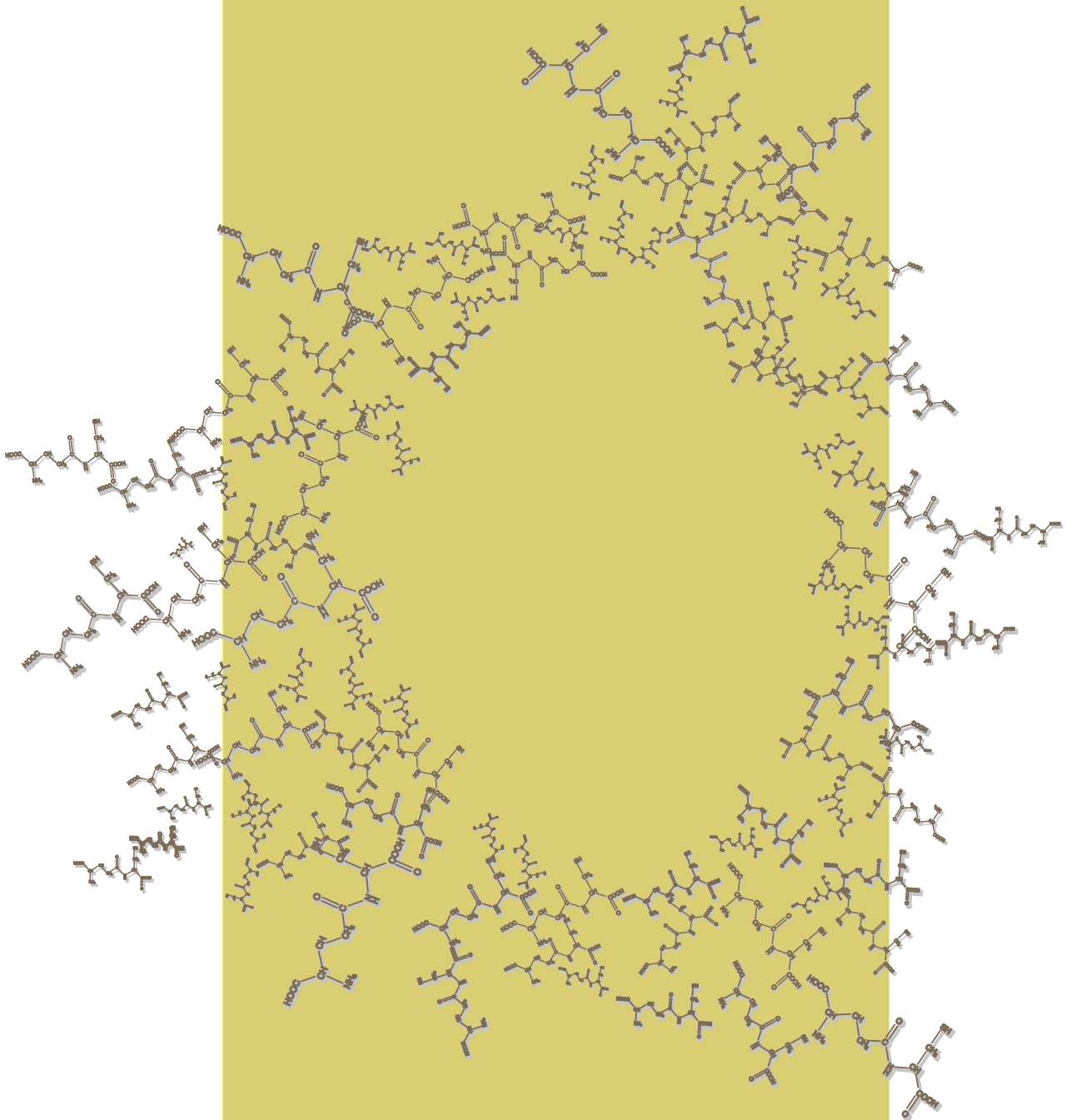


Universidad de Salamanca

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular /
Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL)

2012

FUNCIÓN ANTIOXIDANTE DE LA γ -GLUTAMILCISTEÍNA MITOCONDRIAL. APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA NEUROPROTECTORA



Rubén Quintana Cabrera

Directores: Juan Pedro Bolaños Hernández / Ángeles Almeida Parra



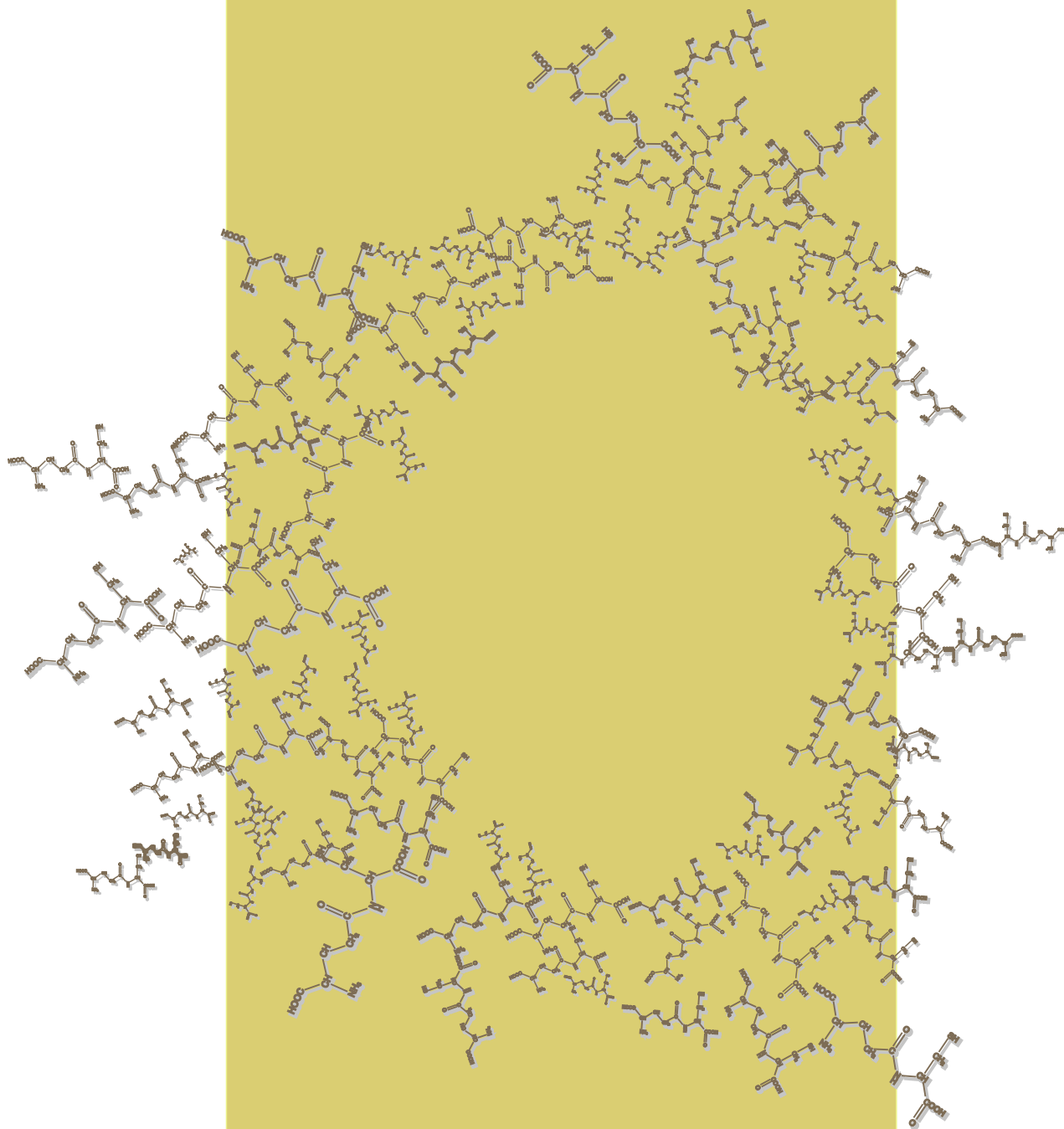
UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

University of Salamanca

Department of Biochemistry and Molecular Biology /
Institute of Neurosciences of Castilla y León

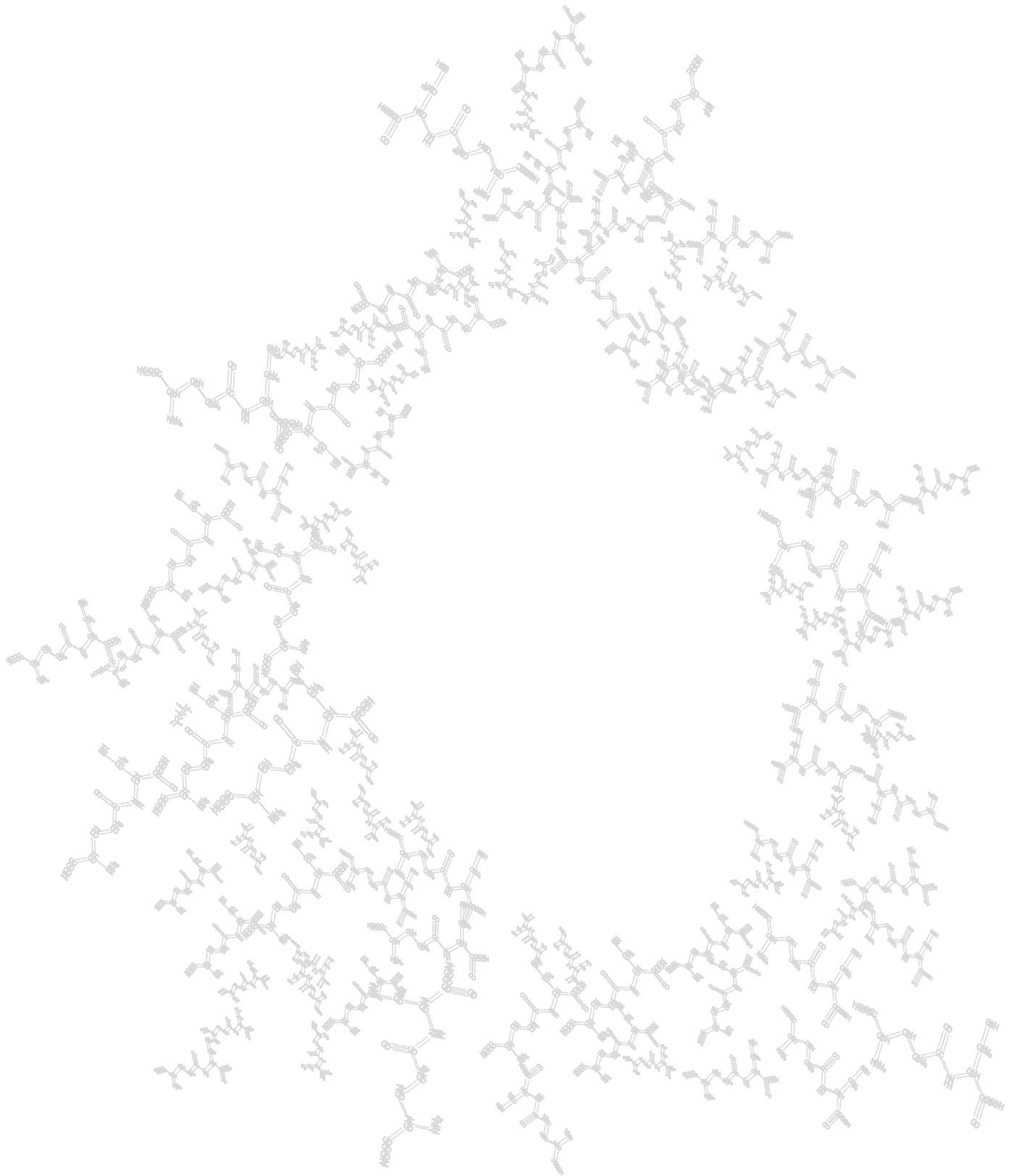
2012

**ANTIOXIDANT FUNCTION OF MITOCHONDRIAL GAMMA-GLUTAMYL-CYSTEINE.
APPLICATION IN NEUROPROTECTIVE GENE THERAPY**



Rubén Quintana Cabrera

Directors: **Juan Pedro Bolaños Hernández / Ángeles Almeida Parra**



VNIVERSITAS
STVDII
SALAMANTINI



La respiración mitocondrial es esencial para la supervivencia de los seres vivos aerobios. Sin embargo, bajo determinadas condiciones, la mitocondria genera en exceso especies reactivas de oxígeno que, de no ser eliminadas eficazmente por los sistemas antioxidantes, se desencadena un proceso citotóxico denominado estrés oxidativo. Las enfermedades neurodegenerativas cursan con estrés oxidativo, en muchas ocasiones debido a que uno de los antioxidantes más importantes (glutati6n), es deficitario en las neuronas.

En esta Tesis Doctoral describimos, por primera vez, que el precursor de la biosíntesis de glutati6n, γ -glutamilcisteína, expresa funciones antioxidantes, tal y como lo hace el glutati6n, al actuar como un cofactor de la glutati6n peroxidasa-I. Dirigiendo, mediante t6cnicas genéticas, la biosíntesis de γ -glutamilcisteína a la mitocondria, demostramos que se puede conseguir supervivencia neuronal y prevenci6n de la neurodegeneraci6n in vivo por estrés oxidativo. Nosotros pensamos que estos resultados tienen implicaciones muy relevantes para nuestro mejor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la neurodegeneraci6n, así como de las estrategias génicas en las enfermedades neurodegenerativas.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**Función antioxidante de la
 γ -glutamilcisteína mitocondrial.
Aplicación en terapia génica
neuroprotectora**

-TESIS DOCTORAL-

RUBÉN QUINTANA CABRERA

Salamanca, 2012



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

**Función antioxidante de la
 γ -glutamylcisteína mitocondrial.
Aplicación en terapia génica
neuroprotectora**

Memoria presentada por Rubén Quintana Cabrera
para optar al Título de *Doctor Europaeus*

Directores:

Prof. Dr. D. Juan Pedro Bolaños Hernández

Prof^a. Dra. D^a. Ángeles Almeida Parra

2012



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
DE CASTILLA Y LEÓN

**Función antioxidante de la
 γ -glutamilcisteína mitocondrial.
Aplicación en terapia génica
neuroprotectora**

RUBÉN QUINTANA CABRERA

Salamanca, 2012



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Juan Pedro Bolaños Hernández, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca, y Ángeles Almeida Parra, Profesora Asociada adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca e Investigadora del SNS (Hospital Universitario de Salamanca)

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Función antioxidante de la γ -glutamilcisteína mitocondrial. Aplicación en terapia génica neuroprotectora”**, que ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Farmacia D. Rubén Quintana Cabrera, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, de la Universidad de Salamanca. En nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendida y optar al Título de *Doctor Europaeus*.

Salamanca, a 12 de enero de 2012

VNIVERSITAS
STVDII
SALAMANICENSI

Fdo.: Juan Pedro Bolaños Hernández

Fdo.: Ángeles Almeida Parra

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral se encuentran en vías de publicación en revistas científicas. Parte de los mismos han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas

XXX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.
Málaga. 2007

V Congreso de Neurociencias de Castilla y León.
Ponferrada (León). 18-20 de septiembre de 2008.

XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular
Oviedo. 23-26 de septiembre de 2009.

III Workshop Rosasnet. Meeting on Reactive Oxygen Species and Systems.
Salamanca. 18-19 de mayo de 2010

Intenational Symposium on the Phathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species.
Salamanca. 19-21 de mayo de 2010.

XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular
Córdoba. 14-17 de septiembre de 2010

11th FEBS Young Scientist Forum “Biochemistry for tomorrow’s medicine”.
Turín (Italia), 23-25 de junio de 2011.

36th FEBS Congress “Biochemistry for tomorrow’s medicine”.
Turín (Italia), 25-30 de junio de 2011.

23rd Biennal Meeting ISN-ESN. (International - European Society for Nerochemistry)
Atenas, 8 agosto-1 septiembre de 2011.

A mis padres

A Tere

Agradecimientos

Toda historia tiene su principio y, para hacerla realidad, hacen falta múltiples ingredientes. Esta historia es la de mi Tesis Doctoral, y como no podía ser menos, necesita de un engranaje perfecto, compuesto por personas que han contribuido de una u otra manera a que sea una realidad. Siempre he procurado hacerlo personalmente, pero no hay palabras para expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas ellas. Aunque no cite todos sus nombres, quiero que se sientan identificadas en esta Memoria.

A Juan Pedro Bolaños, por su gran calidad como científico y director de esta Tesis. Admiro tu profesionalidad, entrega y capacidad para encontrar siempre la idea más brillante. Gracias por hacerlo todo tan fácil y permitirme disfrutar realmente de la ciencia.

A Ángeles Almeida, por la seguridad que transmite y su habilidad para encontrar lo que otros no ven y demostrarlo de una forma elegante.

Gracias a Emilio Fernández, por las charlas, el apoyo incondicional y por buscar el detalle de las cosas.

A Luca Scorrano, por darme todas las facilidades para investigar en su laboratorio, aconsejarme y acogerme como a uno más de su grupo. Gracias a todos los chicos de Ginebra, por el gran ambiente de trabajo, las cenas, las mudanzas, el “moeelleaux au chocolat” y porque demostrarme que en tres meses se pueden hacer buenos amigos.

A Ralf Dringen y João Laranjinha, por sus gratificantes palabras y evaluación de esta Tesis.

Quiero agradecer también la labor encomiable de los que colaboraron en la realización del artículo y por la gran implicación y dedicación que han mostrado. A Juan Pedro y Ángeles porque lo han dirigido de manera impecable. A Juan Sastre por la revisión, acertados comentarios y porque sin su colaboración no hubiera sido tan fácil llegar al fondo de la cuestión. A Javi Escobar, por su gran disposición y por el trabajazo que ha

hecho. A Rafael Radi por el análisis meticuloso del artículo y por sus sugerencias. A mis compañeros de laboratorio, porque han realizado una labor titánica, haciendo que todo saliera a la primera aunque pareciese imposible. Gracias por implicarse tanto y saber sobrellevar la presión, no tengo palabras para agradecerlo.

A mis compañeros de laboratorio, tanto a los que están ahora como a los que estuvieron haciendo la tesis o sólo de pasada, cada uno de ellos ha puesto su granito de arena de una u otra forma. En estos años me han demostrado que además del inmejorable compañerismo, y de formar un gran grupo, son algo más importante: grandes amigos.

Gracias por todo lo que he aprendido de vosotros, no sólo en lo profesional (sin ustedes, este trabajo no sería más que un boceto), sino en lo personal. Gracias por enseñarme realmente cómo se trabaja en un laboratorio, por toda la ayuda prestada, por los protocolos (originales), por compartir su mesa cuando hacía mis rotaciones por el 102, por hacerme escuchar el “infratono”. Han sido esenciales los chistes malos y buenos (–BSArriba BSAbajo–), los partidos de fútbol (cuando no juega el Barça), las risas en la cabina de cultivo y fuera de ella, las risas en metralleta, los comentarios de pelis (Haneke es muy pesado), el desparpajo, los “besiños” y los “majo”, las MIDIS (las dos de siempre). Gracias por las risas, los consejos, las excursiones patéticas, los cumpleaños, las cenas... e incluso gracias por la vara (de reñir) y por soportar mi cansinismo.

Agradezco también la colaboración de aquellas personas externas a nuestro laboratorio, que han hecho sugerencias y han colaborado con la parte experimental. A Tomy y Victoria por la ayuda con las prácticas y el soporte técnico. A los profesores y becarios del Departamento y de la Universidad, por los consejos, amistad y por estar siempre dispuestos a echar un cable.

A mis amigos en Salamanca. Aunque poco a poco han ido emigrando, siempre están ahí. Ellos me han hecho sentir como en casa, siendo como hermanos, con los que he crecido como persona y he compartido una de las mejores etapas de mi vida.

A mis amigos de Las Palmas. Mis amigos de siempre, incondicionales a pesar de la distancia. Porque siempre quieren que vuelva y porque aunque pase el tiempo, podemos seguir hablando desde lo habíamos dejado el último día.

Gracias a mi familia, porque siempre van conmigo. A mis padres, de los que estoy muy orgulloso. Gracias por hacerme ser quien soy, por los valores, la fuerza, el cariño y estar siempre ahí, apoyando mis decisiones, dándome todo y más para que esto sea una realidad. A la mejor hermana del mundo, porque para mí eres única. A mi abuelo, al que adoro, por estar siempre a mi lado enseñándome tantas cosas.

A Tere. Nadie como tú conoce el día a día de esta Tesis. Tú me das ánimos cuando lo necesito y eres más feliz que nadie cuando salto de alegría. Nadie como tú sabe comprenderme y encontrar la palabra que necesito en cada momento para hacerme ser yo mismo. Mis éxitos son los tuyos, porque tú me haces grande.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1. Estrés oxidativo	3
1.1. Estrés oxidativo mitocondrial y neurodegeneración.....	5
1.2. Sistemas antioxidantes celulares.	8
2. El glutatión en el organismo	9
2.1 El glutatión en la mitocondria.	11
3. Funciones de GSH.....	11
3.1. Funciones de GSH en la mitocondria.....	14
2.1.1. <i>Modulación de proteínas mitocondriales.</i>	14
3.1.2. <i>Importancia de GSH mitocondrial en la apoptosis.</i>	15
3.1.3. <i>GSH mitocondrial y neurodegeneración.</i>	15
3.1.4. <i>GSH mitocondrial y envejecimiento.</i>	16
4. Biosíntesis de glutatión.	16
4.1. Biosíntesis de GSH en el Sistema Nervioso.....	18
4.2. Moduladores de la síntesis de GSH.....	19
5. Enzimas del metabolismo de GSH	21
5.1 Glutamato Cisteína Ligasa (GCL).....	21
5.1.1 <i>Regulación de GCL</i>	22
5.1.2. <i>Deficiencia de GCL.</i>	24
5.2. Glutatión Sintetasa (GSS).	25
5.2.1 <i>Regulación de la GSS.</i>	25
5.2.2 <i>Deficiencia de GSS.</i>	26
5.3. γ -glutamil transpeptidasa (GGT).....	26
5.4. Glutatión S-transferasa (GST).....	27
5.5. Glutatión peroxidasa (GPx).....	28
5.5.1. <i>GPx1</i>	31
5.5.2. <i>GPx-4</i>	31
5.6. Glutatión reductasa (GSR).	32
5.7. Glutarredoxinas (GRX).	33
5.8. Enzimas que utilizan GSH en la mitocondria.....	33
6. Transporte y metabolismo del GSH.....	34
6.1 Transporte y regulación de GSH mitocondrial.....	36
6.3. Ciclo γ -glutamilo.....	37

7. γ-glutamilcisteína y otros intermediarios del metabolismo del GSH.	39
7.1. Utilización celular de γ GC y otros dipéptidos.	41
8. El GSH y otros antioxidantes como estrategia terapéutica.	41
HIPÓTESIS Y	45
OBJETIVOS	45
Hipótesis.....	47
Objetivos	48
MATERIAL Y	49
MÉTODOS	49
1. Cultivos celulares.	51
1.1. Especies ensayadas, condiciones del animalario y control de la edad gestacional.	51
1.2. Cultivo primario de neuronas.	51
1.3. Líneas celulares y células inmortalizadas.	53
1.3.1. HEK293T.....	53
2. Diseño y construcción de vectores de expresión - RNA de interferencia.	53
2.1. Silenciamiento de GCL _H mediante “small hairpin” RNA (shRNA).....	54
2.2. “Small interfering RNA” (siRNA)	56
2.3. Sobreexpresión de GCL.....	57
2.4. Mutagénesis dirigida.	60
3. Transfección transitoria de células de mamífero.	61
4. Producción de partículas lentivirales.	62
5. Tratamiento de las células.....	63
5.1. Estimulación de la producción de ROS.	63
6. Fraccionamiento subcelular	64
7. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).	66
7.1. Determinación de anión superóxido.	66
7.2. Determinación de H ₂ O ₂	68
7.2.1. Detección de H ₂ O ₂ por AmplexRed TM	68
7.2.2. Detección de H ₂ O ₂ mitocondrial por pHyPer-dMito.	69
7.2.3. Determinación de H ₂ O ₂ in vitro.	70
8. Electroforesis e inmunodetección de proteínas (Western Blot)	71
9. Inmunocitoquímica	73
10. Inmunohistoquímica	74
11. Determinación de la apoptosis neuronal	75
11.1. Anexina V / 7-amino-actinomicina D.....	75
11.2. Caspasa 3 activa	77
11.3. TUNEL.....	77

12. Determinación de tioles y disulfuros	79
12.1 Preparación de las muestras	79
13.3. Cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas (UPLC-MS/MS)	80
14. Determinación de la concentración de glutatión.....	81
15. Determinación de la concentración de γGC	82
16. Determinaciones enzimáticas.....	82
16.1. Determinación de la actividad enzimática de la glutamato cisteína ligasa	82
16.2. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa	83
16.3. Determinación de la actividad citrato sintasa	84
17. Estudios <i>in vivo</i>.....	84
17.1. Inyección estereotáxica de lentivirus.....	84
17.2. Inyección de la neurotoxina 3-nitropropiónico.	86
17.3. Determinación de la eficiencia de transducción lentiviral.....	87
17.4. Determinación de la pérdida neuronal.....	87
17.5. Obtención de tejido estriatal.....	87
17.6. Estudio de la coordinación motora	88
18. Determinación de la concentración de proteínas	89
19. Cumplimiento de requisitos éticos en el tratamiento de los animales.....	89
20. Análisis estadístico	89
RESULTADOS	91
1. Síntesis de γGC en la mitocondria.....	93
1.1. Localización mitocondrial de <i>mitoGCL</i>	93
1.2. Procesamiento mitocondrial de <i>mitoGCL</i>	95
2. Funcionalidad de <i>mitoGCL</i>.....	97
2.1. MitoGCL promueve la síntesis mitocondrial de γ GC.	97
2.2. La síntesis mitocondrial de γ GC no altera la concentración de glutatión.....	98
3. Efecto antioxidante de γGC	99
3.1. Modulación de la concentración de H_2O_2 por <i>mitoGCL</i>	99
3.2. Modulación de O_2^- mitocondrial.....	102
4. La actividad antioxidante de <i>mitoGCL</i> es debida a la síntesis de γGC.....	103
5. MitoGCL disminuye los niveles mitocondriales de ROS en ausencia de GCL citósolica.....	105
6. Mecanismo de acción de la actividad antioxidante de γGC.....	107
6.1. Efecto del silenciamiento de enzimas antioxidantes.	107
6.2. Efecto de γ GC sobre la estabilidad de H_2O_2 <i>in vitro</i>	110

7. Modulación del estado redox de GSH por γGC.	112
8. Modulación redox de tioles proteicos por γGC.	113
9. Eliminación de ROS por γGC mitocondrial en neuronas.	114
9.1 Efecto de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial.	114
9.2. Modelo de excitotoxicidad.	115
9.3. GPx1 es necesaria para el efecto antioxidante de γ GC en neuronas.	116
10. Acción neuroprotectora de γGC en cultivo.	118
11. Acción neuroprotectora de γGC <i>in vivo</i>.	120
11.1. Existencia de γ GC oxidada y reducida <i>in vivo</i> .	120
11.2. <i>MitoGCL</i> aumenta la síntesis de γ GC en cerebro <i>in vivo</i> .	120
11.3. <i>MitoGCL</i> promueve la supervivencia neuronal <i>in vivo</i> .	122
11.4. <i>MitoGCL</i> previene de la descoordinación motora producida por 3NP.	125
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	127
DISCUSIÓN	129
PERSPECTIVAS	137
CONCLUSIONES	139
Conclusiones	141
SUMMARY	143
Introduction	147
Hypothesis and objectives	148
Results	149
Discussion	164
Methods	167
Conclusions	191
Bibliography	192
ABREVIATURAS	195
Abreviaturas	197
BIBLIOGRAFÍA	201

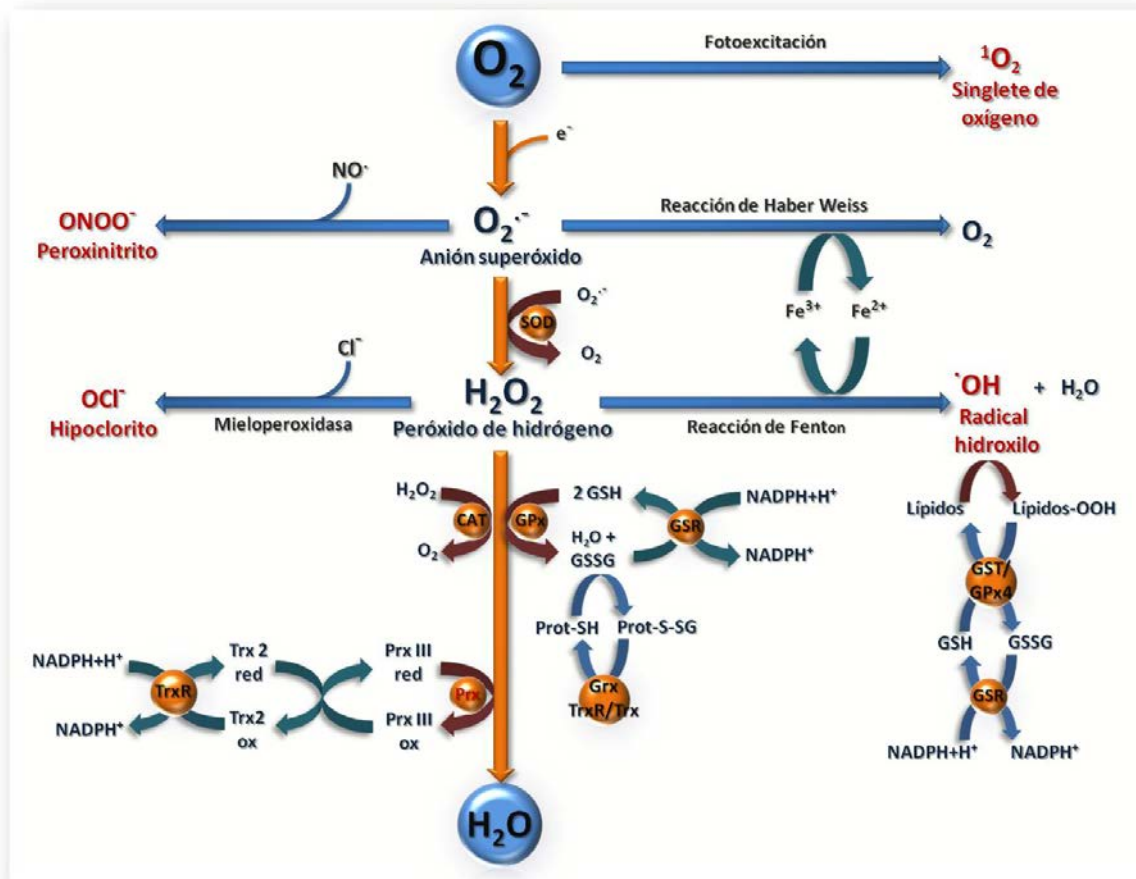


1. Estrés oxidativo

El decisivo avance evolutivo que supuso la simbiosis entre una bacteria y una célula eucariota hace unos 1.500 millones de años, con la consecuente aparición de la mitocondria, supuso un significativo avance en la eficiencia energética de los seres vivos aerobios al obtener éstos la capacidad de utilización de oxígeno; sin embargo, este hecho se vió acompañado de la aparición de nuevas moléculas reactivas derivadas del oxígeno (**Esquema I**). Así, la concentración de O_2 en la célula se ha estimado en 200 μM , mientras que en mitocondrias se calcula que se encuentra entre 3-30 μM (Murphy, 2009). Del 1-3% del O_2 consumido durante la fosforilación oxidativa no queda completamente reducido a H_2O (Green et al., 2011), sino que recibe electrones individuales en un proceso catalizado por los complejos I y III de la cadena respiratoria (Murphy, 2009), generando anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) (Boveris, 1984). Este proceso está regulado, lo que sugiere que el $O_2^{\bullet -}$ así formado ejerce funciones fisiológicas (D'Autreaux and Toledano, 2007; Poyton et al., 2009); no obstante, la presencia de una activa superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD o SOD2) en la matriz mitocondrial, que rápidamente elimina el $O_2^{\bullet -}$ al convertirlo en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sugiere, asimismo, que la concentración de $O_2^{\bullet -}$ debe estar rigurosamente controlada. Así, la eliminación de $O_2^{\bullet -}$ por la actividad de la SOD2 se acompaña de la formación de H_2O_2 , que puede quedar en la matriz mitocondrial o difundir libremente al citosol. El $O_2^{\bullet -}$ también se puede formar por la actividad de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa, y la transformación de ácido araquidónico a prostaglandina PGH_2 . La xantina oxidasa y NADPH oxidasa son otras fuentes destacadas de producción de $O_2^{\bullet -}$ (Circu and Aw, 2010; Temple et al., 2005).

Dadas sus propiedades pro-oxidantes, el H_2O_2 debe ser rápidamente eliminado, para lo cual actúan diversos sistemas enzimáticos que reducen H_2O_2 en H_2O . Los más importantes son catalasa en peroxisomas, las peroxirredoxinas (Prxs), el sistema tiorredoxina-tiorredoxina reductasa y las glutatión peroxidases (GPxs), que se expresan tanto en la mitocondria como en el citosol (Hekimi et al., 2011) (ver también el apartado 1.2). Si bien la reactividad del $O_2^{\bullet -}$ es limitada, tiene la capacidad de promover la reducción de Fe^{3+} en Fe^{2+} (reacción de Haber-Weiss), el cual cataliza la formación del radical hidroxilo ($\bullet OH$) a partir de H_2O_2 (reoxidándose el Fe^{2+} a Fe^{3+}) (reacción de Fenton) (Temple et al., 2005). El H_2O_2 también es reactivo, de forma que la oxidación

de residuos de cisteína por parte de éste es muy relevante, aunque selectiva, ya que no oxida tioles proteicos de manera aleatoria (Le Moan et al., 2006). Ello explica que la cisteína del glutatión (GSH), tiol de bajo peso molecular más abundante de la célula, sólo actúe como antioxidante mediante la actividad de glutatión peroxidasas (GPxs) o formando aductos S-glutationilados con ácidos sulfénicos en proteínas (D'Autreaux and Toledano, 2007).



