleaire fractionaties gekoppeld met westerse analyse toonden een verhoging van AIF

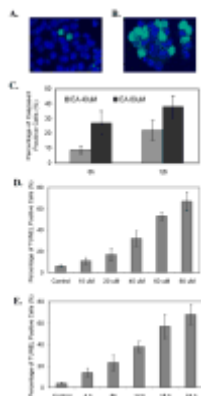
translocatie tot cellkernen als gevolg van GSH uitputting in NSC34 cellen (Afbeelding 6A). Immunohistochemische bevestiging bevestigden de verhoging van AIF translocatie tot de celkern vanaf de mitochondria tot GSH uitputting (Afbeelding 6B).



Afbeelding 6

GSH uitputting van EA promoot redistributie van pro-apoptose factoren in NSC34 cellen

Op dezelfde wijze, mitochondriale en cytosolische fractionatie gekoppeld met westers blotting analyse en immunohistochemie toonden aan dat cytochroom C vrijlating betrokken was in NSC34 celsterfte bij GSH uitputting (Afbeelding 6C, 6D). Activatie of caspase activiteit dragen bij tot apoptose celsterfte in verschillende systemen, inclusief CNS (Parikh et al., 2003). GSH uitputting verhoogde de caspase-3 activatie onthuld door immunohistochemische bevestiging met het anti-actieve caspase-3 antilichaam (Afbeelding 7A–7C). Bovendien versterkt GSH vermindering celsterfte zoals vastgesteld door de histon vrijlatings analyse (Afbeelding 5D) en terminale deoxynucleotidyl transferase-bemiddelde nick end labeling (TUNEL) analyse (Afbeelding 7D en 7E) in NSC34 cellen.

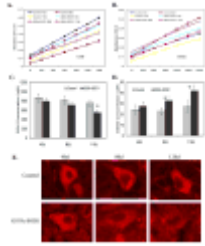


Afbeelding 7

GSH uitputting door EA promoot apoptose in NSC34 cellen

Reduktie van GSH en verhoogd GSSG in het ruggemerg van de G93A-SOD1 transgenetische muis hing samen met motor neuron sterfte en het ALS-soortgelijke ziektebegin en -verloop

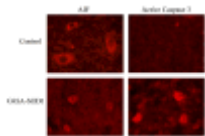
Het goed-bevestigd mutant G93A-SOD1 transgenetisch muismodel van de ALS-soortgelijke ziekte werd gebruikt om de niveaus GSH in de loop van het ALS ziekte begin en –verloop te analyseren. Vergeleken met de normale leeftijdscontrole muizen waren de GSH niveaus in de lumbale omgeving licht verminderd bij het ziektebegin, en waren significant lager gedurende het ziekteverloop in G93A-SOD1transgenetische muizen (Afbeelding 8A en 8C). Anderzijds waren de geoxideerde GSH (GSSG) niveaus significant hoger gedurende zowel het ALS-soortgelijk ziektebegin en –verloop (Figure 8B and 8D).



Afbeelding 8

GSH niveaus in de G93A-SOD1 ziektevrije transgenetische mutant muizen (45 levensdagen), in het ziektebegin (80 levensdagen) en het ziekteverloop (110 levensdagen) vergeleken met de normale controlemuizen

Vergeleken met controlemuizen van gelijke leeftijd verminderden de intracellulaire GSH niveaus in motor neuron cellen in de G93A-SOD1 transgenetische muizen zowel bij het ALS-soortgelijk ziektebegin en –verloop (Afbeelding 8E). Verminderd GSH was gekoppeld met AIF nucleaire translocatie, caspase 3 activatie en motor neuron celsterfte, en motor neuron celsterfte (Afbeelding 9) in ALS soortgelijke transgenetische muizen.