Esquema I. Principales mecanismos de producción y detoxificación de ROS en la célula. Debido a la alta reactividad de los ROS, es posible la interacción entre distintas vías, siendo utilizado el producto de una reacción para generar nuevos ROS o especies reactivas. Adaptado de (Mari et al., 2009; Temple et al., 2005).

Colectivamente, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot OH$ constituyen las denominadas especies reactivas de oxígeno (o “ROS”, del inglés Reactive Oxygen Species). En condiciones fisiológicas, las células producen una cierta cantidad de ROS de forma basal. Así, aunque están generalmente considerados como potencialmente tóxicas, las ROS cumplen funciones reguladoras de la proliferación y diferenciación celulares, de la expresión génica, y de

otros muchos procesos (Halliwell, 2011; Rebrin and Sohal, 2008). No obstante, bajo determinadas circunstancias, la velocidad de formación de ROS supera la capacidad de los sistemas antioxidantes de eliminarlos. Esta situación de sobreproducción de ROS, comúnmente denominada “estrés oxidativo”, da lugar a la oxidación de proteínas (particularmente residuos aromáticos o conteniendo cisteína), ácidos nucleicos y lípidos (Poyton et al., 2009; Temple et al., 2005). El estrés oxidativo puede desencadenar daño masivo que puede llegar a causar la activación de los sistemas celulares de autodigestión (o autofagia) de determinados orgánulos, llegando incluso a la muerte celular (Brand, 2010). De hecho, la formación excesiva de ROS está asociado al envejecimiento (Rebrin and Sohal, 2008), y se la relaciona con la etiología del cáncer u otras enfermedades cardiovasculares, autoinmunes o neurodegenerativas (Bolaños et al., 2009; Halliwell, 2011; Temple et al., 2005).

1.1. Estrés oxidativo mitocondrial y neurodegeneración.

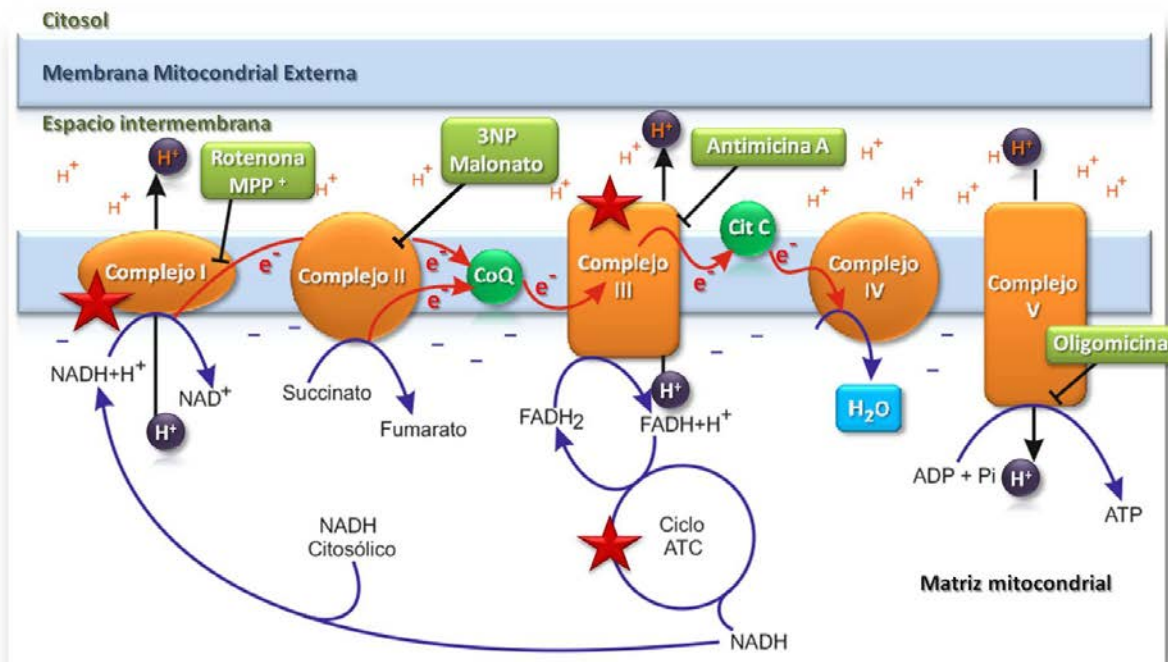
En este orgánulo se ha identificado hasta siete sitios de producción de ROS (**Esquema II**), la mayoría dependiente de la actividad de los complejos I y III y de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD) (Brand, 2010).

Durante la fosforilación oxidativa, el NADH y FADH₂ formados por los procesos oxidativos del ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) aportan electrones para el bombeo a través de la membrana interna mitocondrial (MMI). Hasta cuatro electrones son transferidos a través de la cadena transportadora de electrones (ETC) al O₂, originando H₂O en el complejo IV (citocromo c oxidasa). Sin embargo, este proceso no es del todo eficiente y se genera O₂^{•-}, principalmente en los complejos I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y III (ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa) (Murphy, 2009; Poyton et al., 2009). En el complejo I, la razón NADH(H⁺)/NAD⁺ determina el estado reducido del sitio FMN, desde donde los electrones pueden ser donados desde el O₂ para formar O₂^{•-}. La formación de éste es mayor en condiciones donde el consumo de O₂ es bajo y aumenta el par NADH(H⁺)/NAD⁺ (Murphy, 2009). Además, cuando el gradiente electroquímico a través de la MMI es alto, también es posible una producción de O₂^{•-} por un transporte reverso de electrones (RET) desde la coenzima Q reducida

(CoQH₂) hacia el complejo I, reduciendo el NAD⁺ a NADH(H⁺) el sitio FMN (Murphy, 2009).

El complejo III es el otro componente de la ETC más involucrado en la producción de O₂^{•-} cuando se encuentra inhibido el sitio Q_i de unión a la CoQ por antimicina. En este caso, se produce O₂^{•-} como consecuencia de la reacción del O₂ con la semiquinona unida al sitio Q₀ (Bolaños et al., 2009).

También tienen gran relevancia en la producción de ROS las monoamina oxidasas (MAOs), localizadas en la membrana mitocondrial externa (MME) y encargadas de la desaminación oxidativa de monoaminas como la dopamina, o la enzima del TCA α-cetoglutarato deshidrogenasa (αKGDH), que incrementa la producción de H₂O₂ a través del suministro de NADH(H⁺) (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006).



Esquema II. Producción de ROS en la mitocondria. La mitocondria es el orgánulo que comprende la mayor producción de ROS en la célula, como consecuencia del proceso de fosforilación oxidativa. Los complejos I y III comprenden la mayor generación de radicales, junto al ciclo de ácidos tricarboxílicos (ATC). La inhibición de la cadena respiratoria promueve la producción de ROS por la mitocondria. Cit C: citocromo C; CoQ: coenzima Q; MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridina. Adaptado de (Beal, 2005).

La matriz mitocondrial cuenta con sus propios mecanismos de eliminación de ROS, esencialmente basados en sistemas que utilizan glutatión, glutarredoxina y tioredoxina como cofactores (Mari et al., 2009), entre otros (Mari et al., 2009; Temple et al., 2005). Sin embargo, la mitocondria es el orgánulo celular que más produce ROS y, como tal,

una de las principales dianas de sus efectos deletéreos. Entre éstos destacan el daño por peroxidación lipídica, la modulación de los complejos de la cadena respiratoria o las mutaciones en el propio DNA mitocondrial ($_{mt}DNA$) (Fukui and Moraes, 2008; Hekimi et al., 2011).

Las neuronas son altamente dependientes de energía para conseguir el impulso nervioso, y el metabolismo oxidativo mitocondrial representa su fuente principal de energía. Así, la disfunción mitocondrial neuronal está entre las principales causas que subyacen en los procesos neurodegenerativos. En éstos se observa, consistentemente, una producción insuficiente de ATP y un aumento de ROS (Bolaños et al., 2009; Levy et al., 2009) que a menudo convergen en apoptosis neuronal. Por otro lado, la pérdida de funcionalidad de la mitocondria es más patente durante el envejecimiento, cuando la acumulación de mutaciones en el $_{mt}DNA$ y la deficiente actividad de los complejos mitocondriales, especialmente el complejo I (Barja, 2004), contribuyen a explicar la aparición de patologías asociadas (Bolaños et al., 2009; Halliwell, 2011; Temple et al., 2005).

La formación excesiva de ROS repercute en un incremento de muerte celular apoptótica y necrótica, no solo en neuronas, sino también en astrocitos (Barja, 2004); ello contribuye decisivamente en la neurodegeneración. Un ejemplo característico lo constituye la enfermedad de Parkinson (EP), en la que la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra* está precedida de estrés oxidativo (Jenner, 2003). La propia conversión de dopamina a ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) por las monoaminoxidasas (MAOs) produce H_2O_2 . Por otro lado, la autooxidación de dopamina de forma espontánea o por ciclooxigenasa (COX), tirosinasa o xantina oxidasas, genera quinonas reactivas y $O_2^{\cdot-}$, que puede reaccionar con NO para generar peroxinitrito ($ONOO^-$) (Miyazaki and Asanuma, 2008). La formación, polimerización de semiquinonas y polimerización de las mismas, también contribuye a la generación de ROS y al desarrollo del parkinsonismo (Jenner, 2003). Además, la dopamina se puede unir al GSH y dar origen a especies reactivas que inhiben la actividad mitocondrial y son tóxicas para las células dopaminérgicas (Li et al., 1998a; Shen et al., 2000). Por otro lado, la excitotoxicidad, o sobre-estimulación de receptores post-sinápticos por neurotransmisores excitadores, tales como glutamato, produce un incremento en la formación mitocondrial de ROS, además de una acumulación de Ca^{2+} en la matriz y apertura del poro de transición mitocondrial (Krantic et al., 2005). El estrés oxidativo asociado a la excitotoxicidad está presente en

el proceso degenerativo de otras enfermedades neurológicas, tales como la Esclerosis Lateral Amiotrófica, causada por una mutación en el gen de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu/ZnSOD o SOD1), o la enfermedad de Alzheimer, en la que los ROS contribuyen a la formación de acúmulos de hierro en las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, o en los depósitos de la proteína β -amiloide (Krantic et al., 2005).

1.2. Sistemas antioxidantes celulares.

La eliminación de ROS de la célula se lleva a cabo mediante diversos sistemas antioxidantes, que constituyen el mecanismo de defensa de la célula frente a los efectos deletéreos de los mismos. Como se ha comentado anteriormente, entre ellos se encuentran la SOD, que consta con una isoforma citosólica (Cu/ZnSOD o SOD1) mitocondrial (MnSOD o SOD2), y la catalasa, presente en el citosol y peroxisomas. Dichas enzimas se encargan de la reducción de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y de H_2O_2 a H_2O , respectivamente. A estos sistemas antioxidantes se suman sustancias con poder antioxidante, como el ascorbato o vitamina E, y sistemas antioxidantes como el glutatión, la tiorredoxina o la peroxirredoxina.

En el Sistema Nervioso Central (SNC), el ácido ascórbico actúa como antioxidante de forma directa, a través de sus dos grupos hidroxilos ionizables o acoplado al sistema GSH/GSSG; a su vez, éste último es necesario para su reducción desde ácido dehidroascórbico (Harrison and May, 2009).

Por otro lado, tiene una gran relevancia el sistema redox de tiorredoxina (Trx). Se trata de un sistema multifuncional, constituido por proteínas que catalizan la reducción reversible de uniones disulfuro de proteínas, pudiendo colaborar para ello con el sistema glutarredoxina (Grx). La reacción redox se lleva a cabo gracias a la presencia de dos cisteínas en su sitio activo (Cys-XX-Cys), que son regeneradas por Trx reductasa (TrxR) y NADPH. Existe una isoforma Trx1, presente en citosol y núcleo (en condiciones de estrés oxidativo) y una isoforma Trx2, localizada en la mitocondria (Go and Jones, 2008).

El sistema Trx/TrxR contribuye a la reducción de las cisteínas del sitio activo de las peroxirredoxinas (Prx's). Éstas constituyen un grupo de peroxidases no específicas para

selenotioles, que contribuyen a la eliminación de hidroperóxidos orgánicos y H_2O_2 (Circu and Aw, 2010).

. Para ello, constan de un sitio catalítico con cisteínas peroxidáticas, capaces de oxidarse a ácido sulfénico (Cys-SOH) y formar posteriormente uniones disulfuros con otra cisteína en la subunidad C-terminal. Existen seis isoformas, localizadas en citosol (PrxI-II y PrxVI), mitocondrias (PrxIII), mitocondria y peroxisomas (PrxV), siendo la PrxIV extracelular (Circu and Aw, 2010).

Atendiendo a la condición de antioxidante tiólico más abundante y con mayor relevancia como sistema de defensa frente al estrés oxidativo, el glutatión recibe un detallado análisis en sucesivos apartados.

2. El glutatión en el organismo

El tripéptido γ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina (glutatión o GSH) (**Figura I**) está considerado como el principal sistema antioxidante tiólico, ya que está ampliamente distribuido en células de animales, plantas y microorganismos a elevada concentración. Así, el glutatión es el tiol de bajo peso molecular más abundante (concentración de 0,5–10 mmol/L) en las células animales (Meister and Anderson, 1983), encontrándose mayoritariamente en el citosol (85-90%) con una vida media de 2-3 h. El resto del glutatión se encuentra repartido en diversos orgánulos, principalmente mitocondria (10-15%) (Lu, 2009; Meredith and Reed, 1982), aunque también en núcleo, retículo endoplasmático y peroxisomas (Lu, 2009; Wu et al., 2004). Los niveles más altos de glutatión se encuentran, por orden decreciente, en hígado, bazo, riñón, cristalino, eritrocitos y leucocitos (Njalsson, 2005).

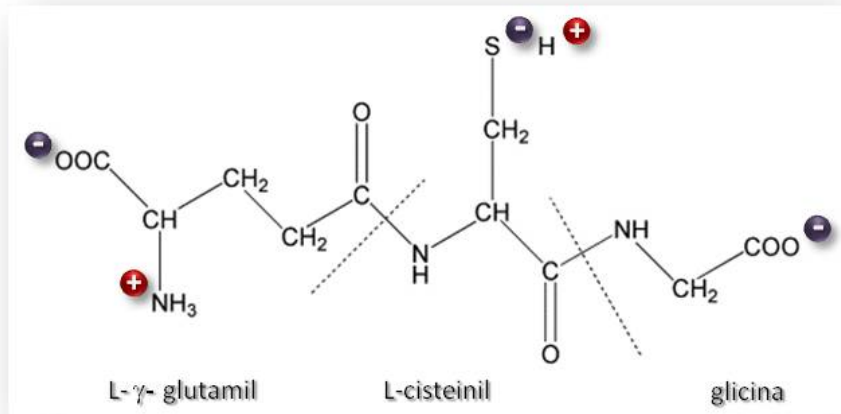


Figura I. Estructura aminoacídica del GSH. La unión inusual en posición γ -carboxilo del glutamato, le confiere resistencia a la molécula frente a la degradación por enzimas como la γ -glutamyltranspeptidasa (GGT), situada en la cara exterior de la membrana de ciertos tipos celulares. Adaptado de (Lash, 2006)

La mayoría del glutatión se encuentra en su forma reducida (GSH), pero una proporción de éste (1-5%) se encuentra oxidado (disulfuro de glutatión o GSSG) [Lu SC, 2009, 42-59; Kaplowitz, 2009, 42]. En el cerebro, el GSH alcanza concentraciones de 1-3 mM, (Dringen, 2000), aunque presenta una distribución heterogénea dependiendo del tipo celular. Así, la concentración de GSH en neuronas es de 2.5 mM, mientras que en astrocitos es superior a 3.5 mM (hasta 8 mM en cultivo), aproximadamente (Dringen, 2000; Zeevalk et al., 2008).

La suma de las formas reducida y oxidada constituyen el GSH total (GSH+2GSSG), del cual hasta el 15% puede estar unido a proteínas (Wu et al., 2004). Como se ha citado anteriormente, sólo el 1-5% del GSH se encuentra en su forma oxidada como disulfuro (GSSG), o conjugado como disulfuro con xenobióticos (GSSX) o proteínas (GSSPr) que contienen pequeños tioles (Njalsson, 2005). Debido a la baja concentración de GSSG en condiciones fisiológicas, la razón GSH/GSSG, que normalmente es >10 en condiciones normales, se utiliza como indicadora del estado redox (Jones et al., 2002; Schafer and Buettner, 2001). Esta razón puede verse modificada por procesos oxidativos severos o por otros pares redox, como los pares tiorredoxina reducida / tiorredoxina oxidada o $\text{NADPH}(\text{H}^+)/\text{NADP}^+$ (Dalton et al., 2004; Wu et al., 2004).

2.1 El glutatión en la mitocondria.

A pesar de su síntesis íntegramente citosólica (Griffith and Meister, 1985), el GSH se distribuye entre los distintos compartimentos celulares, como retículo endoplasmático, núcleo y mitocondria. En este último orgánulo, el tripéptido se encuentra principalmente en su forma reducida y representa un 10-15% del GSH celular. Considerando el volumen la matriz mitocondrial, se puede estimar que éste alcanza una concentración de 10-14 mM, lo que equivale a las concentraciones en el citosol (Griffith and Meister, 1985; Mari et al., 2009).

El GSH mitocondrial supone uno de los reservorios con mayor implicación en la regulación de funciones biológicas celulares, no sólo por su acción reguladora de ROS, sino por su posible modulación de la bioenergética mitocondrial y señalización redox (Mari et al., 2009). Así, la producción de $O_2^{\cdot-}$ en la matriz mitocondrial es unas 5-10 veces mayor a la citosólica (Cadenas and Davies, 2000).

Todos los eucariotas contienen GSH, salvo protozoos como *Entamoeba histolytica* o *Giardia duodenalis*, que tienen un metabolismo anaerobio y carecen de mitocondrias. Esta observación ha permitido sugerir que el GSH debe ser un factor esencial para la función mitocondrial (Fahey et al., 1984). Así, la eliminación selectiva de GSH en la mitocondria es altamente tóxica, mientras que la depleción del GSH citosólico no tiene graves consecuencias para la supervivencia celular (Dalton et al., 2004).

3. Funciones de GSH.

La actividad antioxidante ha sido tradicionalmente asumida como la función primordial del GSH, siendo así considerado como uno de los principales actores de la defensa antioxidante intracelular. Por tanto, el GSH resulta imprescindible en el mantenimiento del estado redox celular y de la viabilidad celular (Lu, 2009). Para desempeñar su actividad antioxidante, el GSH puede reaccionar directamente con moléculas como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Ross et al., 1985; Wefers and Sies, 1983; Winterbourn and Metodiewa, 1994), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO),

Introducción

singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito (ONOO^-) o peróxidos lipídicos (LOO^\cdot) a través de GSH peroxidasas (GPx) o peroxirredoxinas (Prx) (Franco and Cidlowski, 2009). GSH también reacciona directamente con radicales de proteínas y DNA, donando electrones y oxidándose (GS^\cdot), originándose así la forma oxidada, GSSG (Franco and Cidlowski, 2009). Sin embargo, estas reacciones directas de GSH son minoritarias.

Al margen de su papel como antioxidante, existen otras funciones destacadas del GSH, imprescindibles para el mantenimiento de la viabilidad celular (**Tabla I**). Así, el GSH participa en la detoxificación de xenobióticos a través de la formación de conjugados de forma espontánea o enzimáticamente en reacciones catalizadas por la GSH-S-Transferasa (GST) (Meister, 1988) (**Tabla I**).

Se ha propuesto que el GSH es un reservorio y transportador de cisteína celular (Meister and Anderson, 1983) a través del ciclo del γ -glutamilo, lo cual es relevante dada la alta inestabilidad extracelular de la cisteína, que se oxida rápidamente a cistina, generando radicales libres de oxígeno (Lu, 2009; Meister and Anderson, 1983).

El GSH mantiene así el balance redox intracelular y el estado reducido de tioles proteicos (Cotgreave and Gerdes, 1998) y es capaz de intercambiar disulfuros de tioles a través de transferasas, de forma reversible y dependiente del equilibrio redox GSH:GSSG (Lu, 2009). En levaduras, además, regula el estado redox de tioles y la maduración del grupo hierro-sulfuro (Kumar et al., 2011).

Por tanto, el GSH modula postraduccionalmente las proteínas. Éstas se producen mediante reacciones (reversibles o irreversibles) en residuos de cisteína de los dominios catalíticos y/o unión a ligandos. Entre los procesos reversibles, se encuentra la nitrosilación (SNO), hidroxilación (SOH), formación de disulfuros (S-S) o glutathionilación (SSG). Esta última consiste en la unión S-S entre la cisteína del GSH y una cisteína de la proteína, catalizada por glutarredoxina (GRX) (Franco and Cidlowski, 2009).

Principales funciones de GSH	
-	Defensa antioxidante (Dringen et al., 2003; Winterbourn et al., 1994; Franco & Cidlowski., 2009)
-	Detoxificación de electrófilos y xenobióticos (Lu, 2009; Meister, 1988).
-	Modulación intracelular de tioles (Kumar et al., 2011; Lu, 2009).
-	Modificaciones postraduccionales en proteínas (Ballatori et al., 2009; Franco & Cidlowski, 2009; Reynaert et al., 2006; Wu et al., 2004).
-	Reservorio de cisteína (Lu, 2009; Meister, 1988).
-	Neurotransmisión y neuromodulación. Señalización neurohormonal (Janaky et al., 2000).
-	Regulación del crecimiento celular (Holmgren, 1981; Lu, 2009).
-	Regulación de la muerte celular (Cazanave et al., 2007; Diaz-Hernandez et al., 2005; Franco and Cidlowski, 2009; Franklin et al., 2002; Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2006, 2007; Lash, 2006; Lu, 2009; Sato et al., 2004).
-	Funcionalidad e integridad mitocondrial (Wu et al., 2004).
Otras funciones de GSH	
-	Reducción de moléculas antioxidantes como el ascorbato o el tocoferol directamente o a través de glutarredoxina (Zeevalk et al., 2008)
-	Producción de D-lactato a partir de metilglioalato (Wu et al., 2004).
-	Actividad microtubular (Oja et al., 2000).
-	Antiviral: GSH inhibe la infección por el virus <i>influenza</i> (Cai et al., 2003).
-	Eliminación de formaldehído (Townsend et al., 2003)].
-	Conversión de prostaglandina H ₂ en prostaglandinas D ₂ y E ₂ (Lu, 2000).
-	Regulación de factores de transcripción (Lu, 2000).
-	Espermatogénesis y maduración del esperma (Sies, 1999).
-	Respuesta inmune: Activación de linfocitos T, leucocitos polimorfonucleares y producción de citoquinas (Townsend et al., 2003).
-	Activación de vías de señalización celulares (Sen, 2000)].

Tabla I. Funciones del GSH. Las principales funciones del tripéptido vienen recogidas en la parte superior de la tabla. Otras funciones pueden ser desempeñadas por el GSH de forma más indirecta.

Mediante la modificación redox de receptores glutamatérgicos, el GSH modula la homeostasis de neurotransmisores como NO (Heales et al., 1999; Hogg, 2002), GABA o dopamina (Oja et al., 2000). Otras funciones de GSH están relacionadas con la proliferación celular, ya que se asocia a la entrada en fase S del ciclo celular (Lu, 2009). Así, el GSH aumenta antes de la síntesis de DNA, lo que permite mantener reducida la glutarredoxina y la tiorredoxina, requeridas para la actividad de la ribonucleótido reductasa, limitante en la síntesis de DNA (Holmgren, 1981).

El GSH modula la supervivencia celular, al modificar el estado redox de residuos en caspasas o kinasas de estrés (Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2007). Así, se ha

demostrado que la formación del apoptosoma requiere un descenso de GSH (Sato et al., 2004) Algunos autores han propuesto que la disminución mitocondrial de GSH prevalece sobre la citosólica como mecanismo activador de apoptosis (Franco and Cidlowski, 2009; Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2006; Lash, 2006). Por el contrario, el aumento de los niveles de GSH promueve la resistencia frente a la apoptosis (Cazanave et al., 2007; Franco and Cidlowski, 2009) y la autofagia, la cual se corresponde con un aumento de ROS y disminución de GSH (Franco and Cidlowski, 2009).

3.1. Funciones de GSH en la mitocondria

Se ha demostrado que GSH en la mitocondria modula peróxidos y otros oxidantes (Ravindranath and Reed, 1990), $[Ca^{2+}]$ mitocondrial (Beatrice et al., 1984), estado redox de nucleótidos de piridina (Lotscher et al., 1979), daño al DNA mitocondrial (Esteve et al., 1999) y poro de transición mitocondrial (Chernyak and Bernardi, 1996). También se ha asociado a la activación de vías de señalización y expresión de genes reguladores de apoptosis y crecimiento y diferenciación celular (Filomeni et al., 2002; Hammond et al., 2001). En el orgánulo, GSH tiene un papel primordial en la eliminación de H_2O_2 , produciéndose daño oxidativo por el peróxido a partir de un descenso del contenido de GSH mitocondrial superior al 40% (Garcia-Ruiz et al., 1995).

2.1.1. Modulación de proteínas mitocondriales.

En la mitocondria se han identificado proteínas glutationiladas, de vital importancia para el correcto funcionamiento mitocondrial, tales como determinadas subunidades del complejo I (Taylor et al., 2003), complejo IV (Fratelli et al., 2002; Fratelli et al., 2003), aconitasa (Han et al., 2005), piruvato deshidrogenasa (Odin et al., 2001), succinil-CoA transferasa y ATP sintasa (Garcia et al., 2010); ésta última es una de las primeras en perder su función tras la glutationilación inducida por H_2O_2 . En general, la glutationilación tiene funciones de protección de los tioles en las proteínas, en situaciones de estrés oxidativo severo. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la glutationilación de estas proteínas se asocia a una disminución de su actividad, siendo

necesaria la actividad de la Grx2 (Ver apartado 4.7) para la recuperación de la actividad normal (Holmgren et al., 2005).

3.1.2. Importancia de GSH mitocondrial en la apoptosis.

La disminución prolongada de GSH mitocondrial está conectada al desencadenamiento de apoptosis, lo que predispone las células a la permeabilización mitocondrial y la activación de caspasas. La peroxidación de cardiolipina, liberación de citocromo c, sensibilización a TNF o formación del poro de transición mediada por Bax, son algunos de los eventos que se observan tras una disminución acusada y sostenida de GSH mitocondrial (Garcia-Ruiz et al., 2003; Ghibelli et al., 1999; Mari et al., 2009).

3.1.3. GSH mitocondrial y neurodegeneración.

La importancia de GSH mitocondrial en la supervivencia neuronal se ha demostrado en modelos *in vivo* e *in vitro* (Mari et al., 2009; Muyderman et al., 2004; Sims et al., 2004). La pérdida selectiva de GSH mitocondrial en modelos de isquemia cerebral, causa un daño cerebral, que se reduce en >60% con el tratamiento previo con éster de GSH (Anderson et al., 2004a). En modelos murinos de enfermedad de Alzheimer, el colesterol mitocondrial modula la neurotoxicidad por péptido β -amiloide a través de una depleción selectiva de GSH mitocondrial (Fernandez et al., 2009). En la enfermedad de Parkinson, se ha demostrado que la pérdida de GSH es uno de los eventos bioquímicos que preceden al desarrollo de la enfermedad (Perry and Yong, 1986), afectando al funcionamiento mitocondrial por disminución de los niveles de dopamina y de la actividad del complejo I mitocondrial (Bharath and Andersen, 2005). Así, el GSH mitocondrial parece estar íntimamente implicado en el control de patologías del sistema nervioso central (SNC).

3.1.4. GSH mitocondrial y envejecimiento.

En modelos murinos de envejecimiento se ha observado un progresivo descenso de la razón GSH/GSSG en mitocondria, asociado aun incremento de GSSG y disulfuros de GSH (proteína-SSG) con la edad (Rebrin et al., 2003). Estos cambios son más acusados en tejidos como cerebro, hígado o músculo esquelético (Rebrin et al., 2003). Es más, el aumento de la oxidación y la disminución de GSH mitocondrial se asocia a un mayor daño en el DNA mitocondrial, que se previene con antioxidantes (de la Asuncion et al., 1996) o mediante restricción calórica (Rebrin et al., 2003).

4. Biosíntesis de glutatión.

Bajo condiciones fisiológicas, se pierde poco GSH, probablemente debido al estricto control de su transporte, sujeto a regulación. La disminución de glutatión celular se debe al eflujo de GSSG a través de la membrana plasmática. En cualquier caso, ambos eventos están termodinámicamente desfavorecidos dada la gran diferencia entre la concentración intracelular (1-12 mM) y extracelular (2-20 μ M, salvo en ácidos biliares) de GSH (Griffith, 1999).

La escasa disminución de GSH por pérdida u oxidación, se compensa por el incremento en su síntesis *de novo*, la cual está regulada por, al menos, tres factores: a) la expresión de la enzima limitante de su síntesis (GCL), b) la disponibilidad de precursores, especialmente L-cisteína y c) la retro-inhibición de GCL por GSH (Griffith, 1999; Wu et al., 2004). A estos factores se le pueden añadir otros moduladores secundarios, tales como los eventos de fosforilación y nitrosación de GCL, que regulan la síntesis de GSH. Como se ha mencionado, el suministro de precursores es determinante para la síntesis de GSH (**Tabla II**), donde la cisteína tiene un papel esencial por tratarse del aminoácido limitante de la misma (Wu et al., 2004). Por el contrario, la administración exógena de GSH es poco efectiva para incrementar su propia concentración celular, ya que no se importa por las células y se degrada rápidamente (Griffith, 1999).

Concentraciones del GSH y sus precursores		
GSH		
Célula	1-12 mM	(Do et al., 2009; Cooper et al., 1997)
Citosol	5-11 mM	
Mitocondria	3-15 mM	
Núcleo		
Extracelular		(Wu et al., 2004; Ballatori et al., 1998; Ristoff et al., 2002)
Plasma	2-20 μ M	
Ácidos biliares	10 mM	
Tejido	0.5-10 mM	(Dalton et al., 2004; Zeevalk, et al., 2008; Dringen et al., 2000)
Hígado	7.9 mM	
Riñón	5.7 mM	
Pulmones	1.6 mM	
Páncreas	1.4 mM	
Bazo	1.6 mM	
Corazón	0.5 mM	
Cerebro	1-3 mM	
Neuronas	2.5 mM	
Astrocitos	3.8-8 mM	
ATP	1-7 mM	(Chen et al., 2005)
Cisteína	0.15 mM-0.25 mM	Lu et al., 2009; Ristoff et al., 20023)
Glutamato	1-4 mM	(Griffith et al., 1999)
Glicina	1.5-2 mM	(Wu et al., 2004)

Tabla II. Concentraciones de GSH y sus precursores. Pese a las diferencias en valores absolutos, las concentraciones en los compartimentos celulares son similares. En tejido, existe una alta variabilidad en los niveles de GSH. Por su parte, la concentración de GSSG varía entre 0.086 y 0.149 mM, salvo en plasma, donde es de 0.019 mM.

La síntesis de GSH tiene lugar en dos reacciones dependientes de ATP, donde la primera es catalizada por la glutamato cisteína ligasa (GCL, GSS, Gsh1 o GshA), formando el dipéptido γ -glutamilcisteína (γ GC); en la segunda reacción se incorpora glicina mediante la glutatión sintetasa (GSS, Gsh2 o GshB) (Dringen, 2000; Njalsson, 2005). Este mecanismo es común para la mayoría de organismos, aunque existen especies en las que esta función puede ser asumida por una única proteína. De hecho, mediante análisis bioinformáticos se ha demostrado que algunos procariontes carecen de la GshA, a pesar de que acumulan GSH. Ello ocurre a través de la formación del tripéptido mediada por la síntesis de γ -glutamilfosfato que, tras su reacción con cisteína,

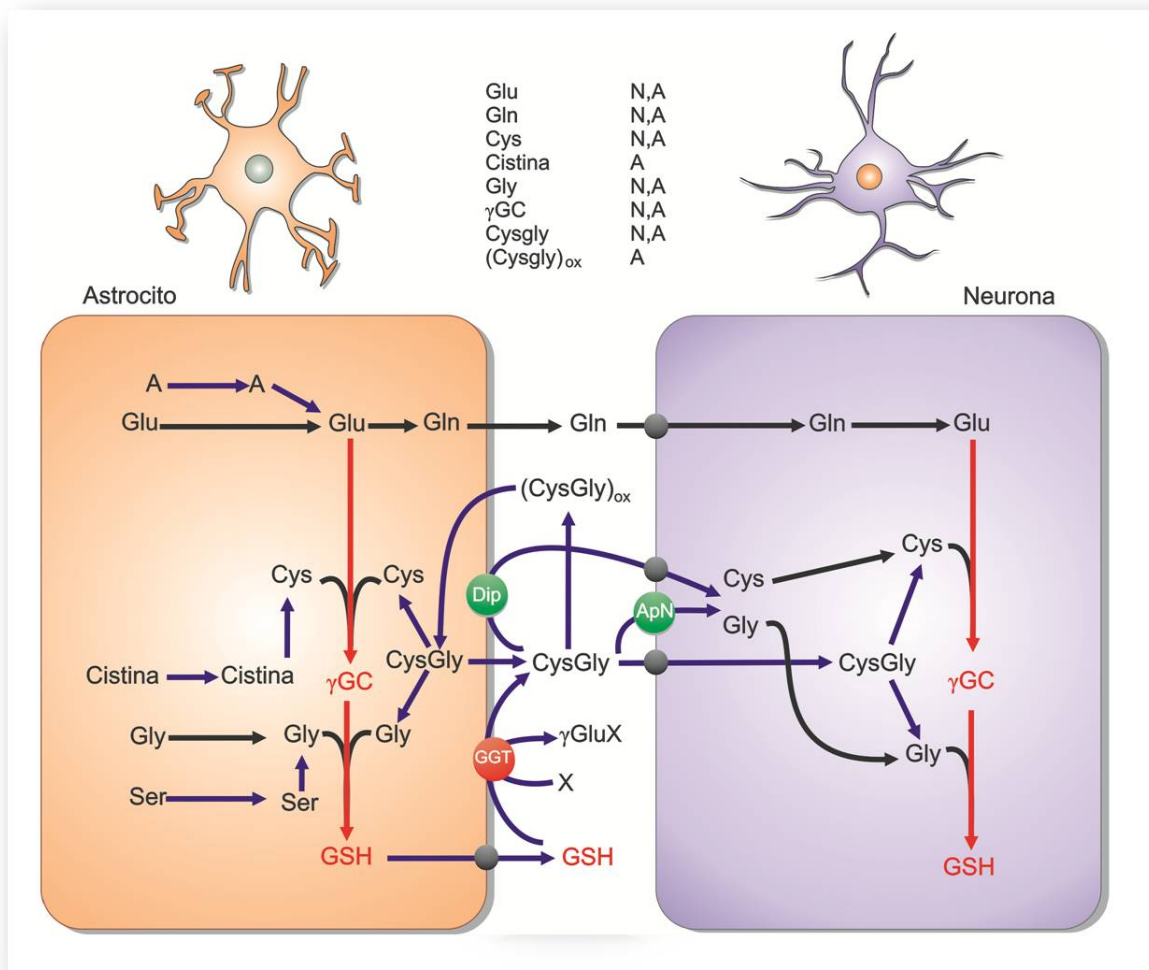
puede ser utilizada por la GshB para producir GSH (Veeravalli et al., 2010). De no ser utilizado el γ -glutamilfosfato, puede ciclarse y acumularse 5-oxoprolina (Veeravalli et al., 2010).

4.1. Biosíntesis de GSH en el Sistema Nervioso.

Aunque las neuronas expresan toda la maquinaria necesaria para la biosíntesis *de novo* GSH, los astrocitos aumen mayoritariamente esta función. Estas células gliales exportan GSH a una velocidad de 2.1 nmol/h · mg proteína, pudiendo ser capaces en 1 h de liberar el 10% de su contenido en el tripéptido (Dringen et al., 1997a), cuyo reciclaje tiene una vida media de 5 h (Devesa et al., 1993); así, cuanto mayor es la concentración de GSH en los astrocitos, mayor será su liberación. Un fenómeno similar ocurre para los precursores de GSH, que las neuronas utilizan para sintetizar GSH (Sagara et al., 1996).

El GSH liberado de los astrocitos puede sufrir una posterior transpeptidación a cisteinilglicina (CysGly) y γ -glutamil-aminoácido, catalizada por la γ -glutamyl transpeptidasa (GGT) (**Esquema III**). La transpeptidación por GGT es el primer paso en la captación de GSH por las neuronas, ya que la adición de cisteína o cistina al correspondiente dipéptido es más efectiva que un supuesto transporte de GSH no hidrolizado (Sagara et al., 1993; Zeevalk et al., 2008). Las neuronas también pueden captar directamente la CysGly a través de la aminopeptidasa N (ApN) e incorporarla a la biosíntesis de GSH (Dringen et al., 2001)

Las neuronas utilizan áridamente la CysGly, NAC o γ -glutamylcisteína (γ GC) como precursores de GSH, siendo imprescindible su escisión previa mediante dipeptidasas (Dringen, 2000; Martin and Teismann, 2009). En el caso de γ GC, ésta puede formarse por la transpeptidación del grupo γ -glutamilo del GSH con cisteína o cistina libre y ser utilizada también en astrocitos, en los cuales no es necesaria su hidrólisis para la formación de GSH (Dringen et al., 1997a). En menor medida, el GSSG se puede liberar de los astrocitos, tal y como se ha demostrado con otros tipos celulares, y servir como precursor de la síntesis *de novo* de GSH en neuronas (Dringen, 2000).



Esquema III. Síntesis de GSH en el sistema nervioso. La mayoría de la síntesis de GSH en el sistema nervioso se realiza por los astrocitos. La utilización de precursores para este proceso difiere con respecto a las neuronas, en especial en lo referente al uso directo de cistina y cisteinil-glicina oxidada (Cysgly)_{ox}. Las dipeptidasas y la aminopeptidasa N (ApN) permiten la utilización de CysGly por la neurona, una vez escindido. En la parte superior aparecen los principales precursores que pueden ser utilizados en neuronas (N) o astrocitos (A) para la síntesis de GSH.

4.2. Moduladores de la síntesis de GSH.

La concentración de GSH está regulada por factores que afectan a su síntesis o degradación. Los más relevantes son los activadores, que incrementan la concentración de GSH mediante la modulación de la GCL. El estrés oxidativo y nitrosativo, las citoquinas inflamatorias, la insulina o la conjugación de GSH son eventos que pueden incrementar la transcripción o actividad de esta proteína (Lu, 2000; Wu et al., 2004). En

Introducción

este sentido, tienen una alta relevancia las secuencias (GTGACNNNGC) de elementos de respuesta antioxidante (ARE), localizadas principalmente en las regiones promotoras en genes que codifican para proteínas de detoxificación de compuestos o de respuesta antioxidante [Kang, 2005, 1644]. Nrf2 es un factor de transcripción de la familia bZIP (basic leucine zipper), normalmente se encuentra secuestrado en el citosol mediante la proteína represora Keap1. En situaciones de estrés oxidativo, es capaz de translocarse al núcleo y formar heterodímeros con miembros de la familia Maf y unirse a secuencias ARE, promoviendo la transcripción de genes de proteínas antioxidantes [Minelli, 2009, 1144; Kang, 2005, 1644]. Así, mediante este mecanismo, Nrf2 promueve la transcripción de ambas subunidades de la GCL. Otros factores neurotróficos como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), de cerebro (BDNF), o nervioso (NGF), han demostrado también su eficacia en la eliminación de ROS mediante el incremento de la síntesis de GSH o de enzimas implicadas en su metabolismo (Dringen, 2000).

Durante episodios de reducción del aporte de glucosa, por ejemplo, en diabetes o ictus, la síntesis de GSH disminuye (Griffith, 1999; Papadopoulos et al., 1997), dada la dependencia de ATP en su síntesis (Suzuki and Kurata, 1992).

La disponibilidad de aminoácidos precursores como la cisteína es esencial por tratarse del aminoácido limitante de la biosíntesis de GSH (Sagara et al., 1993). Por su parte, el aporte de glutamato depende de la degradación proteica y de su síntesis *de novo*. Así, en astrocitos, la glutamina, asparragina, ornitina y prolina convertirse en glutamato (Dringen, 2000). Además, el glutamato inhibe la captación de cistina cuando la concentración de glutamato extracelular es alta, intercambiándose con ella por el sistema Xc⁻ de transporte (Teshigawara et al., 1995). Ni el glutamato ni la glicina son limitantes en la biosíntesis de GSH, dada sus altas concentraciones intracelulares (Dringen et al., 1999; Wu et al., 2004).

La cisteína, tercer aminoácido necesario para la síntesis de GSH, solo es capaz de comprometer la biosíntesis del tripéptido en situaciones de desnutrición, sepsis, inflamación u oxidación en respuesta a altos niveles de glucagón o diabetes (Wu et al., 2004).

5. Enzimas del metabolismo de GSH

5.1 Glutamato Cisteína Ligasa (GCL)

La glutamato cisteína ligasa (GCL, EC 6.3.2.2) es la enzima limitante en la biosíntesis de glutatión, que precisa de Mg^{2+} , Mn^{2+} y ATP como cofactores. El mecanismo de la reacción de la GCL incluye un primer paso en el que L-glutamato y ATP forman un grupo γ -glutamilfosfato que, posteriormente, reacciona con L-cisteína para dar lugar a γ -glutamylcisteína (γ GC), dipéptido precursor de GSH (Griffith, 1999).



GCL es heterodimérica, constituida por una subunidad pesada o catalítica de 73 KDa (GCL_H o GCL_{cat}) y una subunidad ligera o moduladora, con un peso de 30 KDa (GCL_L o GCL_{mod}) (Huang et al., 1993a; Huang et al., 1993c; Yan and Meister, 1990). En humanos, la GCL_H se ha mapeado en el gen 6p12, con un único transcrito (Huang et al., 1993a), mientras que la GCL_L se encuentra en el gen 1p21-p22, con dos transcritos (Gipp et al., 1995; Tsuchiya et al., 1995). En cambio, en levaduras y bacterias se ha descrito un único gen (Dalton et al., 2004).

La GCL_L es enzimáticamente inactiva, pero tiene un papel fundamental como moduladora de la actividad catalítica y de la inhibición competitiva no alostérica por GSH. Esta inhibición se debe fundamentalmente a la interferencia del tripéptido con el sitio de unión del glutamato y a otro sitio modulador en la enzima, de forma dependiente del grupo tiol del GSH [Richman, 1975, 1422; Seeling, 1984, 9345]. Ello produciría un cambio conformacional en la GCL, que inhibe la enzima

Constantes cinéticas de GCL			
<u>GCL_H</u>	Km glut (mM)	Km cys(mM)	Ki GSH (mM)
Rata (Huang et al., 1993b; Huang et al., 1993c; Richman and Meister, 1975)]	18.20	0.20	1.80
Humano (Misra and Griffith, 1998; Tu and Anders, 1998)]	3.20-3.50	0.13-0.50	1.00
Ratón (Chen et al., 2005; Krejsa et al., 2010)]	1.60-2.20	0.14-0.27	0.23
<u>GCL_{holo}</u>			
Rata (Huang et al., 1993b; Huang et al., 1993c; Richman and Meister, 1975)	1.40	0.20-0.35	2.30-8.20
Humano (Misra and Griffith, 1998; Tu and Anders, 1998)	0.70-1.90	0.10-0.80	2.20-3.30
Ratón (Chen et al., 2005; Krejsa et al., 2010)	0.48-0.86	0.17-0.22	1.30

Tabla III. Cinética de la GCL. Constantes cinéticas de la GCL para distintas especies. La formación de la holoenzima (GCL_{holo}) disminuye la K_m para los sustratos y aumenta la K_i para el GSH, con respecto a la subunidad catalítica de la enzima (GCL_H).

En comparación con GCL_H en solitario, la subunidad moduladora contribuye a aumentar la K_i para el GSH y disminuir la K_m para el ATP (Chen et al., 2005) y para el glutamato (Huang et al., 1993a; Huang et al., 1993c) (**Tabla III**), haciendo que esta constante sea menor que la concentración fisiológica de glutamato en la mayoría de tejidos (1-4 mM) (Dalton et al., 2004; Griffith, 1999). Sin embargo, en la especie humana, como en ratón, la K_m para glutamato es similar entre la holoenzima (GCL_{holo}) y la GCL_H (Dalton et al., 2004), lo que se manifiesta en la viabilidad de ratones *ko* para la GCL_L, a pesar de presentar un descenso dramático en los niveles de GSH (Yang et al., 2002b). En estas especies, la K_i para el GSH también es similar entre la GCL_H y la GCL_{holo} (Griffith, 1999) y la K_m para la cisteína no se encuentra modulada por la GCL_L (Chen et al., 2005). La K_m para la cisteína es de 0.1-0.3mM, convirtiéndolo en el aminoácido limitante de la síntesis de GSH, por su similitud a la concentración de cisteína en tejido (0.15 mM-0.25 mM) (Lu, 2009).

5.1.1 Regulación de GCL.

La actividad de la GCL determina la velocidad de síntesis de GSH. La GCL se regula a nivel transcripcional y post-transcripcional, incluyendo variaciones en la estabilidad

del mRNA y modificaciones post-traduccionales. Así, bajo estrés oxidativo, la formación de GSSG promueve un incremento en la afinidad de la GCL por glutamato (Griffith, 1999; Soltaninassab, 2000, 163; Huang et al., 1993c).

La GCL_H es limitante de la síntesis de GSH, ya que la sobreexpresión de esta subunidad es suficiente para incrementar las concentraciones del tripéptido (Diaz-Hernandez et al., 2005; Huang et al., 1993c; Soltaninassab et al., 2000). El promotor de esta subunidad, contiene secuencias consenso para elementos de respuesta antioxidante (ARE, GTGACNNNGC) y electrófilos (EpRE, TGACTIONA); este último se encuentra 3.1 Kb corriente arriba del sitio de transcripción de GCL_H o 263 y 32 bases corriente arriba del de GCL_L (Wild et al., 1999). Mientras a ARE puede unirse Nrf2, EpRE se puede unir la familia de proteínas activadoras AP-1, que incluye a las proteínas Jun y Fos (Rahman, 2005). Este factor de transcripción de expresión de enzimas de detoxificación en fase II que es crítico para la inducción constitutiva de GCL_H, localizado en una región proximal a una caja TATA (Rahman, 2005; Townsend et al., 2003). El factor de transcripción nuclear kappa-B (NFκB), presente en el promotor de GCL_H, también puede inducir su expresión en respuesta al factor de necrosis tumoral α (TNFα) o a estrés oxidativo (Rahman, 2005). Otros activadores de la transcripción de GCL son Sp-1, AP-2, o el elemento de respuesta a metales (MRE) (Lu, 2009). También existen dos secuencias E-box (CACATG) a la que se pueden unir c-Myc o N-Myc en respuesta a H₂O₂ (Benassi et al., 2006; Veas-Perez de Tudela et al., 2010). Las secuencias ARE, EpRE y E-box están presentes igualmente en el promotor de GCL_L, de manera que puede regularse por factores comunes a los que incrementan la síntesis de GCL_H (Lu, 2009).

La regulación post-transcripcional de la GCL_H se basa fundamentalmente en la estabilidad del mRNA y en modificaciones post-traduccionales. La GCL_H disminuye su actividad al fosforilarse por proteína kinasa A (PKA), proteína kinasa C (PKC) o proteína kinasa dependiente de Ca²⁺-Calmodulina II (CMK) (Lu, 2009; Soltaninassab et al., 2000). Por el contrario, este tipo de fosforilación no se ha observado en GCL_L (Soltaninassab et al., 2000). A la inhibición de la holoenzima puede contribuir la nitrosilación por NO o por compuestos nitrosilados, que pueden transnitrosilar tioles del sitio activo (Griffith, 1999). Por otro lado, en determinadas formas de apoptosis, la caspasa 3 es capaz de escindir la GCL_H (Franklin et al., 2002), contribuyendo a la muerte celular con una disminución de los niveles de GSH.

5.1.2. Deficiencia de GCL.

La importancia de la GCL y del metabolismo del GSH queda patente por los efectos causados en pacientes que presentan inhibición de la enzima. En estos, suele verse alterada la región codificante de la GCL, que altera su actividad catalítica (Dalton et al., 2004). Las alteraciones más comunes por déficit de GCL son anemia hemolítica, dislexia y acidosis metabólica, junto a fallos neurológicos como retraso mental, degeneración espino-cerebelar o alteraciones neuromusculares (Njalsson, 2005). Existen polimorfismos del gen de la GCL que determinan alteraciones en la concentración de GSH, y mutaciones en la región promotora de la GCL_H dan cuenta de un descenso del 50% en las concentraciones de GSH. Por su parte, ciertos polimorfismos de la GCL_L determinan riesgo de infarto de miocardio y defectos en la función vasomora arterial coronaria (Dalton et al., 2004).

Mientras los ratones heterocigotos presentan sólo un ligero descenso de los niveles de GSH, los homocigotos deficientes en la subunidad catalítica de la enzima ($GCL_H^{-/-}$) carecen por completo de la síntesis *de novo* de GSH y no gastrulan en el día de gestación 8.5 (E8.5), presentando signos de apoptosis desde E7.5 (Dalton et al., 2000; Shi et al., 2000). Los fallos derivados de la ausencia de la proteína no pueden ser rescatados mediante la administración de NAC (Shi et al., 2000) o etil éster de GSH (Dalton et al., 2000) en embriones, aunque sí en blastocistos en cultivos.

A diferencia de la subunidad catalítica o pesada, los ratones *ko* para GCL_L ($GCL_L^{-/-}$) son viables, pero presentan menor ganancia de peso y tienen menores niveles de GSH (Ristoff et al., 2002). Resulta muy llamativo que los ratones $GCL_L^{-/-}$, a pesar de tener una deficiencia de ~90% en GSH, no presentan consecuencias fisiológicas relevantes, salvo una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y una disminución de los niveles de cisteína, especialmente en tejidos con altos niveles de γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT) (Dalton et al., 2004; Yang et al., 2002b).

5.2. Glutación Sintetasa (GSS).

La glutatión sintetasa (GSS, EC 6.3.2.3) es la enzima que añade glicina a γ GC para formar GSH en una reacción que requiere ATP. Es un homodímero con subunidades de 52 KDa, unidas entre sí por fuerzas no covalentes (Griffith, 1999) y ampliamente conservada entre especies (Gushima et al., 1984).

El sitio activo de la enzima es altamente específico para la unión de la glicina y la cisteína de la γ GC, pero no para el grupo γ -glutamilo, que puede ser reemplazado por varios homólogos (Lu, 2009).



La K_m para ATP y glicina es de 0.04 y 0.9 mM respectivamente, encontrándose por debajo de las concentraciones fisiológicas de ATP (2-4 mM) y glicina (1.5-2 mM) en el hígado de rata (Wu et al., 2004). Dependiendo del tejido, su actividad es superior a la de la GCL; esto es, de 2-5 veces en hígado y hasta un 36% superior en músculo esquelético (Lu, 2009). La K_m de la GSS es ~ 12 veces menor que la γ -glutamilciclotransferasa (GCT) para γ GC.

5.2.1 Regulación de la GSS.

A pesar de haberse clonado sus promotores (Lee et al., 2005; Yang et al., 2002a), la regulación de la GSS se conoce menos que la de GCL. El promotor de la GSS en rata contiene sitios de unión para AP-1 o NF1, que pueden actuar como potenciadores o inhibidores, respectivamente (Yang et al., 2002a). En humanos, Nrf1 y Nrf2 pueden inducir el promotor de la GSS, siendo Nrf2 necesario para la expresión basal de la enzima (Lee et al., 2005).

La inducción de la actividad de la GSS puede incrementar las concentraciones de GSH, pero únicamente cuando está acompañada de un incremento de la expresión o actividad de la GCL (Lu, 2009; Njalsson, 2005).

5.2.2 Deficiencia de GSS.

La pérdida de función de la GSS es letal [Shi ZZ, 1996, 362; Dhal, 1997, 1147], tal y como sugieren los estudios en humanos con deficiencia de esta enzima. Así, se ha observado un 25% de mortalidad neonatal por infecciones, convulsiones y desbalance electrolítico durante el periodo postnatal y niñez (Njalsson, 2005; Ristoff et al., 2002). La gravedad de la patología en estos pacientes depende del nivel de inactivación de la enzima. Hay una forma moderada de la patología, que cursa con anemia hemolítica, y una forma severa, caracterizada por 5-oxoprolinuria y acidosis metabólica (Polekhina et al., 1999). Estos pacientes también presentan retraso mental y alteraciones motoras (Ristoff and Larsson, 1998), sugiriendo un papel esencial de GSH en la funcionalidad neurológica y neuromotora.

Como consecuencia de la inhibición de la GSS, se produce un exceso de γ GC, que por acción de la γ -glutamylciclotransferasa (GCT) se convierte en cisteína y 5-oxoprolina. Ésta es responsable de la acidosis metabólica, al superar la capacidad de la 5-oxoprolinasa (5-OPasa) [Meister, 1995, 1461; Njalsson, 2005, 1938], lo que permite utilizarla como método de diagnóstico de la enfermedad. En estos pacientes se ha propuesto que la γ GC puede actuar como sustituta de GSH, ya que la suma de las concentraciones del dipéptido y GSH remanente en estos individuos es similar al contenido de GSH en individuos control (Ristoff et al., 2002).

En levaduras, la inhibición de la Gsh1 (homóloga a GCL en mamíferos) causa disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, lo que les impide crecer en medio mínimo sin adición exógena de GSH. Sorprendentemente, estos efectos no se observan al inhibir la Gsh2, homóloga de GSS (Grant et al., 1997).

5.3. γ -glutamyl transpeptidasa (GGT).

La γ -glutamyltranspeptidasa (GGT, EC 2.3.2.2) es la única enzima del metabolismo del glutatión que se encuentra en la membrana plasmática. Allí hidroliza GSH, lo que permite suministrar cisteína y precursores de glutatión, a través del ciclo de γ -glutamilo. De hecho, hay una forma soluble plasmática que sirve de diagnóstico en enfermedades

hepáticas, biliares y pancreáticas (Pompella et al., 2007). Debido a su función en la síntesis y reciclaje del GSH, además de en la detoxificación de xenobióticos, se considera un componente esencial en la defensa frente al estrés oxidativo (Paolicchi et al., 2002; Paolicchi et al., 2003) (**Esquema IV**). Otras funciones de la enzima son la modulación de la S-tiolación de proteínas, detoxificación extracelular o catabolismo de GSNO (Pompella et al., 2007).

Nrf2 induce GGT de manera conjunta a GCL, tal y como se observa en tumores humanos, donde suministra precursores para la síntesis de GSH y, por tanto, contribuye a la resistencia frente a la quimioterapia (Pompella et al., 2007).

Los ratones deficientes de GGT (*GGT^{-/-}*), presentan una disminución crónica de GSH, bajos niveles de cisteína plasmática, inmadurez sexual, retraso del crecimiento, desarrollo de cataratas y muerte prematura (Lieberman et al., 1996; Will et al., 2000). Las mitocondrias de hígado de estos ratones tienen un 50% de reducción en el contenido de GSH y el RCR (Respiratory Control Ratio). Otros efectos mitocondriales son la disminución de la fosforilación oxidativa y ATP, que pueden revertirse con la administración de NAC (Will et al., 2000).

5.4. Glutación S-transferasa (GST)

La GST (EC 2.5.1.18) pertenece a una familia compuesta por enzimas diméricas multifuncionales, con formas citosólica (α , μ , π , σ , τ , Ω y ζ), mitocondrial (κ) o microsomal (MAPEG). Entre estas isoformas existen grandes variaciones en la cinética y especificidades (Hayes et al., 2005). Su principal actividad es catalizar la conjugación de GSH con determinados electrófilos por mediación del grupo sulfhidrilo (Douglas, 1987) (**Esquema IV**), resultando en sustitución o adición nucleofílica según el sustrato. Sin embargo, la enzima puede utilizar otros tioles como la γ GC, siendo la K_m para la γ GC 6-20 superior que para GSH (Sugimoto et al., 1985).

Los procesos de conjugación mediados por la GST son prevalentes en el hígado (Kim and Lee, 2007) y la convierten en una de las principales enzimas de eliminación de peróxidos lipídicos y xenobióticos en fase II. Una vez producida la conjugación y formación del grupo GS-hidrofóbico, éste se exporta al exterior celular a través

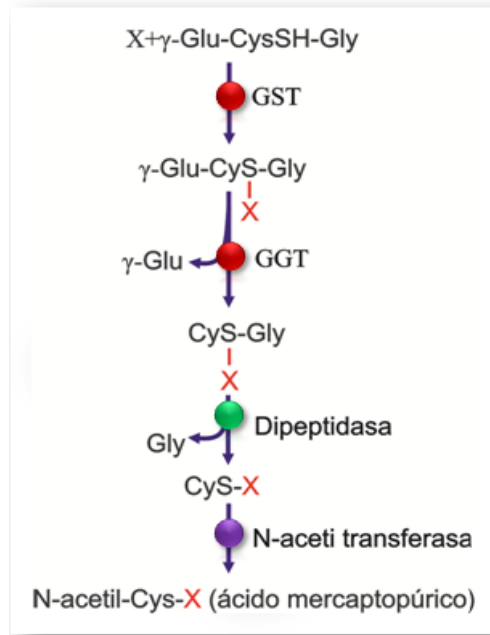
Introducción

proteínas MRP (Multidrug Resistant Proteins, descritas en el apartado 5) y metabolizado a mercaptopuratos (Hayes et al., 2005).

Los genes de las clases α , μ y π pueden inducirse por agentes quimioprotectores, lo que contribuye a la actividad anticarcinogénica (Kensler, 1997). Además, varios factores de crecimiento, pro-oxidantes y agonistas de receptores activados de proliferación de peroxisoma (PPAR γ) aumentan la expresión de GST. Tiene especial relevancia el sitio de unión a Nrf2 en el promotor de GSTs en la inducción de su actividad (Kim and Lee, 2007).

Los modelos de *ko* para las distintas isoformas de GST son más sensibles a xenobióticos, estrés oxidativo o infecciones bacterianas, y muestran mayor deprivación de la respuesta antiinflamatoria o inmunológica, según el tipo de GST afectada (Hayes et al., 2005).

En relación con enfermedades neurodegenerativas, mientras que por sí misma no presenta efectos, la deficiencia en GstS1 (homóloga a GST en humanos) incrementa la pérdida neuronal en modelos de *Drosophila* deficientes en parkina, una de las principales proteínas involucradas en la enfermedad de Parkinson. (Whitworth et al., 2005).



Esquema IV. Eliminación de compuestos por conjugación con GSH. La actividad de la GST y la GGT permiten la eliminación de compuestos y xenobióticos conjugados a GSH.

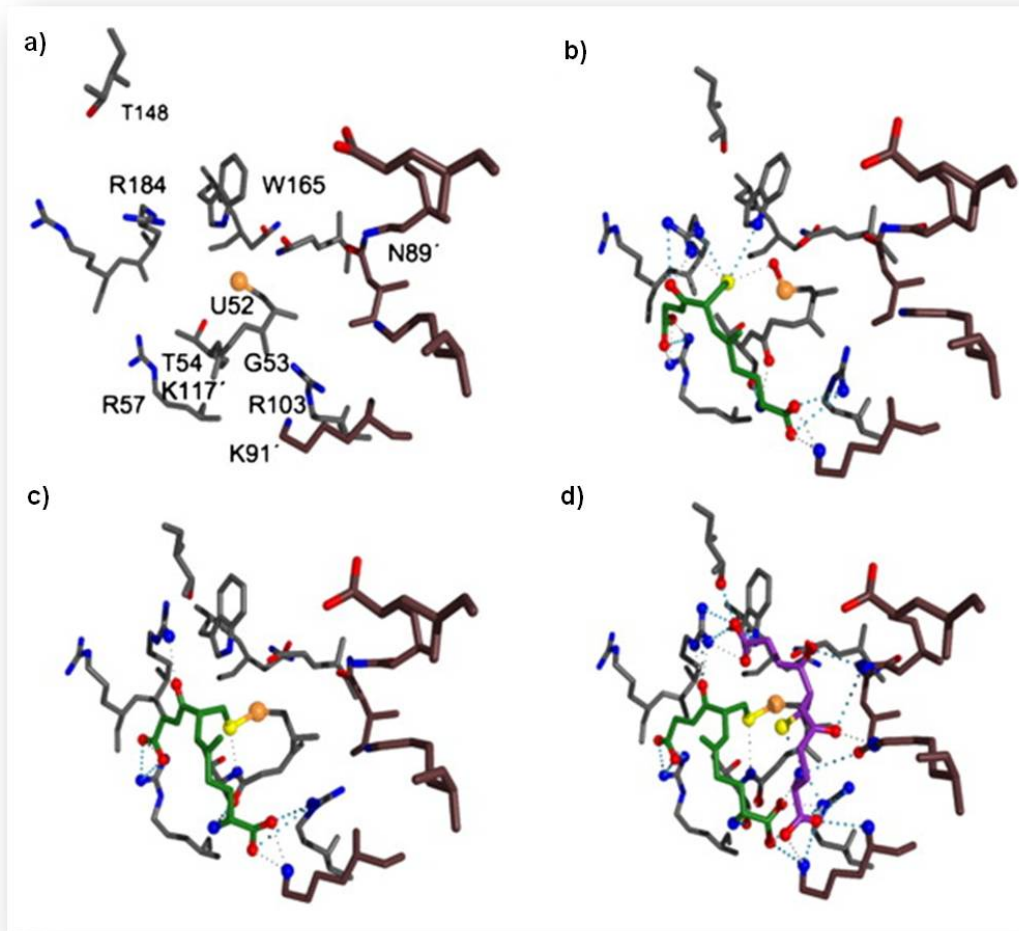
5.5. Glutatión peroxidasa (GPx).

La familia de las glutatión peroxidadas (GPx. EC 1.11.1.9) comprende una serie de hasta cinco proteínas (GPx1-4, y GPx6) que constan de una selenocisteína en su sitio activo (Toppo et al., 2009). Debido a la alta reactividad de la selenocisteína con el H₂O₂, catalizan la reducción de éste y de hidroperóxidos orgánicos, normalmente mediante la utilización de GSH o tiorredoxina como cofactores (Maiorino et al., 2007).

Las GPx son bastante inespecíficas en cuanto a sus sustratos oxidantes (Flohe et al., 1971; Takebe et al., 2002), que incluyen una amplia variedad de hidroperóxidos orgánicos y peróxidos lipídicos. Sin embargo, la GPx4 parece la más específica, al presentar la mayor eficiencia en la reducción de peróxidos lipídicos. Ello permite proteger y mantener la funcionalidad de las biomembranas, especialmente en mitocondria (Flohe et al., 1971). La GPx1 también puede reaccionar con una gran variedad de hidroperóxidos orgánicos, aunque en el caso de los peróxidos lipídicos, precisa que éstos sean solubles para su reducción por la enzima (Toppo et al., 2009).

A pesar de su nombre, salvo para la GPx1 (Flohe et al., 1971; Maiorino et al., 2007; Takebe et al., 2002), el sustrato donador preferente en las GPx no suele ser el GSH, sino la tiorredoxina o proteínas relacionadas que contienen el motivo CXXC (cisteína-X-X-cisteína) (Toppo et al., 2009). Los estudios de especificidad han demostrado que los grupos carboxilo de glicina o glutamato de GSH median en su unión al centro activo. Tras la reacción con el H_2O_2 , la cisteína peroxidática de la GPx se oxida a ácido sulfénico, condensándose posteriormente con la cisteína del antioxidante para formar un disulfuro (Fourquet et al., 2008). La unión del GSSG no se ha podido modelar, sugiriendo una rápida liberación del producto, de acuerdo a la baja inhibición por producto de la enzima (Toppo et al., 2009).

En la actividad de las GPx no es limitante en el metabolismo de GSH, ya que no depende de su concentración, sino del suministro de NADPH, que en la mayoría de tejidos depende del ciclo de las pentosas fosfato. Por tanto, el NADPH determina la capacidad de regeneración de GSH y, en consecuencia, la rapidez con la que el H_2O_2 puede detoxificarse por la GPx (Flohe, 2009; Toppo et al., 2009).



Esquema V. Unión de GSH a GPx1. Modelos basados en la estructura de rayos X de la Gpx1 bovina oxidada, donde sólo se representan los dímeros de la estructura tetramérica por simplicidad; los residuos de la segunda unidad, aparecen en marrón. **a)** Enzima en estado basal, donde se señalan los residuos implicados en la unión a GSH, que aparece en verde en **b)**, y que se orienta mediante fuerzas electrostáticas para reaccionar con el grupo selénico. **c)** Se origina así el intermediario o proteína Se-glutationilada. **d)** Finalmente, una segunda molécula de GSH (en magenta) puede atacar la unión selenil-sulfuro. Las líneas discontinuas señalan puentes de hidrógeno o interacciones iónicas. Adaptado de Toppo y cols. (Toppo et al., 2009).

En la actividad de las GPx no es limitante en el metabolismo de GSH, ya que no depende de su concentración, sino del suministro de NADPH, que en la mayoría de tejidos depende del ciclo de las pentosas fosfato. Por tanto, el NADPH determina la capacidad de regeneración de GSH y, en consecuencia, la rapidez con la que el H_2O_2 puede detoxificarse por la GPx (Flohe, 2009; Toppo et al., 2009).

Por su relevancia y por tratarse de las únicas GPx's presentes en la mitocondria, a continuación se describen con más detalle las GPx1 y GPx4.

5.5.1. GPx1.

Esta isoforma fue la primera identificada de su familia, y da nombre a las GPx, debido a su alta especificidad para GSH, pese a que otras proteínas de la familia no presentan dicha especificidad (Toppo et al., 2009). Está presente en el citosol y matriz mitocondrial, y es la principal enzima encargada de la eliminación de H₂O₂ (Brigelius-Flohe, 1999). A pesar de su relevancia, los ratones *ko* para la GPx1 son viables y tienen un desarrollo normal, aunque con una extremada sensibilidad a los daños oxidativos. Ello implica que ninguna de las otras selenoproteínas puede competir con la GPx1 en la defensa frente a un daño generalizado por H₂O₂ (Toppo et al., 2009).

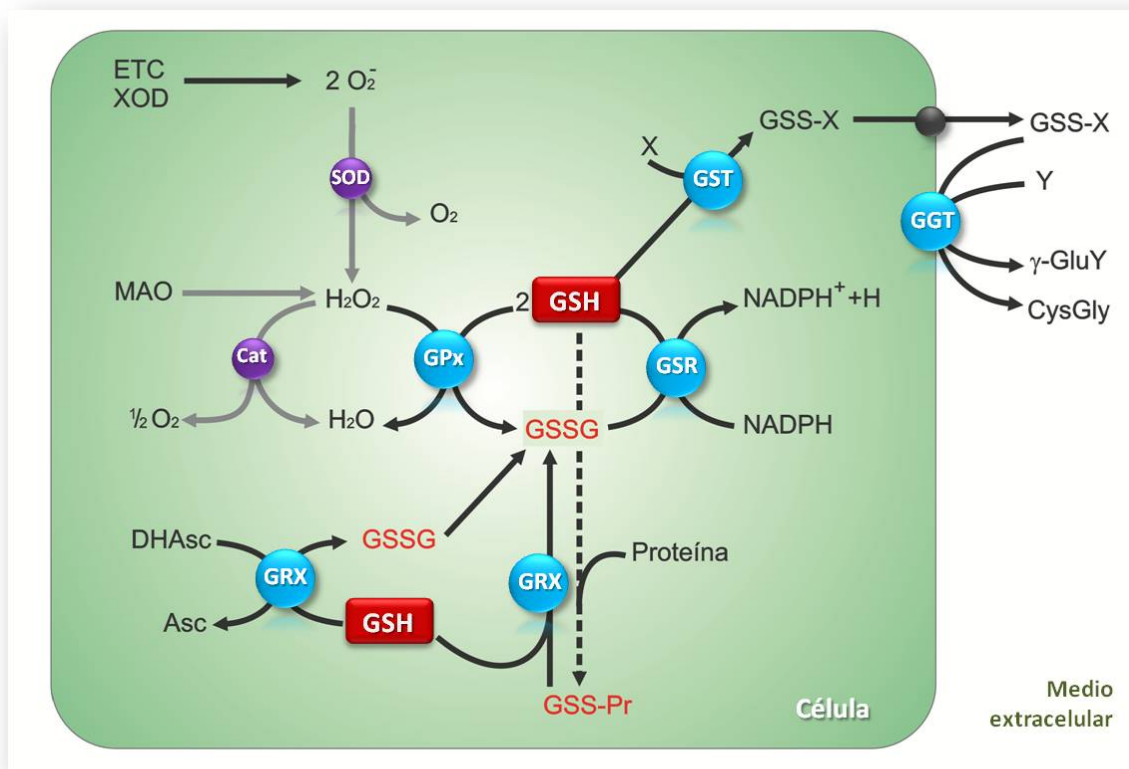
En el estudio sistemático de su reactividad con diversos compuestos, se determinó que los grupos carboxilos de GSH se unen a las cargas positivas de la enzima (Flohe et al., 1971). Ello se confirmó mediante el modelado molecular de la unión de GSH al centro activo (ver **esquema V**), donde cuatro argininas y una lisina confieren el ambiente electrostático por el que GSH se orienta en el centro activo de forma que el grupo sulfhidrilo debe reaccionar con el selenio, tras la entrada de una segunda molécula de GSH, con el sulfuro de selenio (Toppo et al., 2009).