Afbeelding 9

Redistributie van AIF en actieve caspase 3 in motor neuron cellen van ALS-soortgelijke muizen

Discussie

Verscheidende wetenschappelijke getuigenissen verklaren dat verhoogde oxidatieve stress een belangrijke rol speelt in motor neuron degeneratie dat leidt tot het ALS ziektebegin en –verloop (Hall et al., 1998; Tu et al., 1997). Toch blijft de oorzaak van verhoogde oxidatieve stress en hoe oxidatieve stress bijdraagt tot motor neuron degeneratie hoofdzakelijk onbekend. Daarbij komt dat het verband tussen alteraties in de intracellulaire GSH niveaus en motor neuron sterfte niet bepaald werden. De huidige studie werd uitgevoerd om de moleculaire processen van het verminderd GSH-bemiddeld motor neuron celsterfte (of motor neuron soortgelijk) te analyseren door het gebruik maken van een cel cultuur model en een muis model wat menselijk ALS recapituleert. De gegevens voorgesteld in deze studie tonen drie belangrijke elementen aan: 1) Verhoogde oxidatieve stress bij alteratie van intracellulaire GSH niveaus hing samen met motor neuron soortgelijke celsterfte (apoptose) in vitro en in vivo; 2) Vermindering in GSH hing samen met redistributie van AIF van de mitochondria naar de kernen; 3) Cytochroom c-bemiddeld caspase 3 activatie, onthuld door GSH vermindering droeg ook bij tot motor neuron celsterfte (apoptose). De vermindering van GSH blijkt dus een belangrijke factor te zijn geassocieerd met motor neuron degeneratie in ALS bij activatie van multiple apoptose wegen.

Cel cultuur en transgenetische muis modellen om de rol van gewijzigd GSH in motor neuron degeneratie te bestuderen

Een cel cultuur model werd gebruikt als initiële stap om de rol van GSH alteratie in motor neuron soortgelijke celsterfte te testen door het gebruik maken van zowel biochemische inhibitie en chemische uitputtings benaderingen om de cellulaire beschikbaarheid van GSH te verminderen (Afbeelding 1). BSO is een inhibitor van γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) die de GSH synthese blokkeert. Blootstelling van cellen aan BSO leidt tot de reductie van cytosolic GSH, maar niet tot mitochondriale GSH. EA, een thiol reactieve molecule, paart

onmiddellijk met GSH en vermindert intracellulaire en mitochondriale niveaus van GSH (Schafer and Buettner, 2001). Om deze reden concentreerden we ons op een EA benadering tot het uitputten van intracellulair GSH en op het bestuderen van gestegen oxidatieve stress bij motor neuron soortgelijke celsterfte.

We gebruikten ook een G93A-SOD1 transgenetisch mutant muis model om de rol van GSH in motor neuron degeneratie te analyseren (Gurney et al., 1994). De levensduur van de ALS-soortgelijke muizen werden in drie stadia ingedeeld, namelijk, het ziektevrij stadium (voor 60 dagen oud), het stadium van ziektebegin (70-90 dagen oud) en het stadium van ziekteverloop (100-130 dagen oud) (Liu et al., 1998; Gurney et al., 1994). Gebaseerd op de goed ontwikkelde pathologische ontwikkelingen analyseerden we de niveaus van GSH in de lumbale omgeving van de G93A-SOD1 transgenetische mutant muizen tijdens de verschillende stadia, en vergeleken ze verder met de leeftijdsovereenkomstige normale controle muizen. Daarbij komt dat we ook een immunohistochemische methode toepasten om de GSH veranderingen in de motor neuron cellen van de G93A-SOD1 transgenetische mutant muizen en de leeftijdsovereenkomstige controle muizen te analyseren. De combinatie van het cel cultuur model en het transgenetisch muismodel staan bij tot delineatie van de potentiale bijdrages van gestegen oxidatieve stress bij de vermindering van intracellulair GSH tot motor neuron sterfte (apoptose) in ALS.