5.5.2. GPx-4.

La GPx4 tiene el sitio menos específico de la GPx para la unión de sustratos, entre los cuales no suele encontrarse la tiorredoxina (Trx), pero sí el GSH. Puede reaccionar con cisteína (Takebe et al., 2002) y con una larga variedad de tioles proteicos (Toppo et al., 2009). Aunque puede interferir ligeramente con la GPx1 en la utilización de distintos sustratos, la GPx4 tiene muy poca relevancia en el metabolismo del H₂O₂ y, sin embargo, es trascendental en la reducción de peróxidos lipídicos libres o asociados a membrana. Así, es la única proteína de su familia capaz de reducir hidroperóxidos integrados en las membranas lipídicas, contribuyendo así a antagonizar la acción de determinadas lipooxigenasas involucradas en apoptosis celular (Toppo et al., 2009). Esta capacidad protectora de membranas puede contribuir a explicar la letalidad prenatal observada en los ratones GPx4^{-/-} (Yant et al., 2003).

5.6. Glutación reductasa (GSR).

La GSR (EC 1.6.4.2), presente tanto en citosol como en mitocondria y es un dímero de 120 KDa. Constituye la mayor forma de regeneración del GSH a partir de su forma oxidada y, por tanto, un sistema de mantenimiento del estado redox celular (Rahman et al., 1999) y de defensa frente al daño oxidativo [Tandogan, 2006, 230; Kelner, 2000, 366]. En este proceso, la enzima utiliza NADPH como cofactor, el cual también inactiva a la proteína tras la reducción del GSH (Rahman et al., 1999). La GSR se puede presentar en su forma mitocondrial o citosólica, indistinguibles bioquímicamente (Kelner and Montoya, 2000).



Esquema VI. Enzimas del metabolismo del GSH. Principales enzimas y reacciones en las que el GSH es utilizado en la célula. Tras la reducción de agentes oxidantes, en especial H_2O_2 por la glutatión peroxidasa (GPx), el GSH es reducido mediante la glutatión reductasa (GSR). La glutarredoxina (GRX) permite la conjugación con proteínas o la reducción del Dihidroascorbato. Mediante glutatión transferasa (GST) es posible la formación de conjugados, que son exportados al espacio extracelular. Allí, la γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT), escinde los conjugados y comienza el reciclaje del GSH. En la detoxificación de ROS participan otros sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Cat).

5.7. Glutarredoxinas (GRX).

Las glutarredoxinas (Grxs. EC 1.20.4.1) son oxidoreductasas versátiles con un sitio activo Cys-Pro-Tyr-Cys, encargadas de glutationilar proteínas de forma reversible, reduciendo disulfuros mixtos mediante la utilización de GSH como agente reductor (Zeevalk et al., 2008). Constituidas por cuatro isoformas en humanos y distribuidas en distintos compartimentos celulares, como el citosol (Grx1) o la mitocondria (Grx2), se ha demostrado su participación en la regulación de la apoptosis (Franco and Cidlowski, 2009). Tanto la Grx1 como la Grx2 están presentes en el cerebro; de hecho, la Grx1 es exclusivamente neuronal (Balijepalli et al., 2000). Poseen actividad como dihidroascorbato reductasa (Wells et al., 1990), sugiriendo su participación en el reciclaje de ascorbato en neuronas, especialmente en estrés oxidativo (Zeevalk et al., 2008). Los cambios en la tiolación de proteínas promovidos por Grxs, le confieren la capacidad de modular la expresión génica. Asimismo, pueden también intervenir en la síntesis y reparación de DNA o de proteínas, así como en vías de señalización celular ligadas al metabolismo del GSH (Dalle-Donne et al., 2007).

5.8. Enzimas que utilizan GSH en la mitocondria.

Debido a la ausencia de catalasa en la mitocondria, el GSH es el principal cofactor encargado de eliminar H_2O_2 en el orgánulo, siendo necesaria la participación de GPx1 (Mari et al., 2009). Los disulfuros de proteínas unidas a GSH se pueden reducir por Grx2. En el mantenimiento del estado reducido de los tioles de proteínas contribuye, asimismo, el sistema tiorredoxina (Trx)-Trx reductasa (TrsR), pudiendo interactuar la tiorredoxina también con la peroxirredoxina III (PrxIII), exclusiva de mitocondria para la detoxificación de peróxidos de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos (Mari et al., 2009).

Por otro lado, la GPx4, localizada mayoritariamente en el espacio intermembrana mitocondrial, se considera crítica en la defensa frente al daño oxidativo en membranas por su actividad reductora de hidroperóxidos. De ahí su función esencial para la supervivencia de ratones $GPx4^{-/-}$ (Yant et al., 2003). En la protección de membranas mitocondriales frente al estrés oxidativo, también participa la GST (Chen et al., 2002);

sin embargo, la principal función de la GST mitocondrial (isoforma κ), es la conjugación del GSH con electrófilos endógenos o xenobióticos (Hayes et al., 2005).

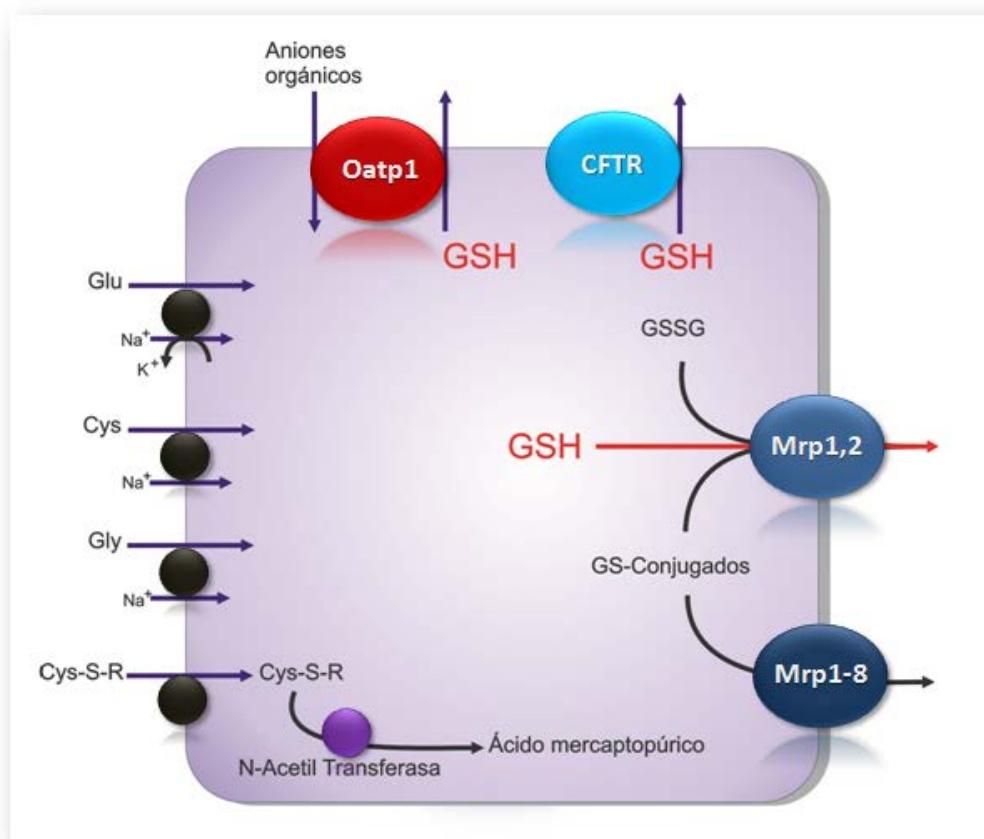
6. Transporte y metabolismo del GSH.

Una considerable proporción de GSH se exporta de la célula, lo que constituye un paso esencial en su reciclaje (Ballatori et al., 2005; Ballatori et al., 2009). Este reciclaje de GSH es rápido, con una vida media de 2 a 6 h en células, y de segundos a minutos en plasma (Meister and Anderson, 1983; Meister and Tate, 1976). El rápido catabolismo por GGT y dipeptidasas reducen la concentración de GSH en plasma a 2-20 μM . (Wu et al., 2004). Estas dos enzimas se encargan de aportar precursores (Glu, Cys, Gly, Cys-Gly y otros péptidos formados por transpeptidación (Meister and Anderson, 1983) a la célula, donde participan en la síntesis *de novo* de GSH. Ello ocurre tras la captación de los precursores por varios transportadores de aminoácidos como Pept2, encargado de la reabsorción de Cys-Gly y otros di y tripéptidos (Ballatori et al., 2009; Frey et al., 2007).

Aunque un pequeño porcentaje proviene de la dieta, el GSH plasmático procede principalmente del hígado, de donde se exporta como tal o como $\gamma\text{-Glu-(Cys)}_2$ por la actividad GGT. A diferencia de GSH o GSSG, $\gamma\text{-Glu-(Cys)}_2$ sí se puede importar por las células para sintetizar GSH (Wu et al., 2004). Por su parte, glutamato y cisteína se importan a través del sistema de transporte de aminoácidos X_c^- , mientras que glicina lo hace por medio del transportador GLYT (Howard et al., 2010) o por ASC, éste último también compartido con la cisteína (Kießling et al., 2000).

El GSH se exporta mediante un transporte dependiente de transportadores (Ballatori et al., 2009; Wu et al., 2004). Así, en el transporte de GSH intervienen algunos miembros de la familia de proteasas ABC (ATP Binding Cassette) asociadas a resistencia múltiple a drogas (MRP/CFTR o ABCC), además de proteínas de la familia de transportadores de polipéptidos (OATP o SLC21A) (Franco and Cidlowski, 2006; Hammond et al., 2007; Li et al., 1998b; Mahagita et al., 2007) (**Esquema VII**). Las proteínas Mrp funcionan en general como bombas de exporte de aniones orgánicos con gasto de ATP y median el eflujo de GSH, así como de GSSG, GSNO y complejos de GSH-metal (Ballatori et al., 2009; Suzuki and Sugiyama, 1998). Sin embargo, no se ha

descrito el mecanismo de exportación y se desconoce si el GSH es un sustrato propio o actúa como cotransportador o facilitador del transporte de otros sustratos a través de MRP (Ballatori et al., 2009).



Esquema VII. Sistemas de transporte del GSH. El exporte celular de GSH puede ocurrir a través de proteínas asociadas a resistencia múltiple a drogas (CFTR) o en contranporte con aniones orgánicos, mediante transportadores de polipéptidos (OATP), que también pueden contribuir a la exportación de conjugados de GSH. Sin embargo, esta función es desempeñada fundamentalmente por proteínas de resistencia múltiple a drogas (Mrp) encargadas también de la exportación de GSSG. La importación de GSH es ineficiente, siendo sintetizado intracelularmente, tras la importación de precursores. Adaptado de (Ballatori et al., 2009).

En el cerebro, los astrocitos parecen ser las únicas células que liberan cantidades significativas de GSH o GSSG bajo condiciones de estrés oxidativo, siendo MRP1 el principal mecanismo de exportación de ambas moléculas (Hirrlinger et al., 2001 2003, 505). De hecho, la inhibición de la actividad de la MRP1 reduce en un 70% la exportación de GSH, resultando en una disminución del aporte de precursores para la síntesis *de novo* de GSH (Scheiber and Dringen, 2011).

Tal y como ocurre con ciertas MRP, la familia OATP está también implicada en el exporte de GSH (Franco and Cidlowski, 2006; Hammond et al., 2007). Entre ellas, la

isoforma Oatp1 utiliza el exporte de GSH para introducir aniones orgánicos (Li et al., 1998b). La exportación de conjugados de GSH es asumida por la Oatp8 en humanos, siendo la única de su familia implicada en el transporte de GSH (Hammond et al., 2007).

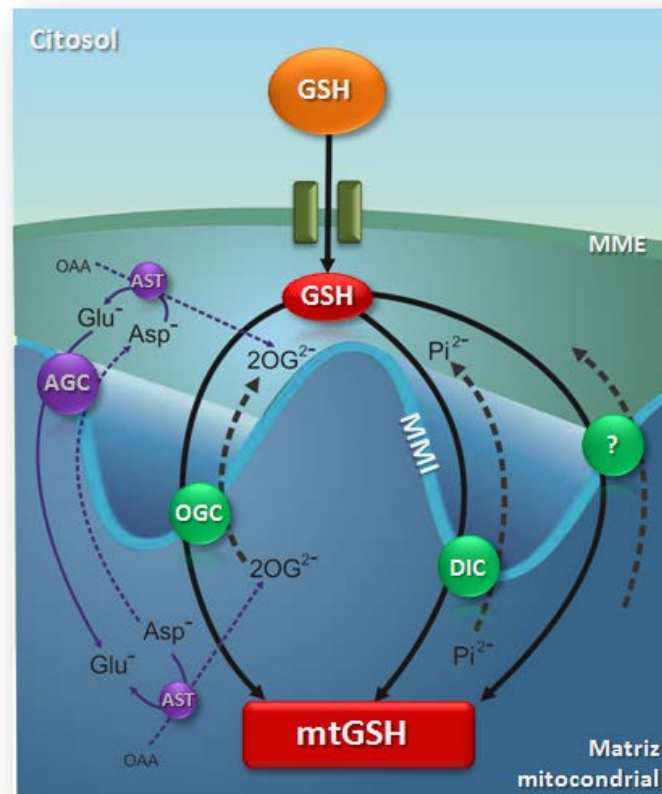
6.1 Transporte y regulación de GSH mitocondrial.

El transporte del GSH a la mitocondria (**Esquema VIII**) ocurre por difusión facilitada a través de la membrana mitocondrial externa (MME) por los canales de porina. Sin embargo, el transporte a través de la membrana interna (MMI) no es sencillo, dado el pH ligeramente básico de la mitocondria (pH=7.8) (Lash, 2006) y la naturaleza aniónica del GSH a pH fisiológico (Palmieri, 1994). En este caso participan antiportadores electroneutros (Chen et al., 2000; Martensson et al., 1990); entre éstos, destacan los transportadores de dicarboxilato (DIC) y 2-oxoglutarato (OGC), que ejecutan entre el ~60% y el ~20% del importe mitocondrial, respectivamente (Chen and Lash, 1998; Mari et al., 2009). Asimismo, se ha sugerido la participación de transportadores de tricarboxilatos (Wadey et al., 2009) en el proceso.

El transporte de GSH y el estado energético de la mitocondria se modulan recíprocamente. Así, la importación del tripéptido es más rápida en el estado 4 de respiración; sin embargo, el transporte se encuentra disminuido en el estado 3 o en presencia de protonóforos o antimicina A (Kurosawa et al., 1990). Además, en la modulación del transporte de GSH interviene el estrés oxidativo/nitrosativo, ya que modifican residuos de cisteína en los transportadores (Lash, 2006). Otro factor determinante en la importación es la composición lipídica de la membrana mitocondrial, facilitando el proceso en situaciones de mayor fluidez (Mari et al., 2009).

El transporte de GSH se inhibe por γ -glutamilglutamato, ciertos derivados S-alquilo del GSH, glutamato y dicarboxilatos, pero no por monocarboxilatos ni por protonóforos o desacopladores. El grupo glutamilo tiene un papel esencial en la unión del GSH al transportador o transportadores (Lash, 2006).

De especial relevancia es el hecho de que el exporte de GSSG al citosol es muy bajo, por lo que el NADPH(H⁺) de la matriz mitocondrial es esencial para reducirlo a GSH a través de la GSR (Rahman et al., 1999).

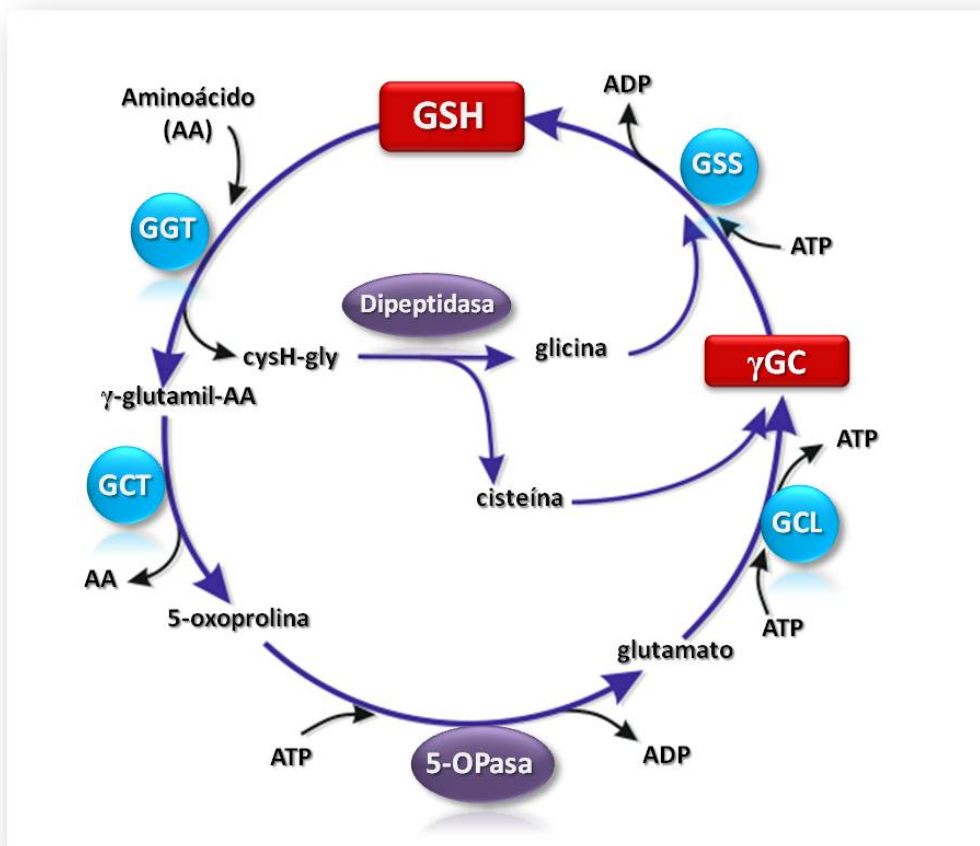


Esquema VIII. Transporte de GSH mitocondrial. En la mitocondria, la importación de GSH se realiza en una primera instancia, a través de canales de porina en la membrana mitocondrial externa (MME). Sin embargo, en la membrana mitocondrial interna (MMI), este proceso se realiza mayoritariamente por los transportadores de dicarboxilatos (DIC) y oxoglutarato (OGC), aunque se ha propuesto la intervención de transportadores de tricarboxilatos. En la regeneración del oxoglutarato que interviene en el transporte, participan la aspartato aminotransferasa (AST) y la AGC.

6.3. Ciclo γ -glutamilo.

El GSH se degrada por el ciclo γ -glutamilo, que contribuye a su reciclaje mediante la síntesis *de novo*. Así, una vez en el espacio extracelular, la GGT escinde el grupo γ -glutamilo del GSH (**Esquema IX**). Este residuo se transfiere posteriormente a un aminoácido receptor, originando así un derivado γ -glutamil-aminoácido (Njalsson, 2005). El aminoácido aceptor suele ser cistina, en cuyo caso la γ -Glu-cistina formada por transeptidación se transporta a la célula y se reduce por transhidrogenación con GSH a cisteína y γ -Glu-Cys (γ GC) (Anderson and Meister, 1983). De este modo, la γ GC puede actuar como sustrato directo de la GSS (Dalton et al., 2004) y contribuir, con ello, al mantenimiento del GSH de forma rápida, pero no durante largos periodos o en condiciones de deficiencia de GCL (Dalton et al., 2004).

Aparte de la cistina, otros aminoácidos neutros, como metionina y glutamina, son aceptores activos del grupo escindido del GSH. El γ -glutamil-aminoácido formado con éstos u otros aminoácidos puede convertirse en 5-oxoprolina y en aminoácidos libres por la γ -glutamilciclotransferasa (GCT. EC 2.3.2.4) (Griffith, 1999). La 5-oxoprolina resultante puede posteriormente servir como sustrato de la 5-oxoprolinasa (5-OPasa; EC 3.5.2.9) para generar glutamato, con gasto de ATP (Chen et al., 1998; Njalsson, 2005). La deficiencia en esta enzima o su saturación, causa 5-oxoprolinuria, tal y como sucede en pacientes deficientes en GSS (Njalsson, 2005).



Esquema IX. Ciclo γ -glutamilo. El catabolismo del GSH pasa por el ciclo del γ -glutamilo, donde la γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT) escinde lo escinde en un grupo γ -glutamilo, que es posteriormente conjugado con un aminoácido. El resto CysGly es importado a la célula para contribuir a la síntesis *de novo* del GSH. La γ -glutamylciclotransferasa (GCT) escinde el resto aminoacídico y genera 5-oxoprolina, posteriormente convertida en glutamato por la 5-oxoprolinasa (5-OPasa). La glutamato-cisteína ligasa (GCL y la glutatión sintetasa (GSS) completa el ciclo con la síntesis *de novo* de GSH.

La CysGly, que constituye la otra parte resultante de la escisión de GSH por la GGT, se hidroliza en sus aminoácidos constituyentes mediante la acción de una dipeptidasa de superficie celular (EC 3.4.13.19), siendo posteriormente recaptados por la célula y

pudiendo intervenir en la síntesis *de novo* de GSH (Dickinson and Forman, 2002; Njalsson, 2005).

7. γ -glutamilcisteína y otros intermediarios del metabolismo del GSH.

Existe una amplia variedad de moléculas involucradas en el metabolismo del GSH que surge principalmente de su procesamiento por distintas enzimas. Así, moléculas como γ -glutamil-glutación (γ -glutamil- γ -glutamilcisteinilglicina) existen de manera natural *in vivo* y se forman mediante la transpeptidación de GSH por la GGT. El γ -glutamil-GSH no actúa como sustrato de la GSR o la GST, pero sí de la GCT, dando lugar a GSH y 5-oxoprolina (Abbott et al., 1986). Aunque se desconoce su posible papel en el organismo, se ha especulado que γ -glutamil-GSH tiene más facilidad que el GSH para formar complejos con ciertos metales y cationes, debido a su mayor carga negativa.

Sin embargo, el mayor interés de los intermediarios del GSH recae en el precursor de su síntesis, la γ -glutamilcisteína (γ GC), sintetizada mayoritariamente a partir de glutamato y cisteína por acción de la GCL. La γ GC también puede originarse por el catabolismo de GSH, mediante la actividad de la GCT (Griffith, 1999) y la transpeptidación entre glutación y cistina (Anderson and Meister, 1983). La γ GC, o su disulfuro, parece ser más efectivo como precursor en la biosíntesis de GSH que la administración de glutamato más cisteína o cisteinil-bisglicina, ya que induce un aumento más rápido de GSH porque evita la mediación de la GCL (Anderson and Meister, 1983).

La rápida conversión de γ GC en GSH por la GSS hace que en situaciones normales, la concentración de la misma sea muy baja; esto es, de 0.1 nmol/mg en fibroblastos de humanos (Ristoff et al., 2002) o 5.8 nmol/g proteína en hígado de rata (Sugimoto et al., 1985). Sin embargo, los pacientes deficientes en GSS muestran una concentración de γ GC que asciende hasta 18.1 nmol/mg en plasma (Ristoff et al., 2002). Determinadas especies de bacterias extremadamente halofílicas contienen concentraciones de γ GC muy elevadas (~mM), en ausencia de concentraciones significativas de GSH (Newton and Javor, 1985). Esto puede deberse a la estabilidad y resistencia a la autooxidación de

la γ GC en condiciones halófilas, que es semejante a la del GSH en condiciones no halófilas (Sundquist and Fahey, 1989).

Péptidos y derivados intermediarios del metabolismo de GSH	
- γ GluCys (Sandberg et al., 1994)	- GluGlu (Sano et al., 1966)
- γ GluGlu (Kakimoto et al., 1964; Orwar et al., 1994; Sandberg et al., 1994)	- GluGln (Sano et al., 1966)
- γ GluGln (Kakimoto et al., 1964; Orwar et al., 1994 1994, 48-61)	- GluSer (Sano et al., 1966)
- γ GluSer (Kanazawa et al., 1965)	- GluAla (Sano et al., 1966)
- γ GluAla (Kanazawa et al., 1965)	- GluVal (Sano et al., 1966)
- γ GluVal (Kanazawa et al., 1965)	- GluGly (Sano et al., 1966)
- γ GluGly (Orwar et al., 1994)	- GluIle (Reichelt, 1970)
- γ GluIle (Orwar et al., 1994)	- GluAlaGly (Reichelt, 1970)
- γ GluAlaGly (Orwar et al., 1994)	- S-methylglutathione (Kanazawa et al., 1965)
- γ GluGSH (Abbott et al., 1986)	
- γ -glutamyl-taurina (Orwar et al., 1994; Sandberg et al., 1994)	

Tabla IV. Peptidos y derivados aminoacídicos en el metabolismo del GSH. Los intermediarios formados por transpeptidación, principalmente por acción de la GGT, son susceptibles de ser utilizados para la síntesis *de novo* de GSH.

En cepas de *E. coli* dobles mutantes $\Delta gshB \Delta trxB$ para la GshB y la tiorredoxina reductasa (TrxB), se ha observado un crecimiento normal en medio enriquecido, que se correlaciona con una acumulación de γ GC. Sin embargo, las cepas $\Delta gshA \Delta trxB$, que carecen tanto de γ GC como de GSH, son inviables (Faulkner et al., 2008).

En situaciones de inhibición de la Gsh2 (GSS en mamíferos), existe un incremento de la producción de γ GC en *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriendo la ausencia de inhibición de la GCL por el dipéptido (Grant et al., 1997). Aunque la supresión de la Gsh2 permite un crecimiento bajo de colonias, el GSH debe ser necesario para ciertos procesos vitales (Chaudhuri et al., 1997; Grant et al., 1997), tal y como muestra el rescate del crecimiento normal tras añadir GSH. En estas levaduras, sin embargo, la función mitocondrial y la resistencia al estrés oxidativo se encuentran alteradas (Grant et al., 1997). Por el contrario, en condiciones de inhibición de la Gsh1 (equivalente a la GCL en mamíferos) la suplementación con γ GC rescata el crecimiento celular.

7.1. Utilización celular de γ GC y otros dipéptidos.

Como se ha comentado anteriormente, el transporte de γ -glutamilcistina a la célula se acompaña de la posterior transhidrogenación con GSH a cisteína y γ GC_{red} (Anderson and Meister, 1983). El transporte de γ GC también se ha propuesto, ya que la administración de la misma, de su forma disulfuro o de γ -glutamil-cistina, son capaces de incrementar la biosíntesis de GSH en la célula (Anderson and Meister, 1983; Dringen et al., 1997b).

La entrada y utilización de γ GC por las células se inhibe por altas concentraciones de GSH extracelular. (Anderson and Meister, 1983). En células mesencefálicas, la γ GC proporciona una recuperación del GSH con una eficiencia idéntica a la observada con la administración directa de GSH (Zeevalk et al., 2008). Sin embargo, en neuronas, la utilización de γ GC para la biosíntesis de GSH precisa de su previa hidrólisis en los correspondientes aminoácidos precursores (Dringen et al., 1999), siendo su EC₅₀ de 200 μ M, mientras que para astrocitos es de 3 mM (Dringen and Hirrlinger, 2003; Dringen et al., 1999). Tanto las neuronas como los astrocitos son capaces de utilizar varios dipéptidos para la síntesis de GSH, especialmente CysGly. Tras su importación y posterior escisión intracelular, γ GC puede ser utilizada en el rango de μ M para producir GSH, incluso de manera más eficiente que la administración de γ GC (Dringen et al., 1997b; Dringen et al., 1999).

8. El GSH y otros antioxidantes como estrategia terapéutica.

Debido a que la mitocondria es el principal productor de ROS en la célula, y a su implicación en una gran variedad de enfermedades que cursan con estrés oxidativo, existen diversas estrategias que se han utilizado para incrementar la actividad antioxidante en la mitocondria. De este modo, se han sobre-expresado en el orgánulo enzimas como SOD2 [67], [68] and [69] o la catalasa (Schriner et al., 2005). Otras aproximaciones como la sobreexpresión SOD1 o GPx1 en ratones transgénicos [Thiruchelvam, 2005, 22530] o de GPx1 mediante lentivirus en la sustancia negra

Introducción

(Ridet et al., 2006), han dado resultados positivos en los modelos murinos, sugiriendo la relevancia de la detoxificación de ROS como medio para otorgar neuroprotección. Sin embargo, estas terapias no se han probado en su aplicación directa como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Igualmente se han dirigido antioxidantes como el α -tocoferol, la N-acetilcisteína [Ernster, 1992, 241]. Para dirigir éstos y otros antioxidantes a la mitocondria se han utilizado diversas estrategias; así, los cationes hidrofóbicos, unión a componentes intramitocondriales o conversión a una forma activa mediante enzimas exclusivamente mitocondriales, son estrategias utilizadas para ello (Dikalov, 2011). Así, mediante la conjugación con trifenilfosfonio, se han dirigido a la mitocondria compuestos como el nitróxido MitoTEMPOL, que reduce O_2^- a H_2O_2 , actuando como un mimético de SOD2. MitoCP es otra aproximación que dirige a la mitocondria un grupo carboxiproxilo que reduce el estrés oxidativo inducido por H_2O_2 y peroxidación lipídica [77]. A éstos, se adicionan otros compuestos que, mediante la adición del grupo trifenilfosfonio, se han utilizado para dirigir a la mitocondria tocoferol (MitoE), ácido lipoico (MitoLip), o miméticos de la peroxidasa (MitoPrx) (Bolaños et al., 2009). Entre ellos, la mitoquinona o MitoQ₁₀ (Murphy and Smith, 2007) ha sido ampliamente estudiado. Este compuesto u otras quinonas relacionadas, disminuyen el estrés oxidativo mitocondrial mediante la reducción del grupo ubiquinol de MitoQ por actividad del complejo II mitocondrial. Aunque inicialmente creó elevadas expectativas, la utilización de coenzima Q₁₀ o MitoQ, no ha demostrado ser lo suficientemente eficaz en la mejora de los síntomas parkinsonianos (Smith and Murphy, 2010; Weber and Ernst, 2006). Los tetrapéptidos catiónicos SS (Szeto-Schiller) ricos en arginina, han demostrado ser efectivos en la eliminación de ROS mitocondriales una vez localizados en la membrana mitocondrial interna, favoreciendo la funcionalidad del orgánulo y disminuyendo la muerte celular por estrés oxidativo (Dikalov, 2011).

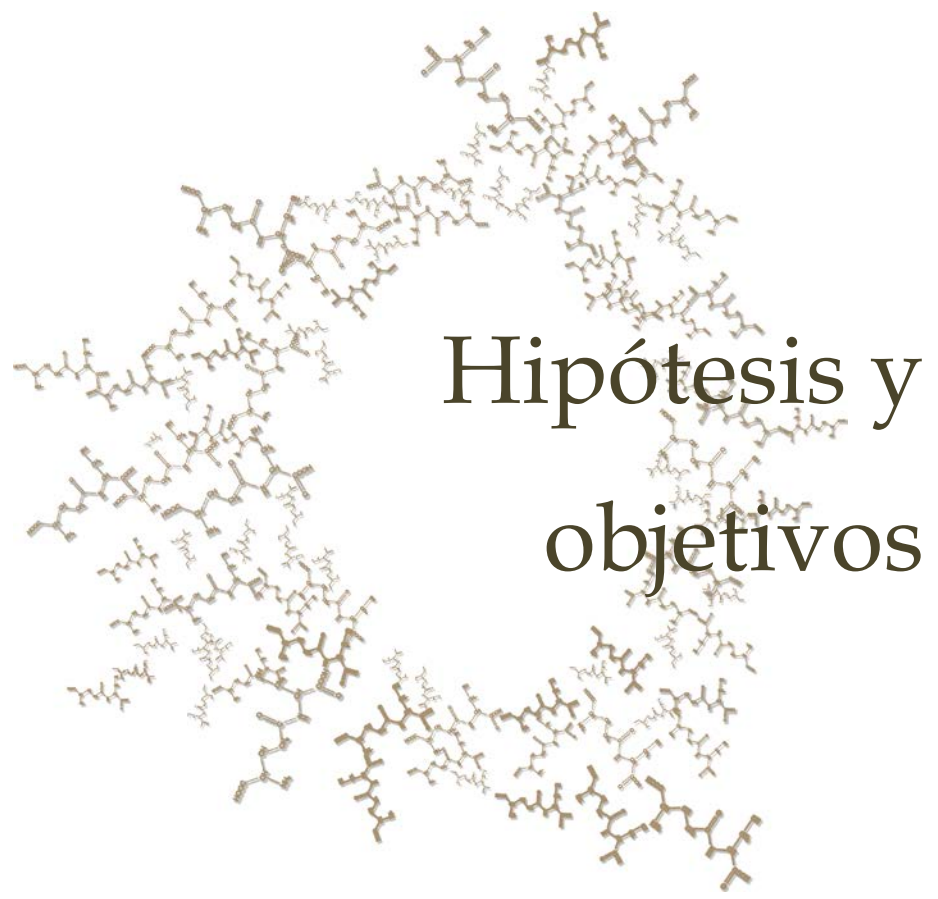
En enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o la disfunción cognitiva leve, la administración de altas dosis de vitamina E y C presenta escasos beneficios en combinación con el tratamiento con levodopa, mientras que la administración de vitamina E por sí sola no supone un avance terapéutico (Petersen et al., 2005; Zeevalk et al., 2008) e incluso puede suponer riesgos (Kamat et al., 2008).

Por su parte, el tratamiento antioxidante con GSH se ha propuesto como estrategia de prevención de enfermedades que cursan con un incremento del estrés oxidativo, tales como las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la administración por vía oral

de GSH no resulta de gran utilidad debido a su hidrólisis por dipeptidasas en el tracto gastrointestinal, la administración por vía intravenosa es igualmente infructuosa, puesto que el GSH tiene una vida media de 2 minutos en la sangre (Njalsson, 2005). Aunque en pacientes parkinsonianos se ha apreciado un ligero beneficio tras la administración de este antioxidante (Sechi et al., 1996), no se ha demostrado el mecanismo bioquímico que media esta protección. A tenor de lo observado en otros estudios, el GSH serviría únicamente como precursor de cisteína, ya que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Dringen and Hirrlinger, 2003; Lomaestro and Malone, 1995). Ciertos derivados sulfhidrilos, como el monoéster o monoetiléster de GSH se pueden importar por la célula y escindir intracelularmente, para contribuir a la síntesis *de novo* de GSH (Anderson et al., 2004b; Martensson and Meister, 1989).

A pesar de la ventaja que supondría administrar precursores de la síntesis de GSH, es posible la aparición de efectos adversos. Así, la cisteína o el propio GSH a altas concentraciones, pueden interaccionar potencialmente con receptores de glutamato y promover excitotoxicidad neuronal (Puka-Sundvall et al., 1995; Regan and Guo, 1999), mientras que la NAC puede causar acidificación [Gillissen, 2006, 159] y toxicidad neuronal (Munoz et al., 2004). Por consiguiente, pese a que la administración de GSH no es efectiva como tal, ciertas formas de liberación o de administración de precursores pueden aumentar las concentraciones de éste tripéptido en tejido y otorgar protección frente al estrés oxidativo. Sin embargo, esta estrategia crea cierta controversia en cuanto a sus limitaciones, atendiendo a que la síntesis *de novo* de GSH se encuentra modulada por la retroinhibición de la GCL por producto. Por tanto, según algunos autores, la administración de precursores únicamente sería útil como una forma de mantener los niveles normales de GSH cuando la cisteína es limitante (Zeevalk et al., 2008).

A la vista de los resultados en los ensayos clínicos, y a pesar de la eficacia de antioxidantes en modelos *in vitro* y en modelos murinos, la falta de acceso y/o selectividad en la diana terapéutica son algunas de las limitaciones de estos tratamientos. Así, en la presente Memoria nos hemos propuesto diseñar y describir un nuevo sistema antioxidante específico mitocondrial, que permita la protección permanente en modelos de neurodegeneración y que sirva, a su vez, como un modelo de estudio del metabolismo de GSH.



Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La mitocondria es el mayor productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, a su vez, la diana principal de sus efectos deletéreos. El mantenimiento de la homeostasis entre la producción de ROS y su eliminación es clave en el control de la señalización celular mediada por cambios redox, así como en la prevención de diversas enfermedades neurodegenerativas.

Debido a su capacidad para eliminar ROS, el glutatión (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina, GSH) es considerado como el principal antioxidante de tipo tiólico celular. Este tripéptido, sintetizado íntegramente en el citosol en dos reacciones dependientes de ATP, resulta esencial para la supervivencia celular. Sin embargo, recientes estudios demuestran que la célula puede prescindir de GSH, siempre y cuando esté asegurada la biosíntesis de su precursor, γ -glutamylcisteína (γ GC). Nosotros proponemos que dada la similitud con GSH por la presencia del grupo tiol reactivo, γ GC podría actuar como antioxidante y adoptar alguna de las funciones de GSH.

Objetivos

En vista de los antecedentes descritos e hipótesis planteada, en el presente trabajo nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Diseñar y obtener una construcción plasmídica que confine la biosíntesis de γ -glutamilcisteína en la mitocondria, un orgánulo incapaz de transformarla en GSH dada la ausencia de GSS.
2. Investigar la posible función de γ -glutamilcisteína en la disminución de ROS en mitocondria y célula intacta.
3. Estudiar si γ -glutamilcisteína modula el estado redox de tioles y la supervivencia neuronal *in vitro* e *in vivo*.



Material y métodos

1. Cultivos celulares.

1.1. Especies ensayadas, condiciones del animalario y control de la edad gestacional.

Los cultivos primarios celulares se obtuvieron de ratas albinas de la raza Wistar, criadas y suministradas por el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. Los animales se criaron en jaulas y se mantuvo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con la fase de oscuridad entre las 20:00 y las 8:00 horas del día siguiente. A los animales se les administró agua y dieta sólida estándar *ad libitum* (17% proteínas, 3% lípidos, 58.7% glúcidos, 4.3% celulosa, 5% minerales y 12% de agua). Las condiciones ambientales del animalario se mantuvieron con una humedad relativa entre el 45 y el 65% y una temperatura entre 20 y 25° C.

El periodo gestacional, establecido en 21.7 días para la rata, se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de las ratas vírgenes con los machos. A la mañana siguiente se separaron aquellas ratas que presentaban espermatozoides en el frotis vaginal, acompañados de células epiteliales de la vagina características del día fértil del estro.

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J (Jackson Laboratories, Mayne, EE.UU.) de edad comprendida entre las 10 y 16 semanas. Estos ratones se mantuvieron en las mismas condiciones de luz/oscuridad y acceso a agua y dieta sólida que las ratas. La dieta administrada se compuso de 18% proteínas, 5,7% lípidos, 44,2% glúcidos, 3,5% celulosa, 5% minerales y 12% de agua.

1.2. Cultivo primario de neuronas.

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon a partir de fetos de ratas Wistar de 16 días de gestación (E16) (Almeida et al., 1998). Las ratas gestantes, previamente anestesiadas, se sacrificaron mediante dislocación cervical. Mediante histerectomía se extrajeron los fetos y se trasladaron a una cabina de flujo laminar (Telstar BV 30/70) a fin de garantizar las condiciones de esterilidad del cultivo. Con la

Material y métodos

ayuda de tijeras, pinzas y papel estéril impregnado en etanol al 70%, se extrajeron los dos hemisferios cerebrales. Utilizando un bisturí, se disgregó el tejido tras depositarlo en una placa de poliestireno de 20 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) que contenía una solución de disgregación (EBSS: NaCl 116 mM, KCl 5,40 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,50 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/L, suplementada con albúmina 0,3% p/v y DNAsa tipo I 20 µg/mL, pH 7.2). Transcurridos 4 minutos de sedimentación en un tubo de 50 mL (BD Falcon, Bedford, MA, EEUU), el pellet se resuspendió suavemente en la solución de tripsinización (solución de disgregación suplementada con tripsina 0,025% p/v). La digestión enzimática del tejido se realizó a 37°C durante 15 minutos, agitando suavemente cada 3 ó 4 minutos para facilitar el proceso. Transcurrido ese tiempo, la tripsinización se detuvo mediante la adición de suero fetal de ternera (FCS; Linus, Madrid, España) a una concentración final del 10% (v/v), y el tejido se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos (Eppendorf 5702R, Hamburgo, Alemania).

El sedimento resultante se resuspendió en 12 mL de la solución de disgregación, haciéndolo pasar 9 veces a través de una pipeta pasteur siliconada para facilitar la disgregación. Tras dejar reposar la suspensión celular durante 4 minutos, se recogió en un tubo de 50 mL el sobrenadante, que contenía las células disociadas. Este proceso se repitió para incrementar el rendimiento, combinándose finalmente los sobrenadantes, que se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos.

El sedimento se resuspendió cuidadosamente en 1 mL, y posteriormente en un volumen final de 20 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Invitrogen, Paisley, Reino Unido) suplementado con FCS, a una concentración final del 10% (v/v). De esta suspensión, se recogió una alícuota de 10 µL para el recuento celular, añadiéndole 70 µL de azul de tripano (Sigma) al 0,2% (v/v) y utilizando para el recuento una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases (Wilovert II pH, Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Alemania).

Las células se sembraron a una densidad de 2,5·10⁵ células/cm² o a 2,0·10⁵ células/cm² (para ensayos de inmunocitoquímica), en medio de cultivo completo en placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca), previamente recubiertas con poli-D-Lisina a 15 µg/mL (Sigma). Las placas se mantuvieron en un incubador (Thermo

Forma 311, Ohio, EEUU) termostatzado a 37°C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO₂.

Transcurridos 2 días de cultivo, el medio se cambió por DMEM suplementado con suero de caballo (Sigma) al 5% (v/v) y glucosa (Sigma) 20 mM. Al tercer día de cultivo, se añadió arabinósido de citosina (Sigma) 10 µM para impedir la proliferación de células no neuronales. Las células se utilizaron a los 6-7 días de cultivo. Bajo estas condiciones, los cultivos de neuronas mostraron una pureza aproximada del 97-99%, determinada mediante inmunorreacción con el marcador neuronal Map-2 (Almeida et al., 2005).

Todos los medios de cultivo se suplementaron con penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y anfotericina B (0.25 µg/mL) (Sigma-Aldrich), excepto en las transfecciones con Lipofectamina.

1.3. Líneas celulares y células inmortalizadas.

1.3.1. HEK293T

La línea celular procedente de riñón embrionario humano 293T (HEK293T), se mantuvo en crecimiento en DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v). Las células se sembraron en placas de poliestireno recubiertas con poli-D-lisina, a una densidad de 5x10⁴ células/cm² para experimentos de inmunocitoquímica o de transfección con siRNA o plásmidos de expresión de shRNA, y a una densidad de 10⁵ células/cm² para experimentos de sobreexpresión de plásmidos.

2. Diseño y construcción de vectores de expresión - RNA de interferencia.

Todas las amplificaciones de plásmidos se realizaron en células competentes de *E. coli* (cepa DH-5α) preparadas en nuestro laboratorio a partir de un *stock* donado por el Instituto de Microbiología-Bioquímica de Salamanca (IMB). Los medios de cultivo de bacterias (LB, LB-agar y 2xYT) se prepararon con bactotriptona (digerido pancreático

Material y métodos

de caseína), extracto de autolisado de levadura y agar granulado (DIFCO Laboratories, Michigan, EE.UU.), tal y como se indica:

	Bactotripton (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	NaCl (g/L)	Agar (g/L)
LB	10	5	10	-
LB-agar	10	5	10	20
2xYT	16	10	10	-

Los plásmidos se aislaron y purificaron de geles de agarosa (Sigma), empleando un kit comercial de extracción (GenElute, Sigma). La extracción y purificación de los plásmidos, tras amplificación en bacterias se llevó a cabo utilizando el sistema Wizard Plus Midipreps, de Promega (Madison, Wisconsin, EEUU).

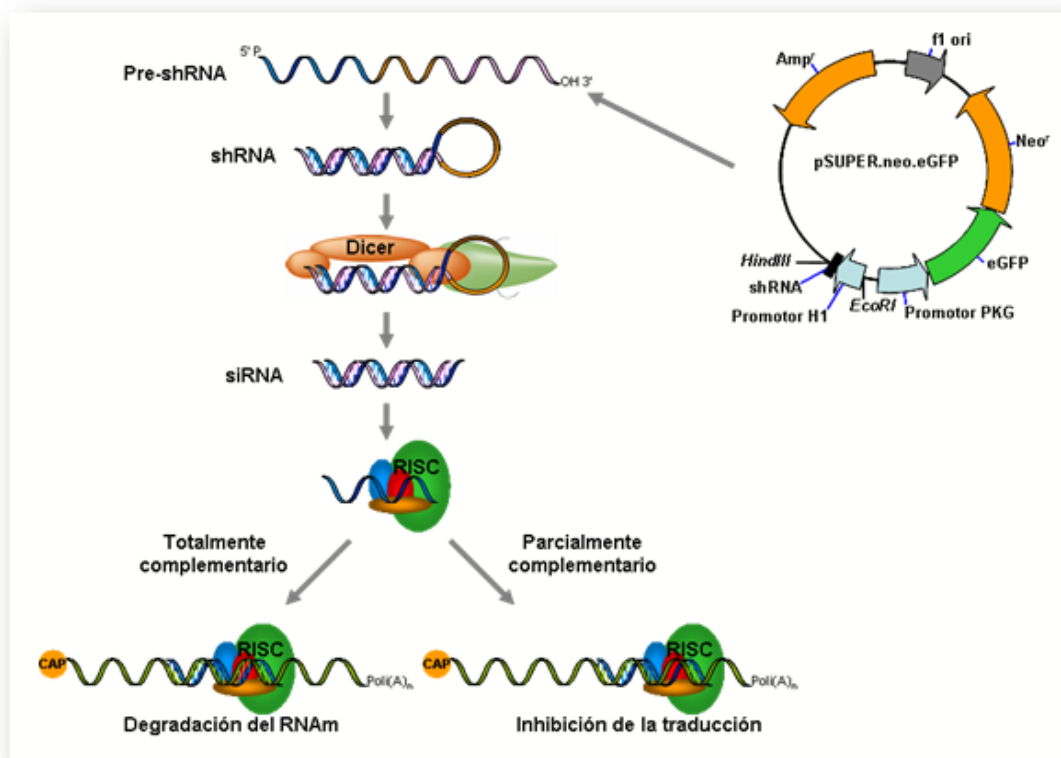
2.1. Silenciamiento de GCL_H mediante “small hairpin” RNA (shRNA)

Con objeto de silenciar la subunidad catalítica de la GCL (GCL) utilizamos el vector pSuper-neo/gfp (Oligoengine, Seattle, WA, EEUU). Este sistema permite la identificación y el seguimiento de las células transfectadas, dado que co-expresa el shRNA y el mRNA de la proteína verde fluorescente (GFP). El diseño de la secuencia específica de shRNA por GCL (shGCL) se realizó como hemos descrito anteriormente (Diaz-Hernandez et al., 2005), atendiendo a los criterios de diseño racional propuestos por Reynolds y Ui-Tei (Reynolds et al., 2004; Ui-Tei et al., 2004), recogidos en la **Tabla I**.

Criterios de diseño racional de siRNA	
Criterios de Reynolds et al.	Criterios de Ui-Tei et al.
1. Contenido en GC 30-52 %	1. A/U en la posición 19 de la cadena antisentido
2. Al menos 3 A/U en posición 15-19 de la cadena sentido	2. G/C en la posición 19 de la cadena sentido
3. Ausencia de repeticiones internas	3. Riqueza en AU en el extremo 5' de la cadena antisentido
4. A en posición 19 de la cadena sentido	4. Ausencia de secuencias GC de más de 9 pares de bases
5. A en posición 3 de la cadena sentido	
6. U en posición 10 de la cadena sentido	
7. Ninguna G/C en posición 19 de la cadena sentido	
8. Ninguna G en posición 3 de la cadena sentido	

Tabla I. Criterios para el diseño racional de siRNA. El diseño de las secuencias de shRNA o siRNA para el silenciamiento de proteínas, se realizó siguiendo los criterios de Reynolds et al (Reynolds et al., 2004) y Ui-Tei et al (Ui-Tei et al., 2004).

Una vez seleccionada la secuencia de reconocimiento del shRNA (5'-GAAGGAGGCTACTTCTATA-3') se diseñaron unos oligonucleótidos de 64 bp (Isogen, Barcelona, España) que incluyen la secuencia por duplicado, separadas por un grupo de oligonucleótidos desapareados (hairpin, TTCAAGAGA). Al ser expresados en la célula, generan una estructura en horquilla (shRNA) con las secuencias sentido y antisentido de la región seleccionada (**Esquema I**). Tras la escisión de la horquilla por la enzima Dicer, se forman RNA de interferencia (RNAi) funcionales, que se unen al correspondiente del RNA mensajero (RNAm) y conducen a su degradación por el complejo RISC. Si la especificidad de la secuencia de RNAi no es completa -presenta alguna base desapareada-, se previene la traducción mediante fragmentos del mensajero de doble cadena, capaces de paralizar la acción de los ribosomas y la síntesis de la proteína, sin degradar el RNAm.



Esquema I. Esquema del vector pSuper-neo/gfp y mecanismo de acción de los shRNA y siRNA. La expresión del vector pSUPER origina un pre-shRNA que, tras adquirir estructura en horquilla, es reconocido por la enzima Dicer, generando siRNA maduros. Éstos también pueden ser importados en la célula directamente por transfección. Tras la unión del siRNA al mRNA, el complejo RISC conduce al silenciamiento de la proteína.

Como control negativo, se utilizó una secuencia contra el cDNA de la luciferasa de luciérnaga (5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'), no presente en el genoma de células de mamífero (Ohtsuka et al., 2004).

La especificidad de la secuencia contra la GCL se comprobó mediante comparación (BLAST. National Institutes of Health, NIH) frente al genoma completo de rata y humano. Mediante transferencia de western, corroborando el correcto silenciamiento de la proteína.

2.2. "Small interfering RNA" (siRNA)

Con el fin de reducir los niveles de expresión de las proteínas que aparecen en la **Figura I**, se utilizaron secuencias de siRNA diseñadas según los criterios de Reynolds (Reynolds et al., 2004) y Ui-Tei (Ui-Tei et al., 2004). El diseño fue asistido por el software de siRNA de Dharmacon (Dharmacon. Thermo Fischer Scientific), de donde se adquirieron los oligonucleótidos (**Tabla II**).

Secuencias de siRNA			
Proteína	Número de acceso	Secuencia	Posición
GSS	NM_000178 (humano) NM_012962 (rata)	5'- AGGAAATTGCTGTGGTTA -3' (Neuronas)	856-874
		5'- AGAGAAGGAAAGAAACATA -3' (HEK 293T)	713-731
		5'-TGAAACAGATCGAAATCAA-3'	499-517
GSR	NM_000637 (humano) NM_053906 (rata)	5'- GGACCTGAGTTAAACAAA -3' (Neuronas)	1154-1172
		5'- AGACGAATCCAGAATACC -3' (HEK 293T)	1211-1229
		5'-GCACGGAGGAGCTGGAGAA-3'	967-983
GPx1	NM_00581 (humano) NM_030826.3 (rata)	5'- CGCCAAGAACGAAGAGATT -3' (Neuronas y HEK 293T)	338-356
		5'-GGTTCGAGCCCAACTTCATGCTCTT-3' (*)	391-415
SOD2 (MnSOD)	NM_000636 (humano) NM_017051 (rata)	5'- GGGAGTTGCTGGAAGCCAT -3' (Neuronas y HEK 293T)	381-399
Luciferasa		5'-CTGACGCGGAATACTTCGATT-3'	

Tabla II. Secuencias de siRNA. Mediante diseño racional, se obtuvieron las secuencias de los siRNA indicados, contemplando el reconocimiento tanto en humano y rata. En negrita aparecen los siRNA seleccionados para cada especie, tras comprobar la efectividad en el silenciamiento proteico. (*) Secuencia publicada por Zhang et al. (Zhang et al., 2005).

La especificidad de las secuencias seleccionadas también se confirmó mediante BLAST frente al genoma completo de rata y humano. Como control negativo se empleó el siRNA dirigido contra la luciferasa (Ohtsuka et al., 2004).

Los siRNAs se utilizaron a una concentración final de 100 nM, y las células se transfectaron 3 días antes del experimento. Estas condiciones fueron seleccionadas en base a su eficacia y especificidad. Para ello, se realizaron ensayos previos en los que se utilizaron concentraciones de siRNA entre 30 y 100 nM. Las eficiencias de transfección de los siRNAs se estima alrededor del 90-100%, a juzgar por el grado de eficacia mostrado tras los análisis por transferencia tipo western.

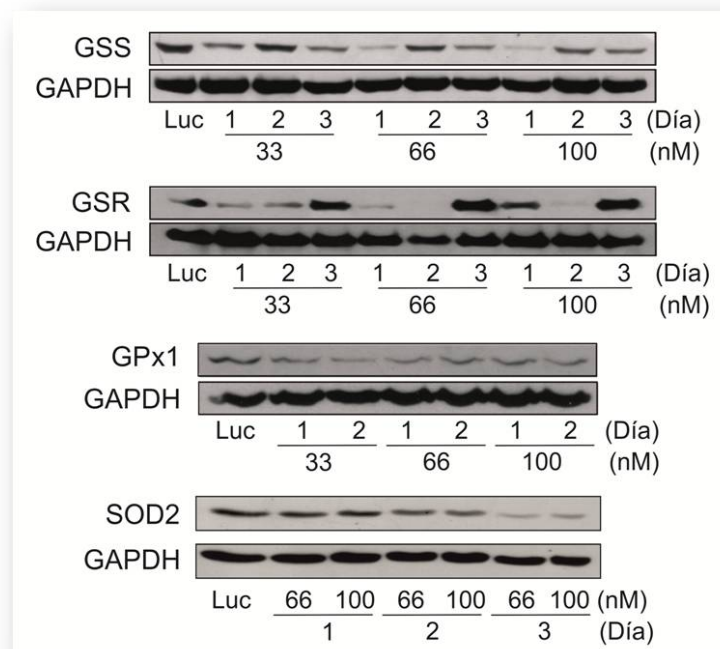


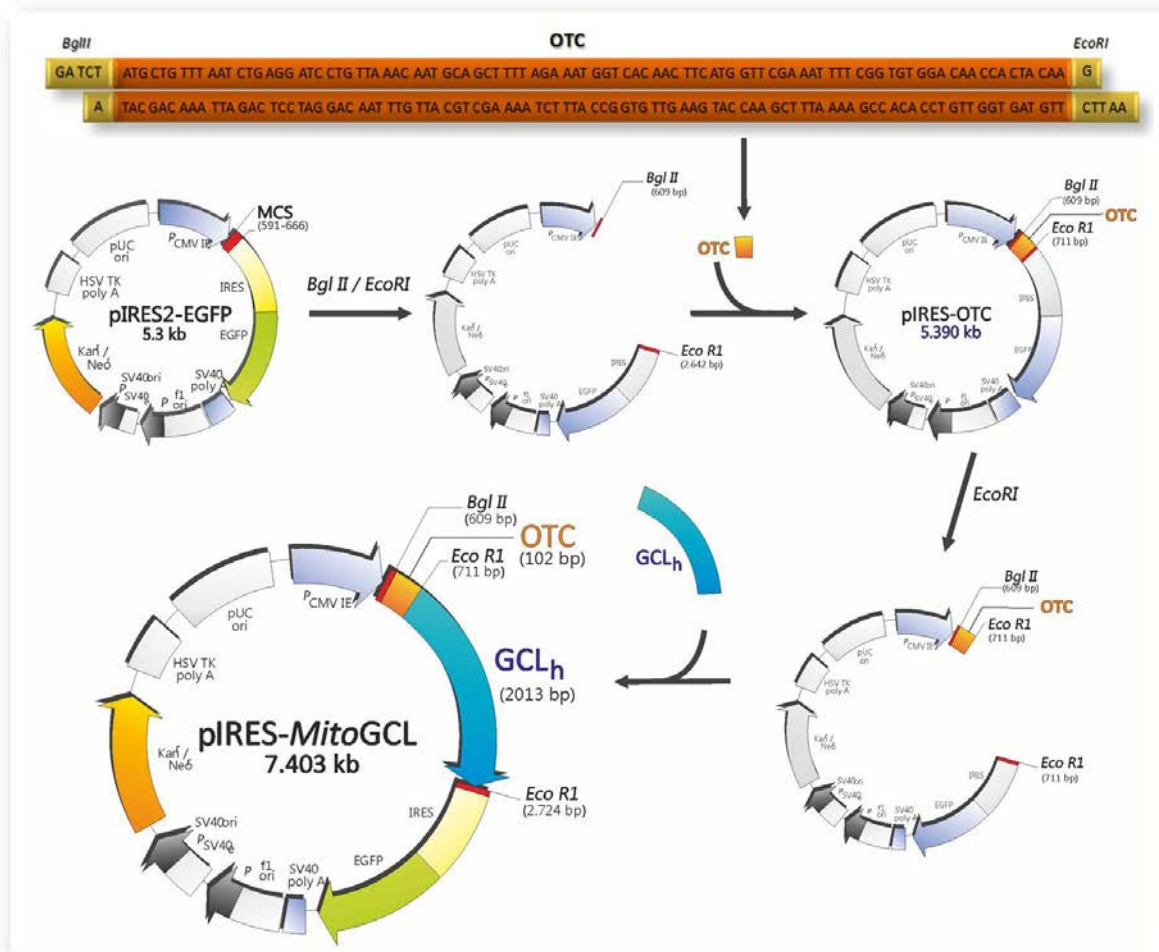
Figura I. Selección de siRNA. Los siRNAs seleccionados mediante diseño racional, se probaron en células HEK293T (figura) y en neuronas. La selección del siRNA se basó en la mayor efectividad dosis-respuesta para el silenciamiento de glutatión sintetasa (GSS), glutatión reductasa (GSR), glutatión peroxidasa1 (GPx1) o superóxido dismutasa 2 (SOD2). En la figura aparece el análisis realizado después de 3 días de transfección con los siRNA, excepto donde se indica lo contrario. Se indican los tipos de siRNA probados (hasta 3 por proteína) y el porcentaje utilizado (hasta un máximo de 100 nM).

2.3. Sobreexpresión de GCL

Los cDNA codificantes para la subunidad catalítica (GCL_H , 2023 bp, número de acceso: NM_012815) y ligera (GCL_L , 905 bp, número de acceso NM_017305) de la GCL, se obtuvieron mediante transcripción reversa (RT-PCR) a partir de RNA total de

Material y métodos

rata, tal y como hemos descrito previamente (Diaz-Hernandez et al., 2005). Los cDNAs resultantes se insertaron los sitios *Bam*HI y *Eco*RI, respectivamente, del vector de expresión pIRES2.eGFP, dando lugar a los vectores pIRES-GCL_L y pIRES-GCL).



Esquema II. Construcción de MitoGCL. A la secuencia codificante para el epítipo de señalización mitocondrial de la ornitina transcarbamilasa (OTC) se le añadieron extremos de reconocimiento de las enzimas *Bgl*II y *Eco*RI para su inserción en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector pIRES2.eGFP. La inserción de la secuencia OTC se realizó en el extremo N-terminal de la GCL, manteniendo la pauta de lectura con la secuencia de la proteína.

Con objeto de dirigir la GCL_H (en adelante, GCL) hacia la mitocondria, se fusionó, en su extremo N-terminal, con un fragmento del cDNA que codifica la secuencia de localización mitocondrial (32 aminoácidos) de la ornitina transcarbamilasa (OTC). Así, se diseñaron y adquirieron (Thermo Fischer Scientific, Londres, RU) los oligonucleótidos correspondientes, mostrados a continuación y donde quedan subrayados los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Eco*RI y *Bgl*II, respectivamente (**Esquema II**).

Oligo sentido:

5' GATCTATGCTGTTTAATCTGAGGATCCTGTAAACAATGCAGCTTTTAGAAATGGTCACAA
CTTCATGGTTCGAAATTTTCGGTGTGGACAACCACTACAAG-3'

Oligo antisentido:

5' AATTCTTGTAGTGGTTGTCCACACCGAAAATTTTGAACCATGAAGTTGTGACCATTTCTAA
AAGCTGCATTGTTTAACAGGATCCTCAGATTAACAGCATA-3'

En el diseño de los oligonucleótidos se tuvo en cuenta la conservación de la fase de lectura con respecto a la GCL; además, se incluyeron sitios de restricción para las enzimas *BglII* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. La adición de estos extremos facilitó la inserción en el vector pIRES2.eGFP, en los correspondientes sitios únicos, originado el vector pIRES-OTC. Tras la escisión con *EcoRI* (Promega) de la secuencia de la GCL incluida en el plásmido pIRES-GCL, y posterior inserción con una ligasa T4 (Promega) en el vector pIRES-OTC, se consiguió fusionar el cDNA de la GCL a la secuencia OTC. La correcta construcción del plásmido resultante, al que denominamos pIRES-MitoGCL se confirmó mediante análisis de restricción (**Figura I**) y posterior secuenciación (Servicio de secuenciación genómica de la Universidad de Salamanca) y comparación con bases de datos (BLAST).

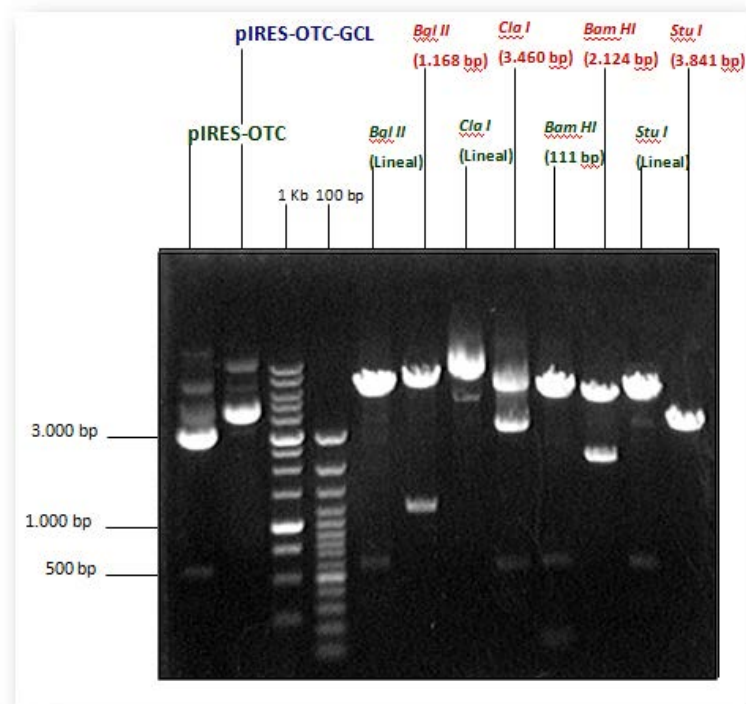


Figura I. Análisis de restricción de pIRES-MitoGCL. La correcta construcción del plásmido se corroboró mediante análisis de restricción y posterior secuenciación.

Material y métodos

El vector pIRES codifica un cDNA bicistónico, de manera que junto a la proteína de interés se expresa concomitante la proteína verde fluorescente (GFP). Esto permite la correcta identificación de las células transfectadas por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo. Sin embargo, en experimentos de co-transfección con otros plásmidos que expresaban GFP, se utilizó el plásmido pcDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.), ya que no codifica para proteínas fluorescentes. Para insertar en este vector las secuencias de cDNA contenidas en pIRES2.eGFP, se escindieron con *NheI* / *SmaI* e insertaron en el vector pcDNA3.1+, previamente escindido con las enzimas *NheI* / *EcoRV*.

2.4. Mutagénesis dirigida.

Con objeto de profundizar en el mecanismo de acción de *mitoGCL*, se crearon dos versiones de *mitoGCL*: inactiva y refractaria al shGCL. Para ello, la forma *mitoGCL*(mut), refractaria al shGCL, se obtuvo mediante mutaciones silenciosas en la región reconocida por el shRNA. Así, se mutó la tercera base de cada codón, respetando la traducción de la proteína. Para introducir las mutaciones, se utilizó el sistema QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, se realizó por PCR utilizando los oligonucleótidos que contenían la secuencia modificada (**Tabla III**) y el vector pIRES-*MitoGCL* como molde. El producto resultante de la PCR se digirió con *DpnI*, que reconoce exclusivamente DNA metilado (producido únicamente por las bacterias).

La versión catalíticamente inactiva de *mitoGCL* (*mitoGCL*(E103A)), se obtuvo mediante la mutación de ácido glutámico a alanina en el residuo 103 de la secuencia codificante de la GCL, tal y como se ha descrito anteriormente (Backos et al., 2010), utilizando los pares de oligonucleótidos reflejados en la **Tabla III**.

La eficacia de las mutaciones se confirmó mediante secuenciación (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca) y comparación con la secuencia original de *mitoGCL*.

Mutagénesis dirigida	
<p>MitoGCLmut</p> <p>Oligo sentido: 5'- CATGAGGAAACGCCGGAAGAAGCCACGTCAGTTT TAGGAGAACATCAG - 3'</p> <p>Oligo antisentido: 5'- CTGATGTTCTCCTAAACTGACGTTGGCTTCTTTCCGGCGTTTCCTCATG - 3'</p>	<p>Condiciones PCR</p> <p>1' a 95 °C</p> <p>50s a 95°C</p> <p>50s a 60 °C</p> <p>8' a 68°C</p> <p>10' a 68 °C</p> <p style="text-align: right;">x 18 veces</p>
<p>MitoGCL(E103A)</p> <p>Oligo sentido: 5'- CAGAGTATGGGAGTTACATGATTGCAGGGACACCTGGCCAGCCGTACGGA - 3'</p> <p>Oligo antisentido: 5'- TCCGTACGGCTGGCCAGGTGTCCTTGCAATCATGTAACCTCCATACTCTG - 3'</p>	

Tabla III. Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis de *mitoGCL*. En la parte superior se muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida para crear la forma *mitoGCL*(mut), refractaria al shRNA contra la GCL. Las mutaciones silenciosas se encuentran subrayadas. En la parte inferior de la tabla se detalla la secuencia para mutar el residuo 103 de la GCL (subrayado).

3. Transfección transitoria de células de mamífero.

Las transfecciones transitorias se realizaron mediante distintos métodos, atendiendo a la naturaleza de las células a tratar. En el caso de siRNA, se realizaron mediante la utilización del reactivo catiónico Lipofectamina 2000 (Invitrogen. Madrid. España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la transfección de plásmidos, sólo se empleó este reactivo en cultivos primarios de neuronas, debido a su dificultad para ser transfectadas con otras técnicas. Las transfecciones neuronales con siRNA se realizaron en el día 3 en cultivo, y las plasmídicas en el día 4, aunque los experimentos se realizaron en el día 6. A estos efectos, los plásmidos se utilizaron a una concentración de 1.6 µg/mL. Transcurridas 4-6 horas de la transfección, se retiró el medio y las células se incubaron en medio de cultivo (DMEM + 10% FCS).