Vermindering van GSH verhoogde oxidatieve stress en veroorzaakte motor neuron soortgelijke cel apoptose

GSH is de overvloedigste en effectiefste cellulaire antioxidant. Alteraties in GSH resulteerden regelmatig in redox veranderingen. Zoals getoond in [Afbeelding 1](#), blootstelling van NSC34 cellen aan BSO of EA verminderden het cellulair GSH drastisch wat werd gemeten door biochemische en colorimetrische analyses. GSH is biosynthetiseerd van L-glutamaat en gecatalyseerd door γ -GCS en glutathion synthetase (GS) in cytosol. Verschillende organellen bevatten hun eigen GSH pools die tijdelijk onafhankelijk zijn van cytosolische GSH synthese. Bijvoorbeeld beide, zowel de mitochondria als de kernen hebben hun eigen GSH pools, waarbij BSO behandeling het GSH niet uit deze pools uitput, terwijl EA dat wel doet. Verminderd GSH verandert de redox status tot een meer geoxideerde status in de cel cultuur experimenten. Zoals aangetoond in [Afbeelding 2](#) verhoogt GSH vermindering ROS generatie drastisch zoals gemeten in de DCF analyse. Daarbij komt dat GSH uitputting de uitdrukking van vroege oxidatieve stress markeerders, c-Jun, c-Fos (gegevens worden niet getoond) en AP-1 activatie ([Afbeelding 3](#)), en secundaire oxidatieve stress markeerders zoals HO-1 uitdrukking ([Afbeelding 4](#)) verhoogt. Samengevat tonen deze experimenten duidelijk aan dat een verlaagde GSH beschikbaarheid leidt tot een verhoogde intracellulaire oxidatieve stress propagatie, bijvoorbeeld, eiwit oxidatie, vet peroxidatie en kern acide oxidatie (gegevens worden niet getoond).

De geoxideerde cellulaire omgeving, teweeggebracht door GSH uitputting, resulteerde tot de onmogelijkheid van cellen om te kleven aan extracellulaire matrix eiwitten ([Afbeelding 5A](#)). De mogelijkheid van cellen om te kleven aan de eiwitlaag is essentieel voor het overleven van cellen. Verlies van celadhesie kan leiden tot aansluitend celsterfte. Inderdaad, GSH vermindering veroorzaakt mitochondriale dysfunctie ([Afbeelding 5B](#)) en celsterfte ([Afbeelding 5C en 5D](#)).

Om het celsterfte mechanismus, potentieel veroorzaakt door GSH uitputting te identificeren, bepaalden we de AIF redistributie, en vonden dat er een verhoging van AIF translocatie van de mitochondria naar de kernen was ten opzichte van GSH uitputting (Afbeelding 6A–6C). AIF is een flavoproteïne dat resideert in het mitochondriaal intermembraan (Cande et al., 2004; Lindholm et al., 2004; Vahsen et al., 2004).

Translocatie van AIF initieert cel apoptose door het scheiden van internucleosomaal DNA tot relatief grote fragmenten. AIF nucleaire translocatie werd geobserveerd in een variëteit van cel cultuur systemen en diermodellen onderworpen aan een variëteit van stress condities. De AIF redistributie ontdekt in EA behandelde cellen, en ook geobserveerd in het G93A-SOD1 mutant muis model is hoogstwaarschijnlijk ontlokt door verhoogde oxidatieve stress gecombineerd met een verlaagd GSH. De verlaagde GSH gekoppeld met verhoogde oxidatieve stress bij het G93A-SOD1 mutant dat AIF nucleaire translocatie vergemakkelijkt kan aan de grondslag liggen van verschillende gebeurtenissen gelinkt aan het ALS ziekte begin en –verloop.

Het dramatisch verhogen van cytochroom c vrijlating tot cytosol waargenomen door de fractionerings analyse en de immunohistochemische analyse (Afbeelding 6B en 6D) weerspiegelt hoogstwaarschijnlijk de activatie van caspase 3, en draagt als bijgevolg bij tot de duidelijk gemarkeerde verhoging van apoptose ontlokt door de vermindering van GSH in NSC34 cellen (Afbeelding 7). Het werd ook aangetoond dat cytochroom c-bemiddelde caspase activatie leidt tot motor neuron degeneratie in de ALS-soortgelijke muis en de menselijke ALS patienten (Guegan et al., 2001; Li et al., 2000).