Para la transfección de plásmidos en HEK293T se utilizó la polietilenimina (PEI. Sigma) con variaciones sobre un protocolo descrito anteriormente (Boussif et al., 1995). Así, tras la incubación del PEI con el DNA plasmídico durante 10 min a temperatura

Material y métodos

ambiente, se añadió la mezcla a las células, que se incubaron en medio OptiMEM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) durante 1h. Tras lavar con PBS, las células se incubaron en DMEM con FCS al 10% (v/v).

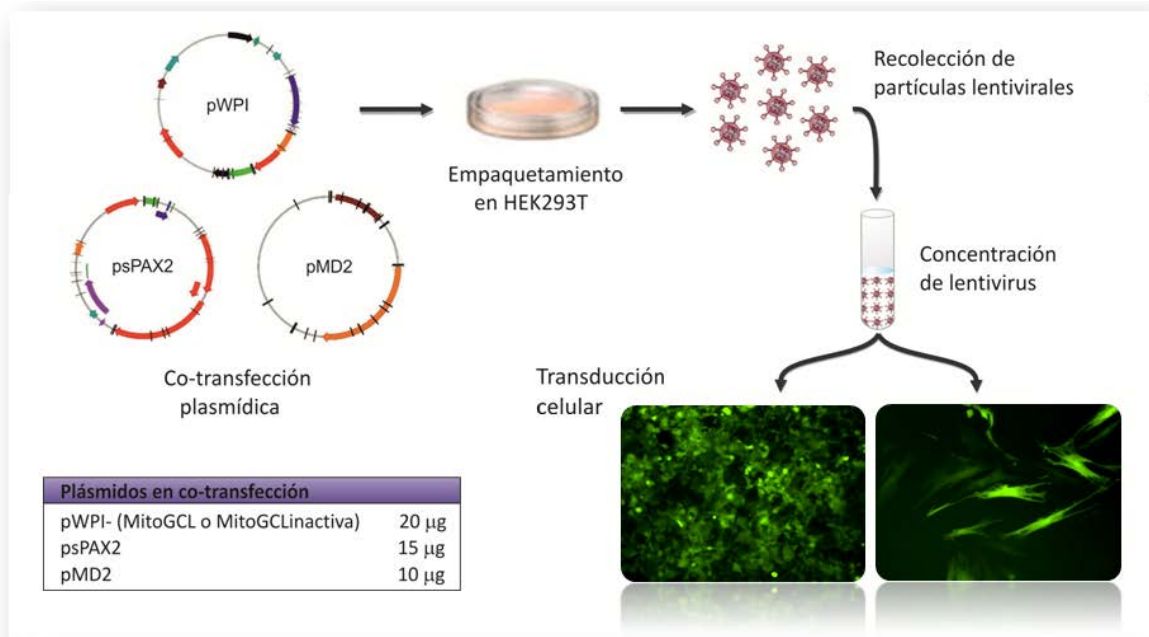
La eficiencia de transfección se calculó mediante la cuantificación de las células fluorescentes mediante microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Esta eficiencia resultó ser de aproximadamente un 9-12% en neuronas y 80-95% en HEK293T. La correcta traducción de los plásmidos en sus correspondientes proteínas se comprobó mediante transferencia de tipo Western. Esta técnica también se empleó para determinar la eficacia de los silenciamientos realizados con los distintos siRNA o construcciones de pSuper-neo/gfp.

4. Producción de partículas lentivirales.

Tras escindir con *Eco47III* / *SmaI* las secuencias codificante para *mitoGCL* y *mitoGCL(E103A)* del vector pIRESeGFP, éstas se subclonaron en el sitio *PmeI* del vector de expresión pWPI.

Para la producción de lentivirus recombinantes (Belzile et al., 2007) (**Esquema III**), se sembraron células HEK293T a una densidad de 10^5 cells/cm² en placas de 60 cm², 24 h antes de la transfección con PEI. Esta operación se realizó con una mezcla de 20 µg pWPI (vector de expresión del cDNA de la proteína de interés), 10 µg de pMD2 (plásmido de empaquetamiento viral) y 15 µg de pPAX2 (plásmido de cápside viral). Estos plásmidos se utilizaron con el consentimiento de Didier Trono, autor de los mismos.

Transcurridas 72 h desde la transfección, se recogió el medio de incubación de las células en una cabina de seguridad biológica de clase II (ESCO Infinity FC2 Class II BSC, Wiltshire, Reino Unido). Con objeto de eliminar posibles restos celulares, se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y posteriormente se hicieron pasar los sobrenadantes a través de un filtro de 0.45 µm (Millex-HV PDVF, Millipore). Los virus fueron concentrados mediante la ultracentrifugación de la suspensión a 20.000 x g durante 2 h a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en PBS y se conservó a -80°C hasta su utilización.



Esquema III. Producción de partículas lentivirales. Para la producción de partículas lentivirales, se co-transfectaron en células HEK293T, los plásmidos pWPI, psPAX2 y pMD2. El medio de cultivo, en el que se encontraron las partículas lentivirales, se recolectó y, tras filtrarlo se concentró por centrifugación. El concentrado de lentivirus así obtenido se utilizó para la transducción de células 3T3, a fin de determinar su concentración.

La determinación de los títulos virales se realizó mediante la incubación de células 3T3 con concentraciones crecientes de las suspensiones de lentivirus durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se añadió la mitad de medio fresco a las células y se mantuvieron durante otras 48 h en presencia de DMEM con FCS al 10% (v/v). Posteriormente, la concentración de partículas lentivirales se cuantificó mediante citometría de flujo, analizando la GFP. La cuantificación se expresó como unidades de transfección por unidades formadoras de colonia (TU) / µL.

5. Tratamiento de las células.

5.1. Estimulación de la producción de ROS.

La producción de ROS por la mitocondria en célula entera se indujo mediante el tratamiento con inhibidores de la cadena transportadora mitocondrial. Así, en células HEK 293T, la producción de ROS se estimuló mediante la incubación con rotenona (1

Material y métodos

μM) durante 4 h o ácido 3-nitropropiónico (3NP) (10 mM) durante 2 h, en DMEM sin FCS. Los tratamientos agudos con rotenona o antimicina se realizaron a una concentración final de 10 μM durante los tiempos indicados (15-45 min) según se indica en resultados. En neuronas, transcurridas 4-6 horas desde la transfección, se incubaron en presencia de ácido 3NP (2 mM) en DMEM durante 24 h.

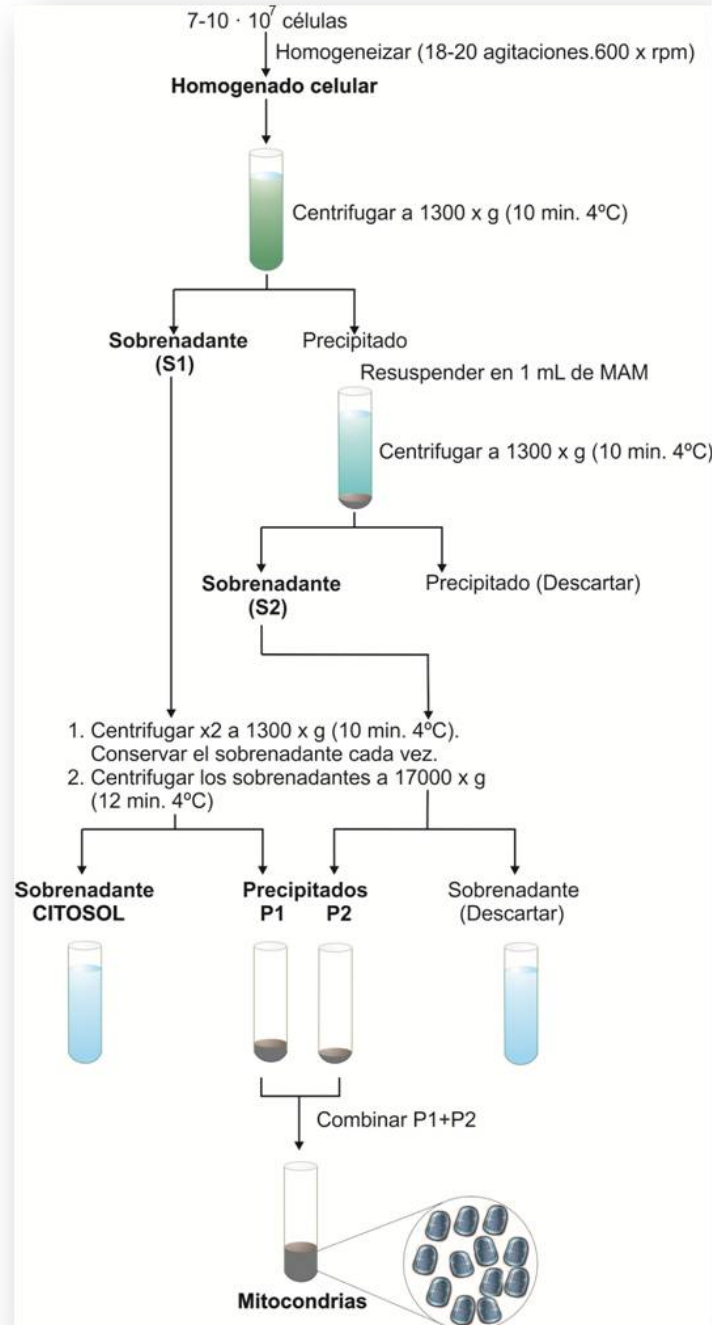
Para estimular los receptores glutamatérgicos, las neuronas se incubaron durante 5 min con glutamato sódico, a una concentración de 100 μM (Sigma) en presencia de glicina 10 μM (Sigma) en tampón Hank's (KCl 5.26 mM, KH_2PO_4 0.43 mM, NaCl 134.2 mM, Na_2HPO_4 0.30 mM, NaHCO_3 4.09mM, D-glucosa 5.5 mM, HEPES 20 mM; pH 7.4). Las células control fueron tratadas de la misma manera, a excepción de la inclusión de glutamato. Transcurridos 5 min de incubación a 37°C, se retiró el medio de incubación Hank's y, tras lavar con PBS, se añadió DMEM. Las células se mantuvieron en estufa y se utilizaron al cabo de 24 h post-estimulación (Almeida and Bolaños, 2001). Para los tratamientos agudos, se utilizó una concentración de glutamato de 40 μM y el efecto se registró a tiempo real, durante un máximo de 15 min.

Para bloquear el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), las neuronas se pre-incubaron con el antagonista específico MK801 (10 μM . Sigma), 5 min antes de la adición de glutamato.

6. Fraccionamiento subcelular

Con objeto de aislar las fracciones mitocondrial y citosólica de las células transfectadas, se utilizó un protocolo de fraccionamiento diferencial (Almeida et al., 1998), que se resume en el **esquema IV**. Para ello, se utilizaron $7-10 \cdot 10^7$ de células HEK293T, previamente sembradas en placas de 145 cm^2 (Nunc. Thermo Fisher Scientific. Roskilde, Denmark). Una vez alcanzada la confluencia, y tras lavar con PBS a 4°C, las células se desprendieron de la placa mediante raspado en medio de aislamiento mitocondrial (MAM), consistente en una disolución de sacarosa 320 mM, EDTA diK^+ 1 mM potassium, Tris-HCl 10 mM y un cocktail de inhibidores de

proteasas (AEBSF 2 mM, Aprotinin 0.3 μ M, Bestatin 130 μ M, EDTA 1 mM, E-64 14 μ M, Leupeptin 1 μ M, Sigma), ajustada a pH 7.4.



Esquema IV. Fraccionamiento subcelular. La obtención de las fracciones mitocondrial y citosólica de células HEK293T se realizó por un procedimiento de centrifugación diferencial. Para ello, se homogeneizaron las células en un pistilo tipo Dounce, obteniendo un homogenado celular. Tras centrifugarlo a 1,300 x g (10 min a 4°C), se conservaron el sobrenadante (S1) y el sobrenadante que resultó de la resuspensión del pellet (S2). Después de 2 centrifugaciones de ambos sobrenadantes a la misma velocidad, el precipitado mitocondrial (P1+P2) se obtuvo al centrifugar S1 y S2 a 17,000 x g (12 min a 4°C).

Tras centrifugar a 600 x g durante 5 min a 4°C, el precipitado celular se resuspendió en 1 mL de MAM y se sometió a un proceso de homogeneización con un pistilo de teflón, con objeto de lisar la membrana plasmática manteniendo intactas las mitocondrias. Tras 18-20 agitaciones a 600 rpm, se retiró una alícuota del homogenado celular (H), y el resto se centrifugó a 1300 x g durante 10 min a 4°C, conservando el sobrenadante (S1), que contiene la fracción mitocondrial.

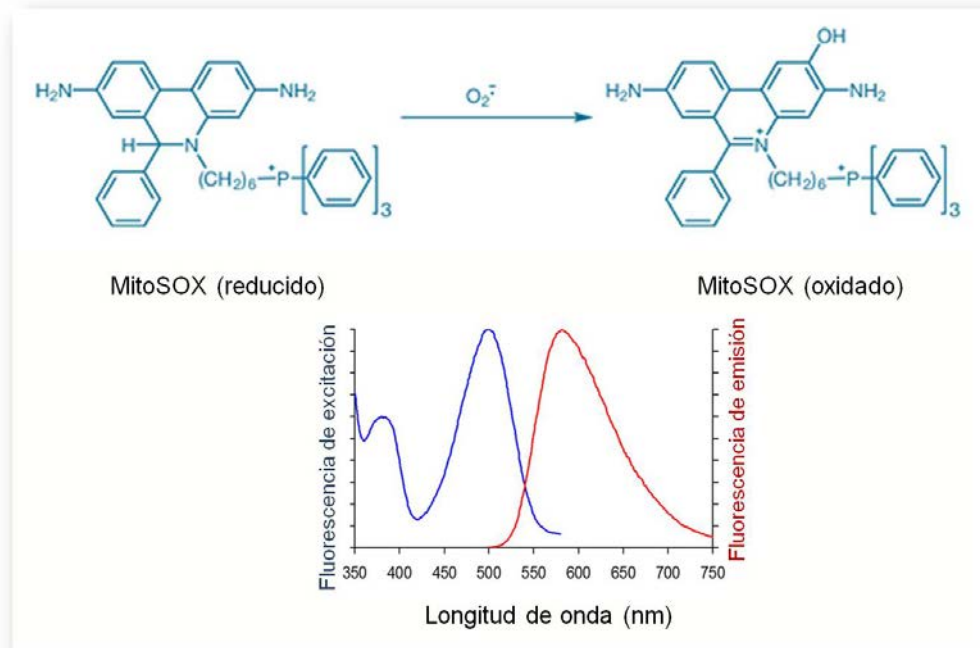
El precipitado se resuspendió en 1 mL de MAM, que se centrifugó a 1300 x g durante 10 min a 4°C, conservando el nuevo sobrenadante (S2). Este protocolo se repitió hasta dos veces más con cada fracción (S1 y S2, hasta observar la desaparición de cualquier precipitado. En ese momento, S1 y S2 se sometieron a una nueva centrifugación, a 17,000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante de S1 se conservó, constituyendo la fracción citosólica. Los precipitados de ambos tubos (S1+S2), que representan la fracción mitocondrial, se combinaron y resuspendieron en MAM (para análisis de ROS o ensayos enzimáticos en mitocondrias aisladas), o en tampón RIPA (para análisis de expresión proteica). La pureza de las fracciones mitocondrial y citosólica se comprobó mediante análisis de la actividad citrato sintasa y lactato deshidrogenasa, exclusivas de mitocondria y citosol, respectivamente. El grado de pureza de cada fracción fue de un 95-98%.

7. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

7.1. Determinación de anión superóxido.

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se determinó utilizando la sonda MitoSOX[®] (Molecular Probes. Invitrogen. Oregón, EE.UU.), que consiste en un derivado catiónico del dihidroetidio unido a un radical trifenilfosfonio. Éste le confiere una carga positiva que lo dirige a la mitocondria, donde puede ser oxidado por $O_2^{\cdot-}$ y formar 2-hidroxi-5-(trifenilfosfonio)hexiletidio (**Esquema V**). Así, la emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} \sim 510$

nm; $\lambda_{em} \sim 590$ nm) permite detectar de manera específica los niveles de $O_2^{\cdot -}$ en el orgánulo.



Esquema V. Detección de $O_2^{\cdot -}$ por MitoSOX. En la mitocondria, la oxidación de la sonda MitoSOX da lugar a un derivado 2-hidroxi-5-(trifenilfosfonio)hexiletidio fluorescente, que permite la detección de $O_2^{\cdot -}$ de manera específica en el orgánulo.

Para registrar MitoSOX por microscopía, las células se sembraron en placas con fondo de plástico ultrafino (Ibidi, Martinsried, Alemania). Una vez transfectadas, se incubaron durante 30 min a 37°C y CO_2 al 5%, con MitoSOX® 2 μM en tampón Hank's. Tras dos lavados con PBS a temperatura ambiente, se registró la intensidad de fluorescencia de la sonda durante 15 minutos tras la inducción de estrés oxidativo. Como control negativo se utilizaron células en ausencia de la sonda.

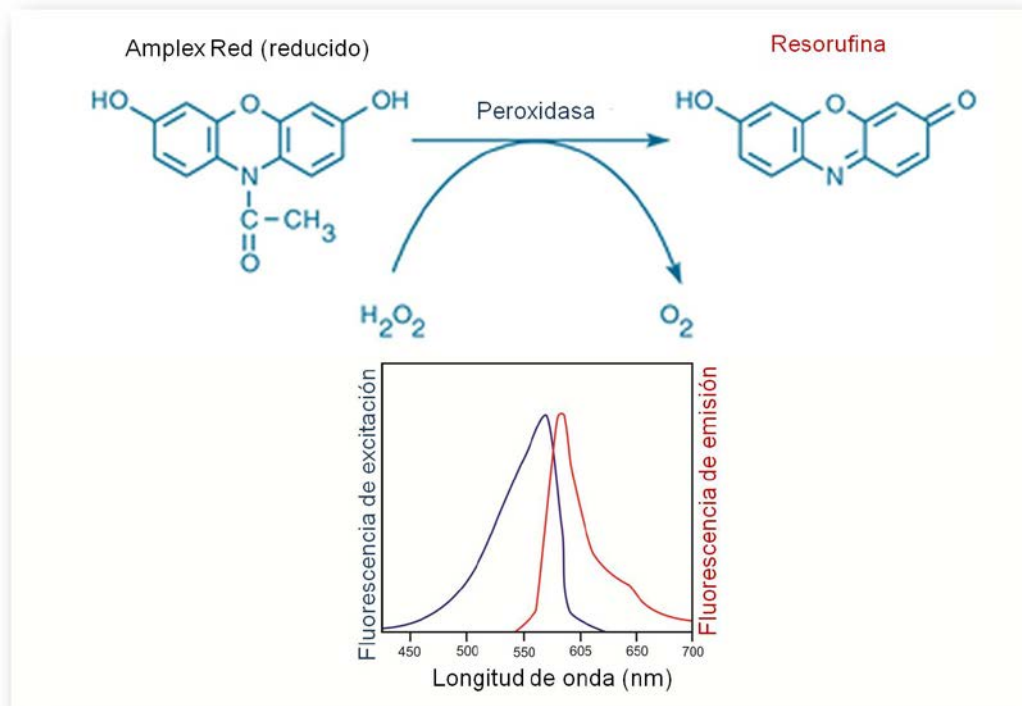
Para registrar MitoSOX por citometría de flujo, las células se lavaron con PBS y posteriormente se tripsinizaron y se centrifugaron (5 min a 500 x g). En las muestras previamente tratadas con un agente oxidante, el sedimento celular resultante se resuspendió en tampón Hank's frío y se mantuvo en hielo hasta la adquisición de eventos, empleando un citómetro BD FACScalibur (BD BioSciences). Para determinar el estado basal y oxidado de MitoSOX en una misma muestra, se resuspendieron las células en tampón Hank's a 37°C, analizando la fluorescencia de la sonda antes y después del estímulo con el agente oxidante. En el análisis citométrico se utilizaron $3 \cdot 10^5$ células por cuadruplicado por condición. Los umbrales de fluorescencia se ajustaron

en base a sus espectro de excitación/emisión (510/580 nm). La calibración del citómetro se realizó utilizando muestras en presencia o ausencia de la sonda, así como GFP⁺ o GFP⁻.

7.2. Determinación de H₂O₂.

7.2.1. Detección de H₂O₂ por AmplexRedTM.

La producción de H₂O₂ en mitocondrias y células intactas se realizó utilizando la sonda luminiscente AmplexRedTM (Molecular Probes. Invitrogen. Oregón, EE.UU.). En presencia de la peroxidasa de rábano, esta sonda (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina) reacciona estequiométricamente 1:1 con H₂O₂, originando un compuesto oxidado (resorufina) fluorescente (λ_{exc} ~510 nm; λ_{em} ~590 nm) (**Esquema VI**). Se utilizaron 50 µg de proteína mitocondrial en las 2 h siguientes al aislamiento, a fin de conservar su integridad y funcionalidad. Las mitocondrias se incubaron con AmplexRedTM 100 µM en tampón de respiración mitocondrial (KCl 125 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, 0.5 mg/mL de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos y HEPES 10 mM, pH 7.4), en presencia de 0.5 U/mL de peroxidasa de rábano. La luminiscencia se registró durante 45 min a intervalos de 1 min, utilizando un fluorímetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EE.UU.), con una longitud de onda de excitación de 538 nm y de emisión de 604 nm.



Esquema VI. Detección de H_2O_2 por AmplexRed. La sonda AmplexRed se oxida por H_2O_2 en presencia de peroxidasa de rábano, pudiendo detectar la fluorescencia del derivado oxidado a que da lugar (resorufina).

Para la determinación de H_2O_2 en célula intacta se incubaron $1.5 \cdot 10^4$ células con AmplexRedTM 100 μ M en tampón Krebs-Ringer fosfato (NaCl 145 mM, Na_2PO_4 5.7 mM, KCl 4.86 mM, $CaCl_2$ 0.54 mM, $MgSO_4$ 1.22 mM y glucosa 5.5 mM, pH 7.4). La luminiscencia se registró de la misma manera. En ambos casos, se utilizaron para los cálculos las pendientes derivadas de la fluorescencia emitida por la sonda.

7.2.2. Detección de H_2O_2 mitocondrial por pHyPer-dMito.

El plásmido pHyPer-dMito (Evrogen; Moscú, Rusia) expresa una versión modificada del dominio OxyR de *E. coli*, sensible a la oxidación por H_2O_2 . Una vez oxidado, se produce un cambio conformacional que emite fluorescencia (Belousov et al., 2006). Las longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) alcanzan su máximo valor a 420 y 500 nm, mientras que la de emisión (λ_{em}) se sitúa en los 516 nm. La producción de H_2O_2 por la mitocondria en células intactas, se realizó utilizando este plásmido mediante microscopía de epifluorescencia. Para ello, tras lavar las células con PBS, se incubaron

en tampón Hank's a 37°C y se registró la variación de fluorescencia en estado basal y tras 15 minutos de tratamiento con rotenona 10 µM.

7.2.3. Determinación de H₂O₂ *in vitro*.

La determinación de H₂O₂ *in vitro* se realizó mediante el método de Heinzl y colaboradores (Heinzl et al., 1992). Este método consiste en determinar la absorbancia a 492 nm producida por la reacción del H₂O₂ con 3.2 mM sulfato amónico ferroso hexahidratado (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ y 180 mM tiocianato potásico (KSCN) en presencia de HCl 11.4 mM, durante 10 min a T^a ambiente. Para las determinaciones, se empleó un espectrofotómetro de placas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corp, Basingstoke, Reino Unido). Los resultados de absorbancia se extrapolaron a los de una curva de H₂O₂ (0-100 µM).

7.2.4. Determinación de la desaparición de H₂O₂ *in vitro*.

Para determinar la capacidad de GSH y γGC para eliminar H₂O₂ se prepararon diluciones de ambos tioles (0-2 mM) preparadas extemporáneamente en un medio de reacción compuesto por NaHPO₄ 0.1 M, EDTA diK⁺ 1 mM, NADPH 0.4 mM, pH 7.4 a 25°C. Las diluciones de GSH y γGC se incubaron a 25°C en presencia o en ausencia de 0.5 U/mL de GPx1 y/o GSR (Sigma). La incubación en presencia de 100 µM H₂O₂ se realizaron durante un máximo de 5 minutos, deteniendo a cada minuto la reacción mediante la adición de HCl concentrado (11.4 mM). La determinación del H₂O₂ presente en el medio de reacción se realizó como se indica en el apartado anterior.

8. Electroforesis e inmunodetección de proteínas (Western Blot)

La obtención de extractos proteicos totales para Western se realizó después de lavar las células con PBS y lisándolas en tampón RIPA (SDS al 1 %, EDTA 0,5 M, Triton Tx-100 al 1 % v/v, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 10 mM a pH 7.0), incluyendo inhibidores de proteasas y fosfatasas (aprotinina 50 µg/mL, leupeptina 50 µg/mL, inhibidor de tripsina (soybean) 50 µg/mL, TLCK 100 µM, NaF 50 mM, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µM, N-p-tosil-L-fenilamina clorometil cetona (TPCK) 100 µM, fenantrolina 1 mM y pepstatina A 50 µg/mL). Los extractos se recogieron en hielo e inmediatamente se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 13,000 x g durante 10 minutos. La concentración de proteínas se determinó en el sobrenadante mediante el sistema BCA (Pierce, Rockford IL, EEUU).

Las proteínas (20-90 µg) de los extractos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (solución de acrilamida/bisacrilamida 29:1; BioRad Laboratories S.A., California, EE.UU.) al 8, 10 ó 12%, dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Para identificar dichos pesos moleculares, se utilizó el marcador BenchmarkTM (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) o Dual Colors® (BioRad Laboratories, California, EE.UU.). Las proteínas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3®, BioRad Laboratories, California, EE.UU.). Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Biosciences, Nueva Jersey, EE.UU.) y se bloquearon durante 1 h con leche al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0.1% v/v; pH 7.5). Las membranas se incubaron a 4 °C durante toda la noche en una solución de TTBS suplementado con BSA al 2 % (p/v), que contenía el anticuerpo deseado (ver **Tabla IV**). Como control de carga, las membranas se incubaron en presencia de anti-GAPDH (Ambion, Austin, Texas, EEUU) o de anti-VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) para el control de carga mitocondrial.

Anticuerpos				
Anticuerpo	Especie	Dilución (aplicación)	Clon (Referencia)	Casa comercial
Glutamato cisteína ligasa (Subunidad catalítica. GCL _H)	Conejo (policlonal)	1:1000 (WB)	ab17926	Abcam
Glutamato cisteína ligasa (Subunidad catalítica. GCL _H)	Conejo (policlonal)	1:40 (ICQ) 1:40 (WB)	[Díaz-Hernández, 2005, 38992]	Producción propia
Glutación Peroxidasa 1 (GPx1)	Conejo (policlonal)	1:1000 (WB)	ab59546	Abcam
Glutación Sintetasa (GSS)	Ratón (monoclonal)	1:1000 (WB)	Clon H-7 (Sc 166882)	Santa Cruz
Glutación Reductasa (GSR)	Ratón (monoclonal)	1:1000 (WB)	Clon B-12 (Sc 133159)	Santa Cruz
Superóxido Dismutasa 2 (SOD2) o MnSOD	Ratón (monoclonal)	1:2000 (WB)	Clon 2A1 (ab16956)	Abcam
Porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)	Conejo (policlonal)	1:1000 (WB)	Ab5	Calbiochem
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Ratón (monoclonal)	1:40000 (WB)	Clon 6C5 (AM4300)	Ambion
Proteína nuclear neuronal (NeuN)	Ratón (monoclonal)	1:1000 (IHQ)	Clon A-60 (MAB377)	Chemicon
Proteína verde fluorescente (GFP)	Conejo (policlonal)	1:1000 (IHQ)	ab290	Abcam
Anticuerpos secundarios				
Anti-IgG (H + L) de ratón conjugado con HRP	Cabra (policlonal)	1:1000 (WB)	32230	Pierce
Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con HRP	Cabra (policlonal)	1:1000 (WB)	1858415	Pierce (Thermo)
Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa 488	Cabra (policlonal)	1:500 (ICQ)	A11008	Molecular Probes (Invitrogen)
Anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con Alexa 594	Cabra (policlonal)	1:500 (ICQ)	A-20004	Molecular Probes (Invitrogen)
Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con Cy5 IgG	Cabra (policlonal)	1:400 (ICQ)	111-175-144	Jackson Immuno
Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado con Cy3.	Cabra (policlonal)	1:500 (CF)	111-165-003	Jackson Immuno

Tabla IV. Anticuerpos utilizados en esta memoria. En la tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para los estudios de expresión proteica por transferencia tipo western (WB), citometría de flujo (CF), inmunocitoquímica (ICQ) e inmunohistoquímica (IHQ). Se especifican las diluciones utilizadas, clon, referencia y casa comercial del anticuerpo.

Tras realizar 4 lavados de 5 min con TTBS, las membranas se incubaron con leche al 2 % en TTBS en presencia del anticuerpo secundario deseado (**Tabla IV**), conjugado con la peroxidasa de rábano a 25 °C durante 1 h a T^a ambiente. Finalmente, las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Dura (Pierce, Thermo Fisher, Rockford, Illinois, EE.UU.) o Luminol (Santa Cruz, California, EE.UU.) y se expusieron a una película Kodak XAR-5 (suministrada por Sigma). Tras revelar, la autorradiografía se escaneó.

9. Inmunocitoquímica

Para los ensayos de inmunocitoquímica, las células se hicieron crecer en cubreobjetos de cristal o placas de 8 pocillos con fondo de plástico ultrafino (Ibidi, Martinsried, Alemania). Las células se transfectaron con las construcciones correspondientes, realizadas en pcDNA3.1+, a fin de evitar la fluorescencia derivada de GFP.

A las 24 h post-transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS durante 30 min. Tras lavar con PBS, las células se permeabilizaron durante 5 min con Triton X-100 (Sigma) al 0.3% (v/v) en PBS. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una solución de bloqueo, compuesta por Triton X-100 al 0.1% (v/v) y suero de caballo al 5% (v/v) en PBS. A continuación, se incubaron a 4°C durante toda la noche en la solución de bloqueo conteniendo un anticuerpo anti-GCL obtenido en nuestro laboratorio (Diaz-Hernandez et al., 2005), a una dilución 1:40. Tras lavar tres veces con PBS frío, se añadió el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-IgG de conejo (dilución 1:400. Molecular Probes, Invitrogen, Oregón, EE.UU.) durante 1 h a T^a ambiente en solución de bloqueo. Las células transfectadas con el vector plasmídico pMitoDsRed2 (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) expresaron una proteína fluorescente roja (DsRed2) en la mitocondria que permitió la identificación de los orgánulos. Finalmente, las placas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en PBS que contenía DAPI (10 µM; Sigma) a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Tras lavar dos veces con PBS y una vez con agua estéril, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio, utilizando el

compuesto SlowFade® (Molecular Probes, Oregón, EE.UU.) para evitar la pérdida de fluorescencia. La visualización y adquisición de microfotografías se realizó mediante contraste de fases o fluorescencia, utilizando una magnificación de x40 o x60 en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Tokio, Japón).

10. Inmunohistoquímica

Los ratones de la cepa C57BL/6J se anestesiaron profundamente mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de una solución de hidroclicorato de xilacina (Rompún; Bayer, Kiel, Alemania) e hidroclicloruro de ketamina/clorobutanol (Imalgene; Merial, Lyon, Francia) (1/4) a razón de 1 mL/Kg de peso corporal. Tras verificar la completa anestesia, los ratones se perfundieron intra-aórticamente con NaCl al 0.9% (p/v), seguido de 5 mL/g de una solución de fijación de Somogy (paraformaldehído 4% (p/v) y ácido pícrico al 0.2 % (p/v) en tampón fosfato (TF) 0.1 M, pH 7.4), sin glutaraldehído. Tras la perfusión, los cerebros se diseccionaron coronalmente en dos partes y se post-fijaron en la solución de Somogy durante toda la noche a 4°C.

A continuación, los bloques de cerebro se lavaron sucesivamente en TF 0.1 M (pH 7.4) durante 10 min, 30 min y 2 h y se sumergieron secuencialmente en concentraciones crecientes de sacarosa al 20% y 30% (p/v) hasta lograr su precipitación. Tras la crioprotección, se cortaron secciones coronales de 40 µm de espesor con un criostato de congelación (Leica CM 1950 AgProtect, Leica, Nussloch, Alemania), recolectando las secciones en azida sódica al 0.05% (p/v) en TP 0.1 M a 4°C.

Las secciones coronales se lavaron en TF 0.1 M cada 10 min hasta un total de tres veces y posteriormente se incubaron secuencialmente en:

1. Borohidruro de sodio al 0.5% (p/v) en TF 0.1 M durante 30 minutos, a fin de eliminar la autofluorescencia derivada de los aldehídos.
2. Anti-GFP producido en ratón (1:1000. Ref: ab290, Abcam, Cambridge, UK) y anti-NeuN producido en ratón (1:1000. Ref: MAB377, Chemicon international. Temecula, California, EE.UU.). Estos anticuerpos se incubaron en Triton X-100 al

0.2% (v/v. Sigma) y suero de burro al 5% (v/v. Jackson Immoresearch, Pensilvania, EE.UU.) en TF 0.1 M durante 72 h a 4°C.

3. Anticuerpos anti-conejo, conjugado con Alexa-488 y anti-ratón, conjugado con Alexa-594 (Molecular Probes, Invitrogen, Oregón, EE.UU.), ambos producidos en cabra. Se utilizaron a una dilución 1:500 y se incubaron 2 h a T^a ambiente.