Verlaagd GSH is gekoppeld aan motor neuron degeneratie en het ALS soortgelijk ziektebegin en –verloop in het G93A-SOD1 transgenetisch muismodel

Alteraties van glutathione S-transferase pi activiteit werden onlangs waargenomen in ALS patienten (Kuzma et al., 2006; Usarek et al., 2005). Niettemin blijven de effecten van GSH op motor neuron degeneratie in ALS hoofdzakelijk onbekend, ook al zijn abnormaalheden in GSH gekoppeld aan pathofysiologische mechanismes die aan de grondslag liggen van neuronale verliezen in zowel de Parkinson als in de Alzheimer ziekte (Paik et al., 2003; Jha et al., 2000; Karelson et al., 2002; Cecchi et al., 1999). Tot hier meetten we de GSH en de GSSG niveaus in de lumbale ruggemerg zone van de G93A-SOD1 transgenetische muizen in drie bepaalde stages, namelijk het ziektevrije stadium, het ziektebegin en het ziekteverloop. Een significante verlaging van GSH en reciprocale verhoging van GSSG werden aangetroffen in de ALS soortgelijke muizen gedurende de verschillende stages van het ziekteverloop. Het verlaagde GSH en resulterende cascade van oxidatieve reacties kan hierdoor bijdragen tot de leeftijdsafhankelijke motor neuron celsterfte in deze muismodellen. Om deze mogelijkheid verder te bewijzen werd verhoogde oxidatieve stress duidelijk gekoppeld aan motor neuron degeneratie gedurende het ziektebegin en het ziekteverloop (Hall et al., 1998; Liu et al., 1998; Bogdanov et al., 1998; Jung et al., 2001). Nog belangrijker is de behandeling van ALS soortgelijke transgenetische muizen met antioxidanten, zoals SOD en catalase mimetics (Jung et al., 2001), DMPO (Liu et al., 2002), iron porphyrin (Wu et al., 2003), of manganese porphyrin (Crow et al., 2005) die het ziektebegin vertragen en de overlevingskansen verhogen. De vermindering van GSH en de verhoging van GSSG veranderen dus hoogstwaarschijnlijk de intracellulaire redox omgeving, kunnen een actieve rol spelen in de

opeengestapelde beschadiging opgelopen door motor neuronen en kunnen daardoor leiden tot het ALS ziektebegin en het ALS ziekteverloop.

Het zou moeten betoond worden dat de verhoogde oxidatieve stress niet het enige gevolg is dat veroorzaakt wordt door de vermindering van intracellulair GSH. Vermindering in GSH biobeschikbaarheid kan ook leiden tot de activatie van glutamaat receptoren en mobilisatie van intracellulair calcium. Vermindering van GSH kan dus ook verschillende alarmerende gebeurtenissen met zich meebrengen waarvan sommige celsterfte tot gevolg kunnen hebben (Afbeelding 10). Desondanks zulke overwegingen verschijnt verhoogde oxidatieve stress veroorzaakt door GSH vermindering als een vroege en duidelijke gebeurtenis dat bijdraagt tot motor neuron degeneratie zowel in vitro als in vivo.



Afbeelding 10

De potentieel signaal transductie wegen van de GSH uitputtings-bemiddelde motor neuron cel apoptose

Samengevat: We toonden aan dat verhoogde oxidatieve stress een frequent fenomeen is dat voorkomt in het ruggemerg van de G93A-SOD1 ALS soortgelijke muizen en dat tijdelijk geassocieerd is met het ziektebegin en het ziekteverloop. Alteratie van GSH kan een belangrijke rol spelen in het vergemakkelijken van motor neuron celsterfte via inductie van pro-apoptose wegen. Deze bevindingen droegen bij tot het gebruik van effectieve anti-oxidans therapeutische aanpakken die doelen op mitochondria in het vroege stadium tot het vertragen van het ALS ziektebegin en –verloop.

Erkenningen

We zijn Dr. Neil Cashman van de Universiteit van Toronto dankbaar voor het verschaffen van de NSC34 motor neuron-soortgelijke cel lijn. Deze studie werd ondersteund door het National Institutes of Health Grants AG23923, NS45829 en HL75034.

Afkortingen

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| AIF | Apoptosis Inducing Factor |
| ALS | Amyotrophic Lateral Sclerosis |
| 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

Referenties

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, Caliendo 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, Duchen 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](#)]