4. DAPI 0.5 µg/mL en TF 0.1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después de cada incubación, las secciones se lavaron cuidadosamente con TF 0.1 M tres veces durante 10 minutos cada una. Después del último lavado, las secciones se montaron en la solución acuosa Fluoromount (Sigma) para conservar la fluorescencia. Finalmente, las secciones se observaron y fotografiaron con los filtros apropiados en un microscopio confocal (TCS SP2, Leica, Mannheim, Alemania) y un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon. Eclipse Ti-E, Tokio, Japón), equipado con un iluminador (Nikon Intensilight C-HGFI, Tokyo, Japón) y una cámara CCD (Coupled-Charged Device) en blanco/negro (Hamamatsu ORCAER, Hamamatsu, Japón).

11. Determinación de la apoptosis neuronal

11.1. Anexina V / 7-amino-actinomicina D

La determinación de la muerte celular apoptótica se realizó mediante citometría de flujo, tras incubar las células con anexina V conjugada con el fluorocromo APC (aloficocianina). El método consiste en la detección, mediante anexina V, de fosfatidilserina en el lado extracelular de la membrana plasmática. Para descartar las células con la membrana plasmática no intacta, la suspensión celular se incubó en presencia de 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences, Nueva Jersey, EE.UU.), que es impermeable a la membrana plasmática y, por tanto, se une al DNA solamente en las células no intactas. Sólo aquellas células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas.

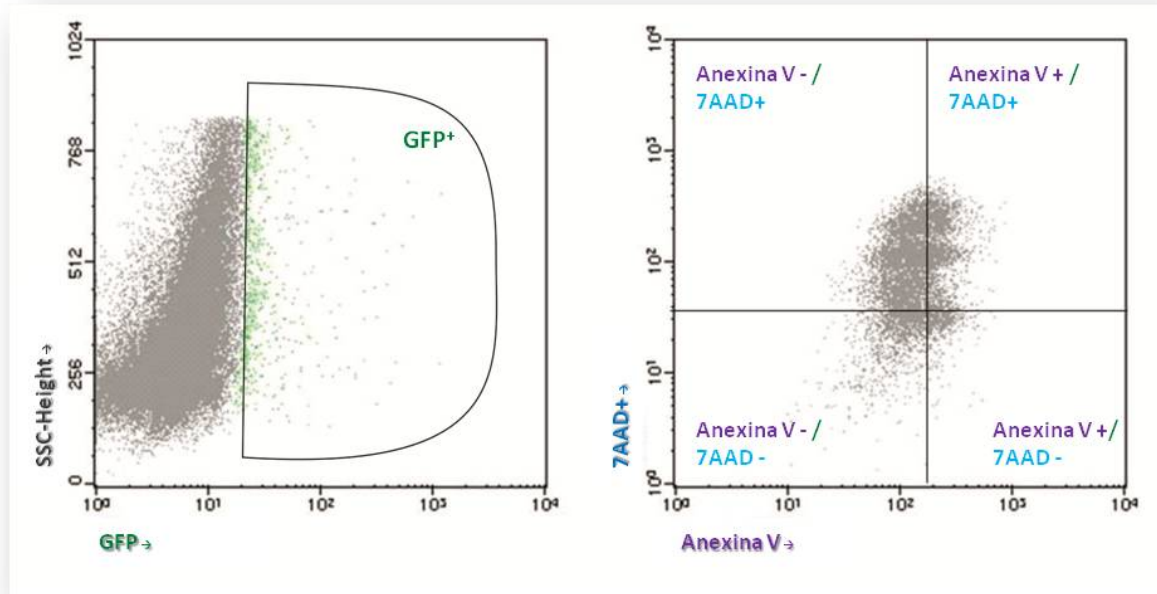


Figura II. Determinación de la muerte celular por apoptosis. De la población total de células se seleccionaron solamente aquellas que presentaban fluorescencia verde (GFP⁺). En esta población, se analizó la tinción con Anexina V-APC y con 7-AAD, considerándose apoptóticas las células Anexina V-APC positivas y 7-AAD negativas.

Así, las neuronas y células HEK293T se tripsinizaron suavemente con EDTA tetra-Na⁺ 1 mM en PBS (pH 7.4) o tripsina (0.5%) / EDTA tetra-Na⁺ (0.2%) (Sigma), respectivamente, y se incubaron con la anexina V-APC y el 7-AAD en tampón de conjugación (HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM). Tras 15 min de incubación, las señales de la GFP, de la anexina V-APC y del 7-AAD se analizaron en los canales FL1, FL4 y FL3, respectivamente, de un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15 mW sintonizado a 488 nm, utilizando los programas CellQuest™ y Paint-A-Gate™ PRO (BD Biosciences). El umbral del analizador se ajustó en el canal correspondiente del citómetro de flujo para excluir la mayoría de los restos subcelulares o agregados celulares. Con ello, se estimó el ruido de fondo debido a la ruptura de neuritas y extensiones celulares, y los dobletes o tripletes formados por uniones intercelulares. Para el análisis citométrico, se seleccionaron $3 \cdot 10^5$ células, en cuadruplicado por condición. La selección de los eventos celulares se realizó solamente en la subpoblación GFP⁺.

11.2. Caspasa 3 activa

La detección de la caspasa 3 activa se realizó mediante el kit ApoActive3™ Kit (Bachem, California, EE.UU), acorde a las instrucciones del fabricante. El fundamento de esta técnica se basa en el reconocimiento del dominio constituido por los aminoácidos 163-175 de la subunidad p18 de la caspasa 3, que queda expuesto tras la escisión por eventos pro-apoptóticos.

Para ello, se tripsinizaron suavemente las neuronas con EDTA tetra- Na^+ (1 mM). Tras centrifugar a 500 x g durante 5 min, los sedimentos celulares se fijaron durante 20 min, y una vez lavados con PBS, se resuspendieron en PBS conteniendo albúmina bovina sérica (BSA. Sigma) al 2% (p/v). Después de un nuevo lavado con PBS, las células se incubaron durante 1 h con anti-caspasa 3 producido en conejo (Bachem, S-9073. California, EE.UU.). Transcurrida 1 h de incubación a T^a ambiente, las células se lavaron con PBS con BSA al 1% (p/v). A continuación, se incubaron durante 1 h a T^a ambiente, con un anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra y conjugado con CyC3 (1:500. Jackson Immunoresearch, Pensilvania, EE.UU.). Tras lavar con PBS conteniendo BSA al 1% (p/v), las células se resuspendieron en PBS con BSA al 2% (p/v). Finalmente, se analizó la fluorescencia derivada del marcaje con el anticuerpo con el citómetro de flujo sintonizado para detectar la λ_{em} máxima a 570 nm y ajustado para descartar restos o acúmulos celulares. Se seleccionaron $3 \cdot 10^5$ eventos por cuadruplicado.

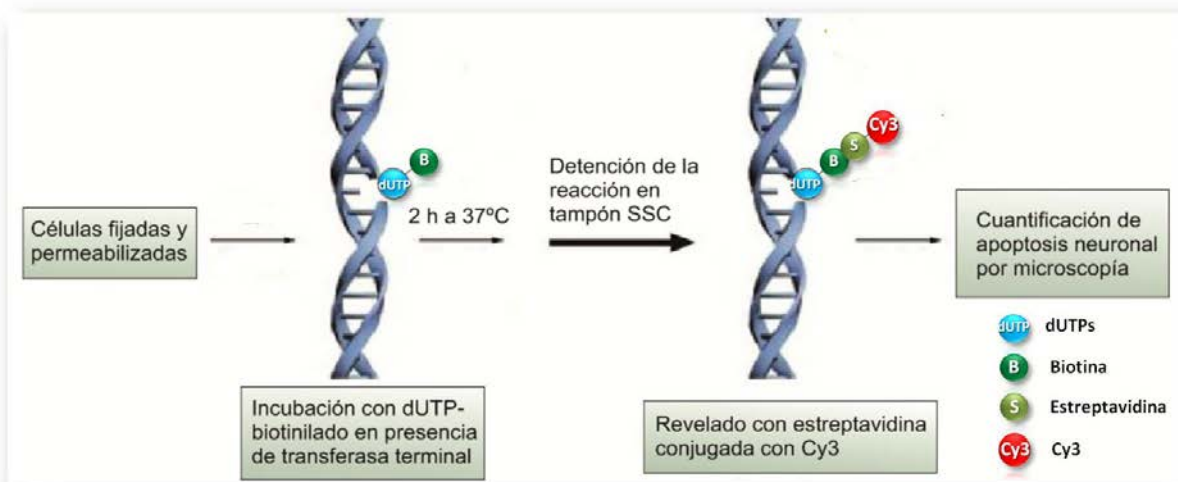
11.3. TUNEL.

La muerte neuronal por apoptosis se determinó *in vivo* mediante la técnica de TUNEL (TdT mediated dUTP Nick End Labeling), que consiste básicamente en identificar el DNA nuclear fragmentado (**esquema VII**). Para ello, se obtuvieron cortes histológicos de cerebro, tal y como se indica en el apartado 11. Después de lavar tres veces en tampón fosfato (PB, 0.1 M, pH 7.4; 10 min), las muestras de tejido se fijaron en frío (-20°C) con una mezcla etanol:ácido acético (2:1) durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron durante 20 min en una solución de borohidruro sódico (5 mg/mL), preparada extemporáneamente. Tras esta incubación, las muestras se

Material y métodos

permeabilizaron durante 15 min con una solución de Tritón X-100 al 0.2% y citrato sódico al 0.1%, preparadas en fresco. Una vez permeabilizado, se llevó a cabo la preincubación del tejido en el tampón de TUNEL (CoCl₂ 1 mM, cacodilato de sodio 140 mM y Triton X-100 0.3% en tampón Tris 30 mM, pH 7.2, 30 min), tras lo cual se incubaron durante 2 h a 37°C en presencia de 800 U/mL transferasa terminal (Roche) y dUTP-biotinilado 1 μM (Roche). La reacción finalizó con la incubación en tampón SSC (NaCl 3M, sodio citrato 0.3M, pH 7.0) dos veces, durante 10 min cada una. Salvo la incubación con la transferasa terminal, entre cada paso se lavó tres veces el tejido durante 10 min en tampón PB (0.1 M). Finalmente, el revelado de las muestras se realizó mediante incubación con estreptavidina conjugada con Cy3 (Jackson Immoresearch, Pensilvania, EE.UU.).

La cuantificación de la apoptosis neuronal se realizó mediante el conteo de las células positivas para TUNEL y NeuN (TUNEL⁺/NeuN⁺) en un área de 0.3 mm² correspondiente a tres secciones consecutivas del tejido.



Esquema VII. Detección de apoptosis neuronal en tejido mediante TUNEL. La apoptosis neuronal se cuantificó mediante la unión de dUTPs conjugados a biotina, a las cadenas de DNA con roturas, mediante la actividad de la transferasa terminal durante 2h a 37°C. Tras detener la reacción con tampón SSC, la biotina fue reconocida por la estreptavidina conjugada a un fluoróforo Cy3, permitiendo la detección de la apoptosis neuronal por microscopía.

12. Determinación de tioles y disulfuros

Todas las determinaciones detalladas en esta sección fueron llevadas a cabo por el Dr. Javier Escobar, de la Unidad de Investigación Neonatal / Universidad de Valencia.

12.1 Preparación de las muestras

Para la determinación de las formas oxidada y reducida de tioles de bajo peso molecular utilizamos el método de Rogers y colaboradores (Rogers et al., 2006), con algunas modificaciones.

Las muestras de tejido se obtuvieron tras la anestesia de los animales con isoflurano (Abbot, Illinois, EE.UU.) y sacrificio mediante dislocación cervical. Cerebro, hígado y riñón se extrajeron y congelaron rápidamente por la técnica de “freeze-clamping” en nitrógeno líquido. Posteriormente, se homogeneizó el tejido en PBS con N-etilmaleimida (NEM, Sigma) a razón de 4 μ L/mg de tejido.

Para células HEK293T en cultivo, se sembraron en placas de 60 cm^2 (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a $5 \cdot 10^4$ células/ cm^2 . Tras cuatro días en cultivo, y transcurridas 24 h de la transfección con los correspondientes plásmidos, las células se lavaron con PBS y se incubaron con tampón Hank's durante 7 h en estufa, a 37 °C. Al cabo de este tiempo, las células se lavaron durante 2 min con PBS frío con N-etilmaleimida (NEM, Sigma) a una concentración de 10 mM. Las células se recogieron por raspado en 400 μ L de PBS-NEM y, al igual que en tejido, se añadió ácido perclórico (PCA) a una concentración final de 4% (v/v), centrifugando posteriormente las muestras a 13.000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante que resultó de esta centrifugación se conservó a -80 °C hasta la determinación de tioles por cromatografía líquida de alto rendimiento y detección espectrométrica de masas (UPLC-MS/MS), tal y como se describe en los apartados siguientes.

Para la determinación de disulfuros proteicos con tioles de bajo peso molecular, las células se lavaron durante 2 min con PBS-NEM (10 mM) frío, se recogieron por raspado con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 min a 4°C. Con objeto de eliminar posibles interferencias con tioles libres en el medio y no unidos a proteínas, el precipitado se lavó dos veces con TCA al 10%,

Material y métodos

centrifugando las muestras entre cada lavado. A continuación, el precipitado se disolvió en HEPES 50 mM con SDS al 2% (p/v), a pH 8.0, añadiendo NaHCO₃ en polvo hasta saturación. Una vez resuspendido el precipitado, se recogió una alícuota para la determinación de las concentraciones de proteínas en la muestra. Otra alícuota se trató con ditioneitol (DTT, Sigma) a una concentración de 2.5 mM. Tras 1 h de incubación a 40°C en agitación, y tras comprobar que el pH estaba entre 9-10, se añadió NEM 10 mM y se agitó manualmente.

Posteriormente, se añadió ácido perclórico al 4% (v/v) y las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min a 4°C, conservando las muestras a -80°C hasta el análisis por UPLC-MS/MS.

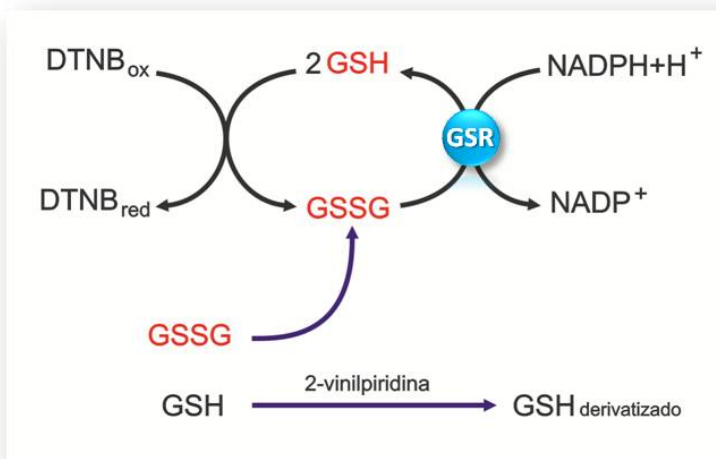
13.3. Cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas (UPLC-MS/MS)

Obtenidas las muestras de tioles de bajo peso molecular libres y asociados a proteínas, la determinación de los mismos se realizó por UPLC-MS/MS, utilizando un espectrómetro de masas triple-cuádruple Xevo TQ-S (Waters, Manchester, UK). La separación analítica se realizó a 50°C, utilizando una columna con partículas de núcleo C19 Kinetex (100 x 2 mm, 3 µm, Phenomenex, California, EE.UU.) y empleando un volumen de inyección de 2 µl.

Para la detección de los compuestos de interés, se utilizó un gradiente de elución de 6 min, a un flujo de 400 µm/min, cuyas condiciones iniciales fueron con ácido fórmico al 0.1% (v/v) en agua, y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, durante 1 minuto. A continuación, se sometieron a un gradiente lineal de hasta el 85% de la solución de ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo y se mantuvo el flujo isocrático durante 2 minutos. Finalmente, se utilizó un gradiente lineal de 0.25 min para retornar a las condiciones iniciales, que se mantuvieron durante 1.25 min para re-equilibrar el sistema. El espectro de masas en el tándem del electrospray de iones positivos se registró utilizando un voltaje de capilar de 3 kV, con una temperatura de fuente de 350°C y los gases del cono y de nebulización ajustados a 750 y 180 L/h, respectivamente.

14. Determinación de la concentración de glutatión.

Para determinar la concentración de glutatión en células, se lavaron con PBS frío y se recolectaron rápidamente con ácido sulfosalicílico (ASS) al 1% (p/v) con la ayuda de un raspador. Para la determinación en mitocondrias aisladas, se resuspendieron en 50 μL de la solución de ASS. Los lisados celulares o mitocondriales se centrifugaron a 13.000 $\times g$ durante 5 min y el contenido de glutatión total ($\text{GSx} = \text{GSH} + 2\text{GSSG}$) se analizó en los sobrenadantes según el método descrito por Tietze (Tietze, 1969). Así, en placas de 96 pocillos se mezclaron 10 μl de muestra, 90 μl de H_2O y 100 μl de la mezcla de reacción (EDTA 1 mM, 5,5'-ditio-bis-acido 2-nitrobenzoico 0.3 mM, NADPH 0.4 mM y 1 U/mL de glutatión reductasa en tampón fosfato sódico 0.1 mM, pH 7.5). Los incrementos de absorbancia tras la reacción del GSH con el DTNB se monitorizaron en un espectrofotómetro de placas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corp, Basingstoke, Reino Unido) a 405 nm, a intervalos de 15 segundos, durante 2,5 min.



Esquema VIII. Determinación enzimática de GSH y GSSG. La reducción del DTNB paralela a la oxidación del glutatión, permite su determinación a 405 nm. La derivatización del GSH con 2-vinilpiridina, deja disponible al GSSG para entrar en el ciclo de reacción con el DTNB, evitando la interferencia del GSH. Por diferencia entre el GSH conjugado con respecto al total, es posible calcular la concentración de GSH y GSSG.

La concentración de GSSG se determinó tras derivatizar GSH con 2-vinilpiridina (Sigma), seguido de neutralización con Tris 0.2 M (pH 5-7). Paralelamente se llevó a cabo una recta patrón a partir de soluciones estándar de GSSG de concentraciones de 0 a 50 μM . La concentración de glutatión total ($\text{GSx} = \text{GSH} + 2 \cdot \text{GSSG}$) se calculó a partir de las pendientes obtenidas en las muestras, extrapolándolas a las obtenidas con la recta patrón.

Material y métodos

Las concentraciones de GSH se validaron mediante HPLC con detección electroquímica (primer electrodo: +100 mV; electrodo secundario: +100 a +600 mV en incrementos de +50 mV), utilizando un patrón de GSH (Sigma) como estándar. Se procedió del mismo modo que para la determinación de la concentración de γ GC, detallada en el apartado 15.

15. Determinación de la concentración de γ GC.

La concentración de γ GC se determinó por HPLC utilizando un equipo Shimadzu LC-20A (Shimadzu, Duisburgo, Alemania) con un módulo de interfase CBM-20A, (Shimadzu GmbH, Duisburgo, Alemania). La muestra se hizo pasar por una columna en fase reversa Teknokroma MediterraneaSea₁₈ ODS (4.6 × 250 mm, 5- μ m de tamaño de partícula), utilizando como fase móvil ácido ortofosfórico 15 mM, a un flujo de 0.5 mL/min. El eluyente se bombeó a través de un detector electroquímico (ESA Inc, Chelmsford, Massachusetts, EE.UU.), con un electrodo previo ajustado a +100 mV (para compuestos con bajo potencial de oxidación) y otro posterior ajustado a un rango de cada estándar inyectado, desde +100 mV hasta +650 mV, en incrementos de +50 mV. Como referencia, se utilizaron soluciones estándar de γ GC de concentraciones comprendidas entre 2,5 y 10 μ M.

16. Determinaciones enzimáticas.

16.1. Determinación de la actividad enzimática de la glutamato cisteína ligasa.

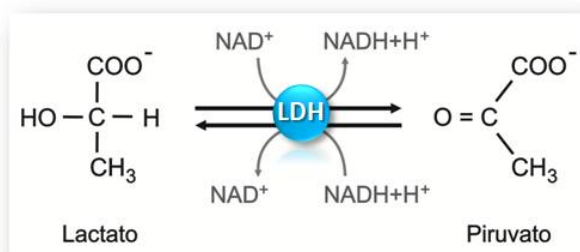
La determinación de la actividad enzimática de la GCL se realizó según el método descrito por Gegg y colaboradores (Gegg et al., 2002). Transcurridas 24 h de

transfección, las células se lavaron con PBS y se recogieron por raspado en el medio de extracción (320 mM sacarosa, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4). Para la determinación de la actividad de GCL en mitocondrias, éstas se resuspendieron directamente en medio MAM tras realizar el fraccionamiento subcelular.

Posteriormente se congelaron y descongelaron las muestras tres veces en nitrógeno líquido, con objeto de lisar las células y mitocondrias. Las membranas se retiraron al por centrifugación a 13.000 x g durante 5 min a 4°C. A continuación, los sobrenadantes se filtraron con filtros de retención de 10 KDa (Amicon, Millipore) por centrifugación a 12.000 x g a 4°C, durante 15 minutos. El filtrado se utilizó para el análisis de la γ GC y la fracción proteica retenida se empleó para la determinación de la actividad de la GCL. Así, dicha fracción proteica se incubó en tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8.2, que contenía KCl 0,15 mM, MgCl₂ 20 mM, EDTA 2 mM, ATP 10 mM, L-cisteína 10 mM, L-glutamato 40 mM y acivicina 220 μ M, a 37°, durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido ortofosfórico 15 mM a 4°C e inmediatamente se determinó la concentración de γ -glutamil-cisteína (γ GC) como se indica en la sección 15.

16.2. Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa.

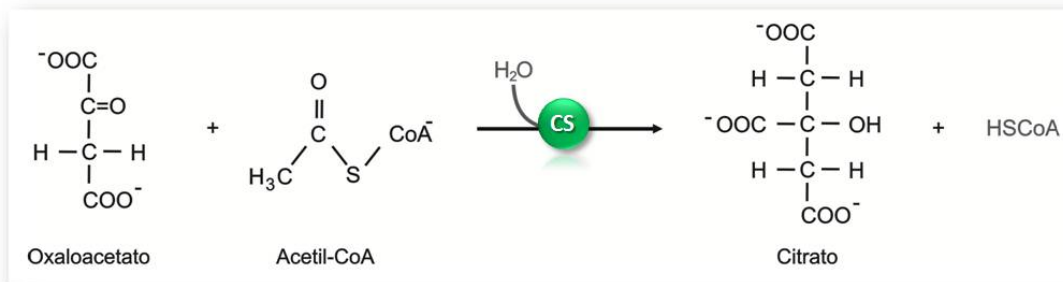
La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó en 5-10 μ g de proteína total en un volumen final de 1 mL de medio de reacción (Tris 80 mM, NaCl 200 mM y NADH 0.28 mM) a pH 7.5. Tras iniciar la reacción con 10 μ L de piruvato 20 mM, se registró el cambio en la absorbancia del NADH a 340 nm, durante 5 minutos de incubación a 30°C.



Esquema IX. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH) como medida representativa del contenido citosólico en muestras proteicas.

16.3. Determinación de la actividad citrato sintasa.

La actividad de la CS se determinó en 5-10 µg de proteína, registrando el cambio de absorbancia del ácido 5-5'-ditio-bis 2-nitrobenzoico (DTNB) a 412 nm en un medio de reacción compuesto por Tris-HCl 100 mM, acetil-CoA 0.1 mM, DTNB 0.2 mM, Triton X-100 al 0.1% (v/v) y oxaloacetato 0.2 mM. La adición de éste último fue utilizada para comenzar la reacción.



Esquema X. Determinación de la actividad citrato sintasa (CS) como medida representativa del contenido mitocondrial en muestras proteicas.

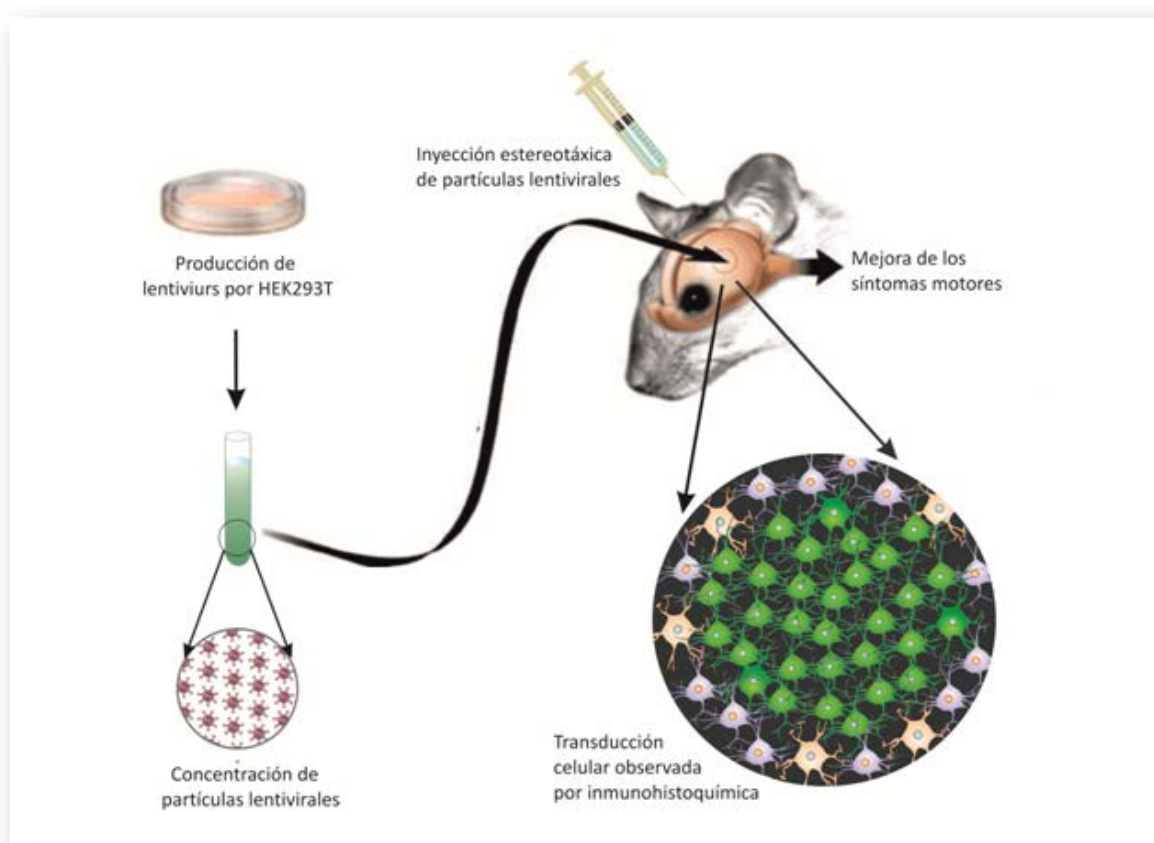
17. Estudios *in vivo*.

17.1. Inyección estereotóxica de lentivirus.

Con objeto de expresar GCL en mitocondria *in vivo*, se realizaron inyecciones estereotóxicas de lentivirus portadores de la construcción *mitoGCL* en el estriado de ratón (**Esquema XI**), tal y como describen Shih y colaboradores (Shih et al., 2005), siguiendo los parámetros descritos en un atlas estereotáxico (Paxinos and Franklin, 2001).

Para ello, se utilizaron ratones machos C57BL/6J, de 10-16 semanas de edad. Los animales se pre-anestesiaron por vía inhalatoria con sevoflurano (Sevorane. Abbott) durante 2-3 minutos, a una concentración inicial de 6% en una atmósfera de O₂ y N₂, ambos administrados a 3 L/min, mediante una columna de distribución de gases (Hersill H-3, Madrid, España) y un vaporizador (InterMed Penlons Sigma Delta, Oxford, Reino

Unido). Una vez dormidos los ratones, se situaron rápidamente en un sistema de alineamiento estereotáxico (Modelo 1900; David Kopf Instruments, CA, EE.UU.) equipado con un micromanipulador (Modelo 1940, David Kopf Instruments, CA, EE.UU.) y sistema de lectura digital (Wizard 550, Anilam, NY, EE.UU.), ajustando las barras interauriculares y dentales para el correcto posicionamiento del cráneo. La concentración de sevoflurano se mantuvo a 3% hasta que el animal estuvo correctamente situado, momento en que se disminuyó a 2% y el flujo de aire a 2 L/min de O₂ y N₂. Para la correcta visualización del proceso quirúrgico se utilizó una estereomicroscopio (Nikon SMZ 645, Tokyo, Japón) y una fuente de luz fría de transmisión por fibra óptica (Schott KL1500 compact, Mainz, Alemania).



Esquema XI. Inyección estereotáxica de lentivirus. Los lentivirus producidos en células HEK293T, tras ser concentrados por ultracentrifugación y resuspendidos en PBS, se inyectaron mediante estereotaxia en el estriado de ratones de la cepa C57B6/J. La transducción de células por lentivirus se observó mediante inmunohistoquímica, mientras que los efectos en el comportamiento motor se analizó mediante el test de rotarod.

Tras realizar una incisión en la línea media craneal e irrigar las meninges con suero salino (NaCl) al 0.9% (p/v), se realizó en ambos hemisferios una perforación en el

Material y métodos

cráneo con un taladro (Modelo 1911, Kopf Instruments, CA, EE.UU.) y una broca de 0.50 mm de diámetro (diámetro #75, Kyocera, Bangalore, India). La inyección de los lentivirus se realizó tras retirar la broca y sustituir el taladro por un soporte (Modelo 5002, David Kopf, CA, EE.UU.). En dicho soporte se colocó una jeringa Hamilton de 5 μ L (Microliter 65 RN, Hamilton, NV, EE.UU.) con una aguja de 26 S (con punta de tipo 2), inyectando los lentivirus en las siguientes coordenadas: 0.5 mm anterior a Bregma, 2.1 mm lateral a la línea media y 3.8 mm ventral a la duramadre (Calkins et al., 2005). A fin de evitar demoras en el procedimiento de inyección de los lentivirus, estas agujas se precargaron antes de comenzar la cirugía de cada animal.

Una vez colocada la aguja en las coordenadas indicadas, se inició la inyección de las partículas lentivirales a un flujo de 0.25 μ l/min durante 12 min, hasta un total de 3 μ L inyectados, conteniendo $5 \cdot 10^6$ CFU/ μ L. La velocidad del flujo de inyección se controló digitalmente mediante una minibomba (UltraMicroPump III, World Precision Instruments, Florida, EE.UU.) y un dispositivo digital de control de flujo Micro4 (UMC4. World Precision Instruments, Florida, EE.UU.). Una vez terminada la liberación del contenido de lentivirus, la jeringa se dejó en el lugar de inyección durante 10 minutos a fin de facilitar la infusión de los lentivirus y evitar el reflujo.

Tras irrigar con suero salino 0.9% y realizar la correspondiente sutura, los animales se recuperaron de la anestesia en jaulas situadas sobre placas termostatzadas (Plactronic Digital, 25x60, JP Selecta, Barcelona, España) a 37°C durante 3 días.

17.2. Inyección de la neurotoxina 3-nitropropiónico.

La inyección de ácido 3-nitropropiónico se realizó según un protocolo establecido (Calkins et al., 2005; Shih et al., 2005). Transcurridos 3 días después de la cirugía estereotáxica para la inyección de lentivirus, los animales se pesaron y se prepararon extemporáneamente diluciones de 3NP de 25 mg/mL en PBS, ajustando el pH a 7.4 con NaOH 1M. Así, se inyectaron dosis de 50 mg/kg de peso corporal en un total de 200 μ L, a fin de homogeneizar los volúmenes inyectados a los ratones.

Las inyecciones de 3NP o PBS (control), se efectuaron cada 12 horas (a las 8:00 y 20:00 horas) durante un total de 3.5 inyecciones. Transcurridas 6-8 horas desde la

última inyección, los ratones se anestesiaron y perfundieron para el estudio inmunohistoquímico.

17.3. Determinación de la eficiencia de transducción lentiviral.

La determinación de la eficiencia de transducción por partículas lentivirales *in vivo* se cuantificó atendiendo a la expresión concomitante de GFP. En la región de tejido transducido se seleccionó un área de 0.5 mm² en 3 cortes consecutivos de tejido por ratón (n=4 ratones). Una proporción del 8.8±1.6% de las neuronas estriatales, identificadas por marcaje NeuN, fueron eficientemente transducidas, tal y como evidenció el marcaje GFP⁺. De éstas, el 40.8±5.7% (media±SEM) fueron neuronas estriatales, por tratarse de células NeuN⁺.

17.4. Determinación de la pérdida neuronal.

Para determinar la pérdida neuronal tras el tratamiento con 3NP, se contabilizó el número de células NeuN⁺ en una región de 0.5 mm² circundante al área de inyección, en un total de 3 cortes por ratón.

17.5. Obtención de tejido estriatal.

Con objeto de analizar la concentración de glutatión y actividad de GCL en el estriado de ratón, se obtuvieron muestras de tejido fresco, al cabo de 6 días tras la inyección estereotáxica de los lentivirus. Para evitar la variabilidad interindividual, cada ratón recibió el lentivirus control (*mitoGCL(E103A)*) y el problema (*mitoGCL*), uno en cada hemisferio.

Los animales se anestesiaron profundamente con una mezcla de hidrocloreto de xilacina e hidrocloreto de ketamina/clorobutanol (1/4) (ver apartado 11). Tras la decapitación, se extrajeron los cerebros y se diseccionaron coronalmente, utilizando una matriz de ratón adulto (ASI Instruments, Michigan, EE.UU.). Esta matriz metálica se

Material y métodos

encuentra dividida en secciones de 1 mm, lo que permite diseccionar fácilmente el tejido con la utilización de un bisturí. La región de tejido que se escogió fue aquella comprendida entre las líneas 7 y 11, corroborando en el tejido seleccionado la presencia de las cicatrices derivadas de la inyección estereotáxica. Tras retirar la corteza cerebral y seleccionar el núcleo estriado, la muestra de tejido se dividió en dos mitades, pudiendo así utilizar el mismo tejido para las dos determinaciones bioquímicas señaladas.

Tras pesar el tejido, se lavó dos veces con PBS y se añadió ácido sulfosalicílico (ASS) al 1% (p/v) o medio de aislamiento (MAM. 320 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4), según se fuera a utilizar para determinar glutatión o la actividad de la GCL, respectivamente. Tanto el ASS como el MAM se utilizaron a razón de 10 µl/mg de tejido. A continuación, el tejido se homogenizó realizando 20 agitaciones a 600 x rpm en un homogeneizador de teflón. Tras centrifugar a 13.000 x g durante 15 min a 4°C, se recogió el sobrenadante para realizar las determinaciones bioquímicas, tal y como se refleja en los correspondientes apartados.

17.6. Estudio de la coordinación motora.

La coordinación motora en ratones se analizó mediante el test de rotarod (L'Episcopo et al., 2010). Para ello se utilizó un aparato de 5 líneas (Modelo 47600. Ugo Basile, Comerio, Italia), que consta de una varilla giratoria con velocidad ascendente sobre la cual se sitúan los ratones (uno por línea) objeto de estudio. En nuestros experimentos, se utilizó una aceleración continua desde 4 hasta 40 rpm, incrementando en 4 rpm la velocidad durante 30 s, hasta alcanzar la velocidad final a los 270 s. Una vez situado el animal en la plataforma, se observó su capacidad para mantenerse sobre ella sin caerse durante los 300 s de duración del test. Así, al caer un ratón desde la plataforma, se accionó un mecanismo que detuvo un cronómetro que marcaba el tiempo de permanencia. Los tiempos de permanencia en la plataforma se anotaron, descartando los valores de aquellos ratones que completaron 3 vueltas agarrados a la varilla y sin andar.

Este estudio se realizó una vez al día, a la misma hora, durante los días 1, 2 y 3 de tratamiento. Previamente, se entrenaron a los animales durante los 2 días previos a la realización de la cirugía estereotáxica, a fin de facilitar la adaptación y eliminar

interferencias en el comportamiento del ratón. Los datos se expresaron como tiempo de permanencia.

18. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó en las muestras solubilizadas con NaOH 0.1 M por el método de Lowry y colaboradores (Lowry et al., 1951), o mediante el sistema comercial BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Illinois, EE.UU.). En ambos casos, se utilizó la albúmina sérica bovina como estándar.

19. Cumplimiento de requisitos éticos en el tratamiento de los animales

Todos los animales utilizados fueron obtenidos del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, de acuerdo con la legislación vigente (RD 1201/2005) y bajo licencia del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIIN). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

20. Análisis estadístico

Todas las determinaciones en células en cultivo fueron realizadas, al menos, en triplicado. Los valores se expresaron como medias \pm S.E.M. (error estándar de la media) en, al menos, tres experimentos independientes. Para los experimentos *in vivo*, se utilizaron de 6 a 8 animales por condición. La significatividad se determinó mediante

Material y métodos

análisis de la varianza seguido del test de la menor diferencia significativa de rango múltiple (para comparaciones múltiples) o el test de la t de Student (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.



Resultados

1. Síntesis de γ GC en la mitocondria

La sobreexpresión de la subunidad catalítica de la GCL (GCL_H) ha demostrado ser suficiente para incrementar la síntesis de γ GC y, con ello, la concentración de GSH celular (Diaz-Hernandez et al., 2005). En este trabajo, nos propusimos dirigir la síntesis de γ GC a la mitocondria, a fin de estudiar sus funciones en ausencia de su ulterior conversión en GSH. Así, diseñamos y construimos un vector plasmídico que permitiese sobreexpresar la GCL en el orgánulo. Para ello, fusionamos la GCL_H con el fragmento de 32 aminoácidos que compone la secuencia de reconocimiento mitocondrial de la ornitina transcarbamilasa (OTC), que es suficiente para internalizar proteínas citosólicas en la mitocondria (Horwich et al., 1985; Schriener et al., 2005). Este epítipo mitocondrial se fusionó en el extremo amino terminal de la GCL_H , originando una nueva construcción a la que hemos denominado *mitoGCL*.

1.1. Localización mitocondrial de *mitoGCL*

La correcta expresión de *mitoGCL* en la mitocondria se comprobó en células HEK293T (**Figura 1**). La transfección con *mitoGCL* mostró a nivel celular un incremento de la expresión de la GCL con respecto al vector vacío. Por otro lado, la abundancia de *mitoGCL* fue similar a GCL_H (en adelante, GCL) sin el epítipo mitocondrial. En concordancia con estudios anteriores en nuestro laboratorio (Diaz-Hernandez et al., 2005), la expresión de la subunidad moduladora de la GCL (GCL_L) no alteró la abundancia de la subunidad catalítica en la célula.

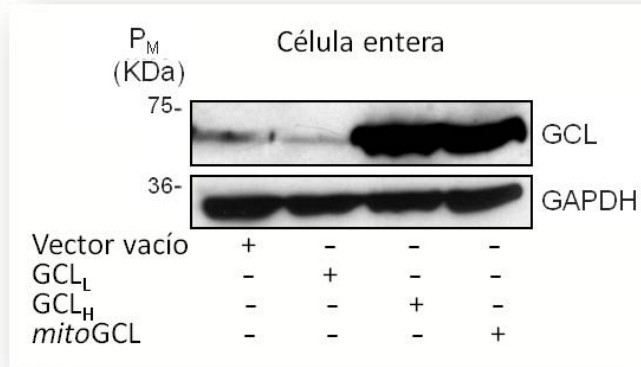


Figura 1. Expresión celular de *mitoGCL*. La expresión de *mitoGCL* se corroboró en células HEK293T, a las 24 h post-transfección. *MitoGCL* incrementó la abundancia de GCL en célula entera, de forma similar a la sobre-expresión de la secuencia de la proteína nativa (GCL). La transfección con el vector vacío o conteniendo la secuencia de la subunidad moduladora (GCL_L) no modificó el patrón de expresión de GCL.

Para estudiar la importación mitocondrial de *mitoGCL*, se estudió su expresión en las fracciones citosólica y mitocondrial en HEK293T. Como se observa en la **figura 2**, *mitoGCL* se localizó en la fracción mitocondrial, mientras que el vector vacío o GCL, no importó la proteína a la mitocondria, quedando restringida al citosol celular.

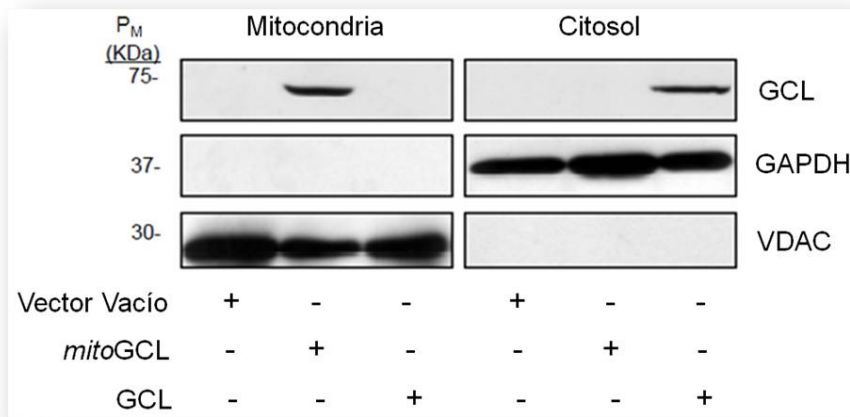


Figura 2. Expresión mitocondrial de *mitoGCL*. Análisis de expresión proteica en extracto citosólico y mitocondrial obtenidos por centrifugación diferencial. La transfección en células HEK293T con *mitoGCL* promueve la expresión de la proteína en la mitocondria, sin afectar a su patrón citosólico. La ausencia de señal mitocondrial, evita la importación de la proteína en el orgánulo.

La localización mitocondrial de *mitoGCL* se confirmó mediante inmunocitoquímica, tras la co-transfección con el vector pMitoDsRed2, que dirige al orgánulo la proteína

roja fluorescente. Las células transfectadas con el vector vacío, o con GCL sin epítipo mitocondrial, mostraron expresión exclusivamente citosólica, ya que no co-localizaron con la proteína roja fluorescente ni con DAPI (**figura 3**). Por el contrario, *mitoGCL* co-localizó con anti-GCL y con MitoDsRed2, lo que confirma la eficacia de *mitoGCL* para dirigir GCL a la mitocondria.

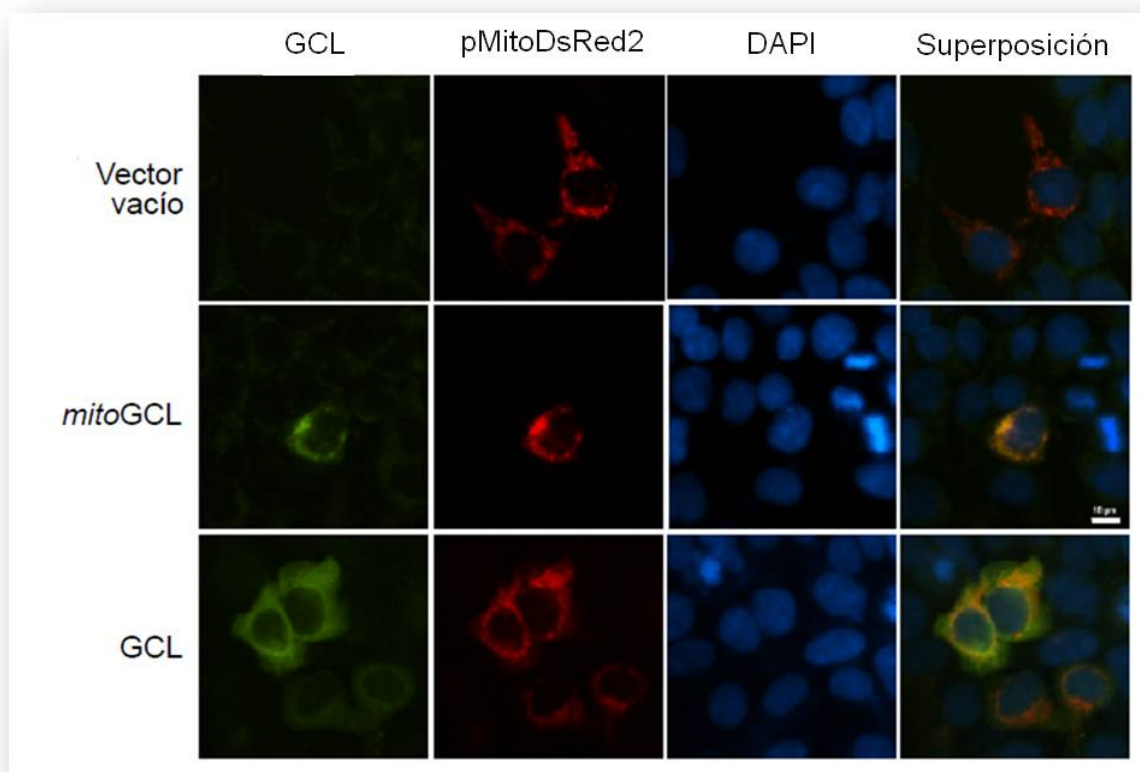


Figura 3. Localización mitocondrial de *mitoGCL*. Inmunocitoquímica que muestra en células HEK293T transfectadas con *mitoGCL*, la co-localización del marcaje contra la GCL y el marcaje mitocondrial derivado de la transfección con el plásmido pMitoDsRed2. La expresión de GCL sin epítipo mitocondrial únicamente incrementa la presencia de la enzima en el citosol. En ningún caso se observó la presencia de GCL en el núcleo celular, marcado con DAPI. Barra de escala = 10 μ m.

1.2. Procesamiento mitocondrial de *mitoGCL*

En el proceso de importación de proteínas a la mitocondria se produce la escisión del epítipo mitocondrial (Neupert and Brunner, 2002; Sztul et al., 1987), lo que da paso a la forma nativa de la proteína (Schriner et al., 2005 Neupert, 2002, 555). Para identificar el

Resultados

posible procesamiento de la *mitoGCL* tras el proceso de internalización, se estudió la expresión de GCL en célula entera y fracción mitocondrial. Como se observa en la **figura 4**, la expresión de GCL en célula entera mostró una banda con una movilidad electroforética propia de una proteína de peso molecular de ~73 KDa, que se corresponde con el peso molecular descrito para la GCL (Yan and Meister, 1990). Sin embargo, la expresión de *mitoGCL* dio lugar a una segunda banda de menor movilidad electroforética, compatible con una forma de mayor peso molecular. Al analizar la expresión de *mitoGCL* en la fracción mitocondrial, se recuperó el patrón de expresión de la proteína nativa. Esto sugiere un procesamiento de la proteína tras su importación en el orgánulo, donde se escinde la secuencia de señalización y se recupera el peso molecular correspondiente a la forma nativa.

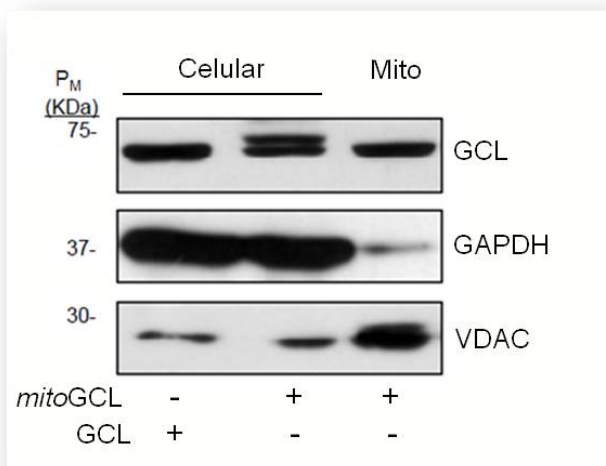


Figura 4. Procesamiento mitocondrial de *mitoGCL*. Análisis proteico por transferencia de western en extractos proteicos de células HEK293T. La adición del epítipo mitocondrial origina una forma fusionada de la proteína (*mitoGCL* en célula entera), de mayor peso molecular que la proteína nativa (GCL). Tras la importación mitocondrial (Mito), la proteína recupera el peso molecular de su forma nativa.

2. Funcionalidad de *mitoGCL*

2.1. MitoGCL promueve la síntesis mitocondrial de γ GC.

Con objeto de dilucidar si *mitoGCL* es capaz de sintetizar γ GC, cuantificamos la actividad de la GCL mediante HPLC con detección electroquímica en mitocondrias aisladas. Para ello, utilizamos la fracción proteica retenida por un filtro de 10 KDa en presencia de acivicina, un inhibidor de la degradación de γ GC por glutatión transpeptidasa (GGT). Además, la especificidad de este método se confirmó por la capacidad de L-BSO (L-butionina sulfoximina) (Griffith, 1999) de inhibir GCL, lo que previno por completo la síntesis de γ GC.

Como se observa en la **figura 5**, en mitocondrias de células control transfectadas con el vector vacío no se detectó actividad GCL, mientras que la expresión de *mitoGCL* indujo la capacidad de las mitocondrias para sintetizar γ GC. Por tanto, tras la importación mitocondrial de *mitoGCL* y posterior procesamiento, la enzima permanece funcional en el orgánulo.

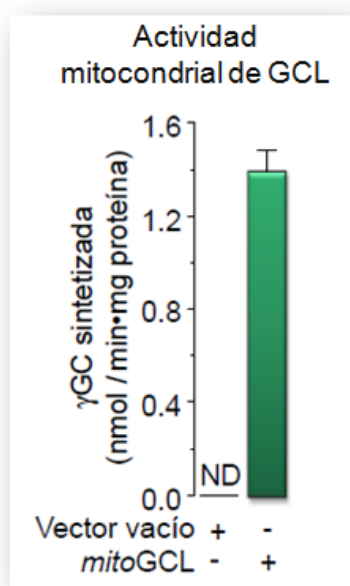


Figura 5. MitoGCL es funcional y aumenta la síntesis mitocondrial de γ GC. La inducción de la síntesis *in vitro* de γ GC en mitocondrias aisladas se realizó en la fracción proteica retenida en un filtro de 10 KDa. Tras incubación 15 min con los sustratos de la reacción, en presencia de acivicina, se cuantificó la γ GC por HPLC con detección electroquímica.

2.2. La síntesis mitocondrial de γ GC no altera la concentración de glutatión.

Ante la eventual posibilidad de que una actividad remanente de *mitoGCL* en el citosol interfiriese en la biosíntesis de GSH, se determinaron las concentraciones de GSH en célula intacta y en las fracciones mitocondrial y citosólica. Como se observa en la **figura 6**, la concentración de GSH en células transfectadas con el vector vacío o con *mitoGCL* fue similar, tanto en mitocondrias aisladas (**figura 6a**) como en citosol (**figura 6b**), sugiriendo que la síntesis de γ GC por *mitoGCL* es exclusivamente mitocondrial y no interfiere con la producción de GSH. En célula entera, las concentraciones de GSH resultaron ser similares entre ambas condiciones (**figura 6c**). En todos los casos, la expresión de GCL aumentó la concentración de GSH en todas las fracciones analizadas.

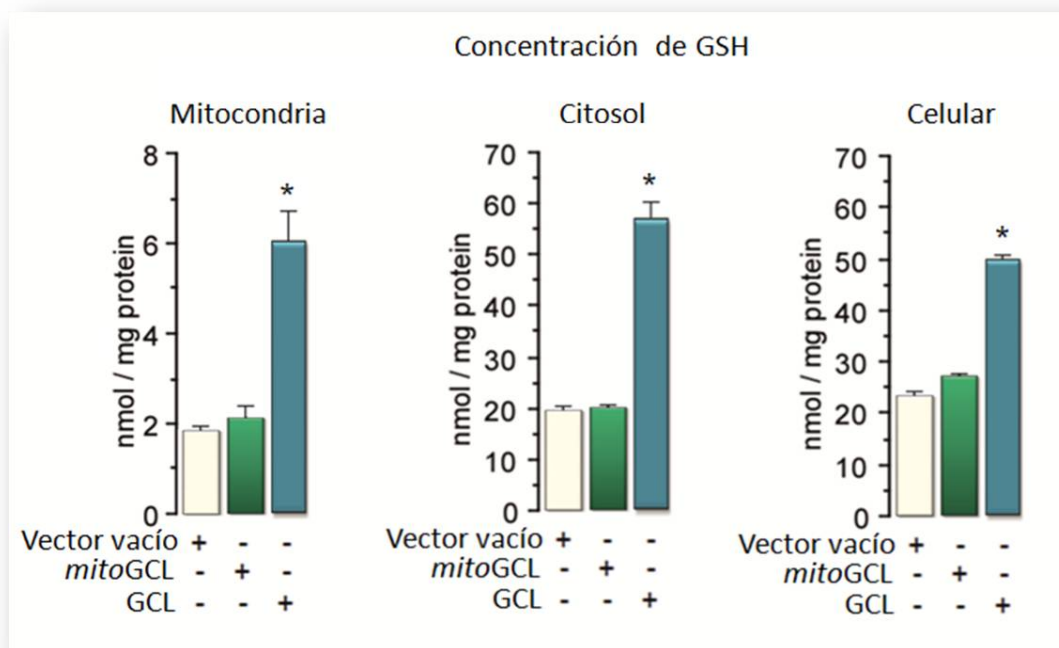


Figura 6. La síntesis mitocondrial de γ GC no modifica la concentración de GSH. Determinación de GSH en las fracciones mitocondrial (a) y citosólica (b) o en célula entera (c) HEK 293T, 24 h después de la transfección con el plásmido vacío (control) o de sobre-expresión de GCL en mitocondria (*mitoGCL*) o en citosol (GCL).

3. Efecto antioxidante de γ GC

3.1. Modulación de la concentración de H_2O_2 por *mitoGCL*.

Con el fin de explorar la posible capacidad de γ GC de modular ROS, en primer lugar se determinó la producción de H_2O_2 por la mitocondria. Mediante análisis fluorimétrico con AmplexRed fue posible detectar H_2O_2 en mitocondrias aisladas, mantenidas en un medio de respiración. Como se aprecia en la **figura 7a**, en presencia de rotenona se produjo un incremento en la producción de H_2O_2 que fue exponencial durante el tiempo de análisis; sin embargo, la producción de H_2O_2 fue mucho más lenta en células que expresaban *mitoGCL*. Así, el cálculo de la pendiente de la producción de H_2O_2 en células transfectadas con *mitoGCL* mostró una reducción del peróxido de un ~40% con respecto al control (**figura 7a**).

Dado que el H_2O_2 difunde a través de las membranas biológicas (Han et al., 2003), su producción mitocondrial podría afectar al resto de la célula. Como se observa en la **figura 7b**, la actividad de *mitoGCL* previno el incremento de H_2O_2 en célula entera inducido por rotenona. Así, se observó un descenso en la producción de H_2O_2 de un ~20%, lo que sugiere que la prevención del incremento en H_2O_2 por *mitoGCL* en la mitocondria es extrapolable a un contexto celular.

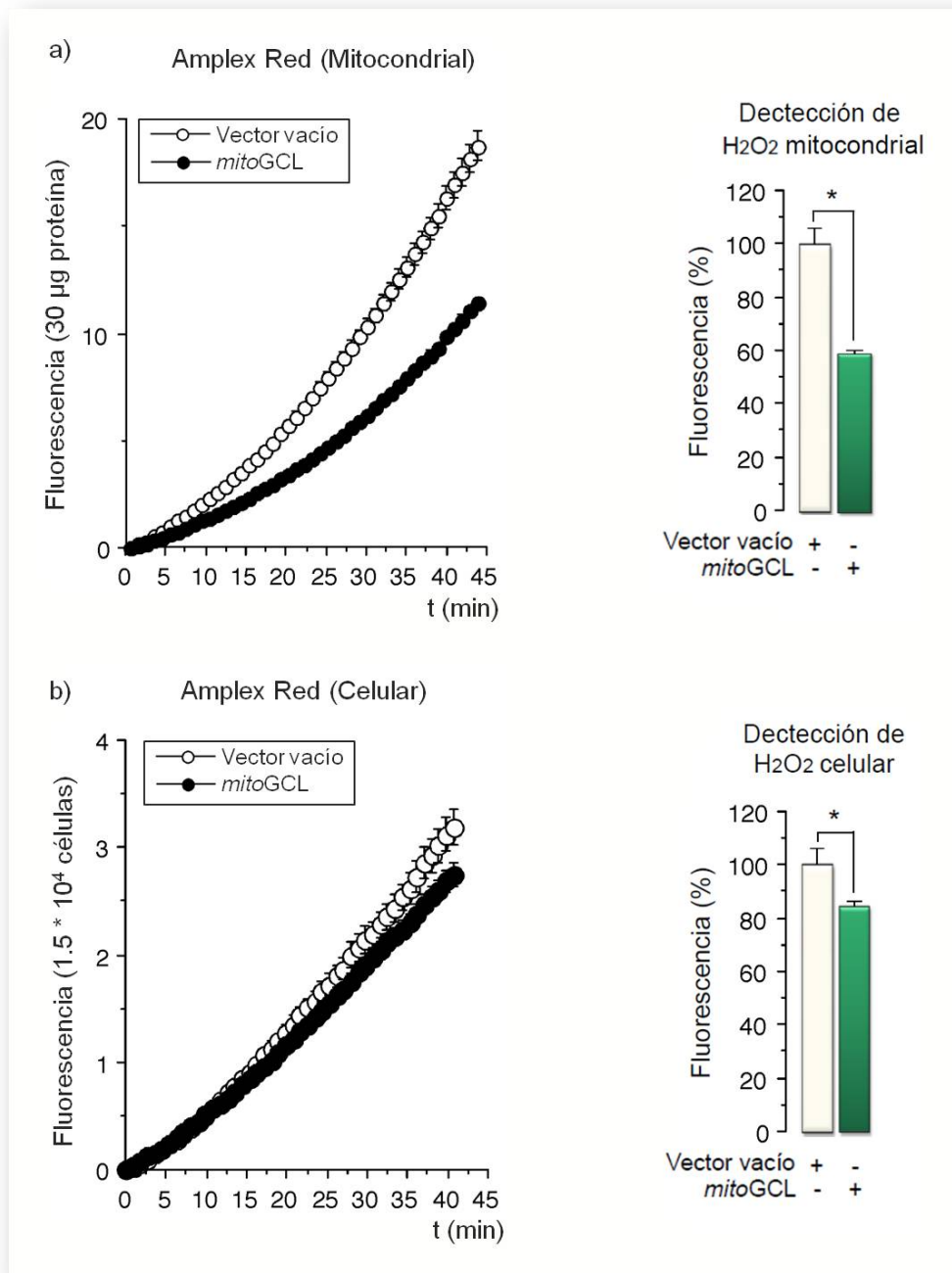


Figura 7. Eliminación de H₂O₂ por mitoGCL en mitocondria y célula entera. Tras la estimulación con rotenona 10 µM, se analizó durante 45 min la producción de H₂O₂ mediante incubación con la sonda AmplexRed y detección fluorimétrica. **a)** Producción de H₂O₂ mitocondrias aisladas e incubadas en medio de respiración mitocondrial. **b)** Determinación de la producción de H₂O₂ en célula entera, incubada en tampón Kreb's-Ringer fosfato. En ambos casos, aparece a la derecha la cuantificación de la pendiente de la curva de producción de H₂O₂. *, p < 0.05 con respecto al respectivo control de transfección con el vector vacío (ANOVA).

Con el propósito de confirmar la capacidad de *mitoGCL* de eliminar H₂O₂ en mitocondria, se transfectaron células HEK293T con el vector pHyPer-dMito, con el cual

es posible visualizar, mediante microscopía, la producción de H_2O_2 en el orgánulo. Tanto en condiciones basales como en presencia de rotenona, la fluorescencia observada en mitocondria fue menor con *mitoGCL* que con vector vacío (**figura 8**). Estos resultados confirman la capacidad de la síntesis mitocondrial de γGC para disminuir H_2O_2 en la mitocondria.

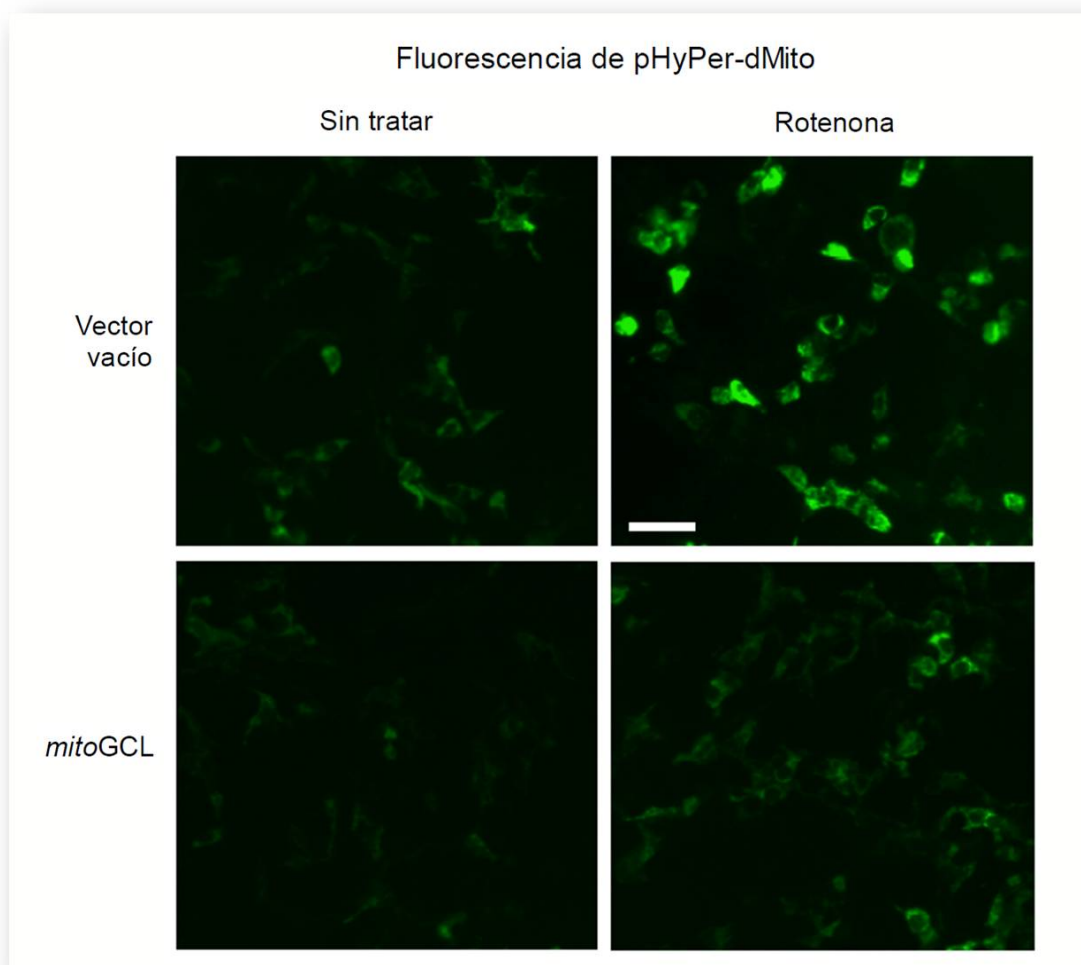


Figura 8. MitoGCL previene la producción de H_2O_2 en la mitocondria. La co-transfección con el vector pHyPer-dMito permitió determinar la producción mitocondrial de H_2O_2 mediante microscopía de epifluorescencia. Para evitar el solapamiento con la GFP del vector pIRES, las transfecciones se realizaron utilizando un vector pcDNA3.1(+). La producción de H_2O_2 se indujo durante 15 min con rotenona 10 μM en células HEK293T, incubadas en tampón Hank's, a 37°C. Barra de escala = 50 μM .

3.2. Modulación de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial.

La sonda MitoSOX permite detectar $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial ya que no se oxida por otras especies reactivas como el H_2O_2 (Robinson et al., 2008; Zielonka and Kalyanaraman, 2010). Así, mediante el marcaje con esta sonda y posterior análisis por citometría de flujo, determinamos $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial en células HEK293T. Mientras que en condiciones basales no se encontraron diferencias significativas, la transfección con *mitoGCL* previno el incremento de $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria, inducido por rotenona (**figura 9**). Estos resultados se reprodujeron al tratar las células con ácido 3-nitropropiónico (3NP), un inhibidor del complejo II mitocondrial (**figura 9**). Estos resultados confirman la capacidad antioxidante de γ GC mitocondrial.

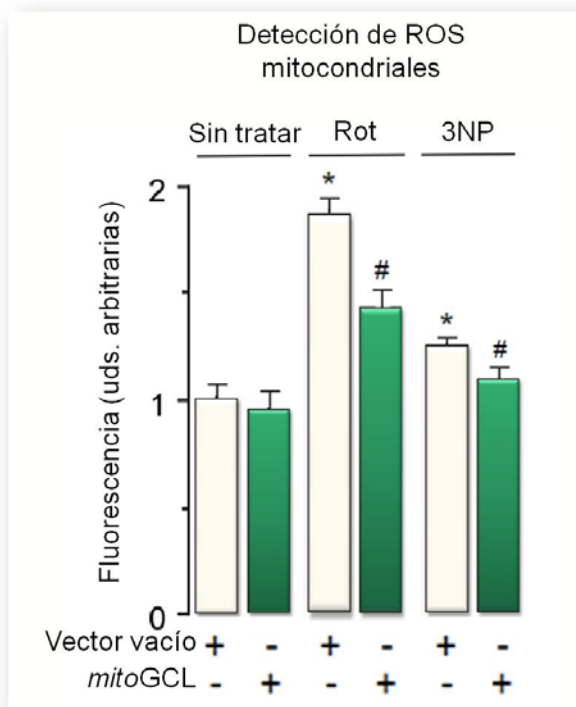


Figura 9. Detección de ROS mitocondriales en HEK293T.

MitoGCL previno los ROS mitocondriales en células se trataron durante 4 h con rotenona (Rot) 1 μ M o durante 2 h con ácido 3-nitropropiónico (3NP) 10 mM, en DMEM sin FCS. Posteriormente se incubaron con MitoSOX 2 μ M en tampón Hank's (30' a 37°C y 5% CO_2) y se cuantificó su fluorescencia por citometría de flujo.

*, $p < 0.05$ con respecto al control sin tratar

#, $p < 0.05$ con respecto al control correspondiente.

4. La actividad antioxidante de *mitoGCL* es debida a la síntesis de γ GC.

La síntesis de γ GC por la GCL reside en la capacidad del centro activo de la enzima para unir los aminoácidos glutamato y cisteína mediante un enlace γ -aminoacídico (Griffith, 1999). Se ha demostrado que la mutación del glutámico en posición 103 (E103A) a alanina, altera el centro activo de la enzima y origina pérdida de funcionalidad (Backos et al., 2010). Con el propósito de investigar si la síntesis mitocondrial de γ GC es la responsable de la actividad antioxidante de *mitoGCL*, se mutó el residuo 103 para crear la versión catalíticamente inactiva de la proteína (*mitoGCL*(E103A)).

Como se observa en la **figura 10**, la mutación introducida no alteró la movilidad electroforética ni la abundancia con respecto a la forma original de *mitoGCL*; sin embargo, anuló la capacidad de *mitoGCL* de sintetizar γ GC en la mitocondria (**Figura 11a**).

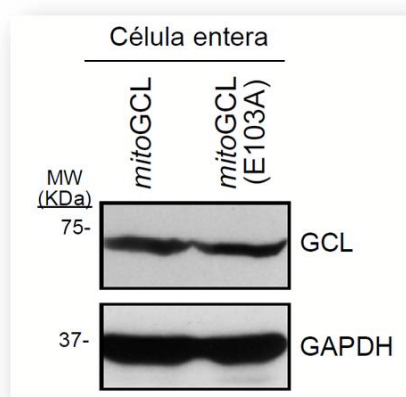


Figura 10. Expresión proteica de *mitoGCL*(E103A). Patrón de expresión proteica de la forma inactiva *mitoGCL*(E103A) en extractos de células HEK293T. Como control positivo, se transfectaron las células con la forma original (wt) de *mitoGCL*.

Por otro lado, *mitoGCL*(E103A) no fue capaz de prevenir los niveles mitocondriales de ROS, determinados con MitoSOX, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con rotenona (**Figura 11b**). Sin embargo, la forma catalíticamente activa de *mitoGCL* disminuyó significativamente la fluorescencia de MitoSOX en la mitocondria de células tratadas con rotenona. Así, la eliminación de la capacidad de *mitoGCL* de sintetizar γ GC suprime su actividad antioxidante.

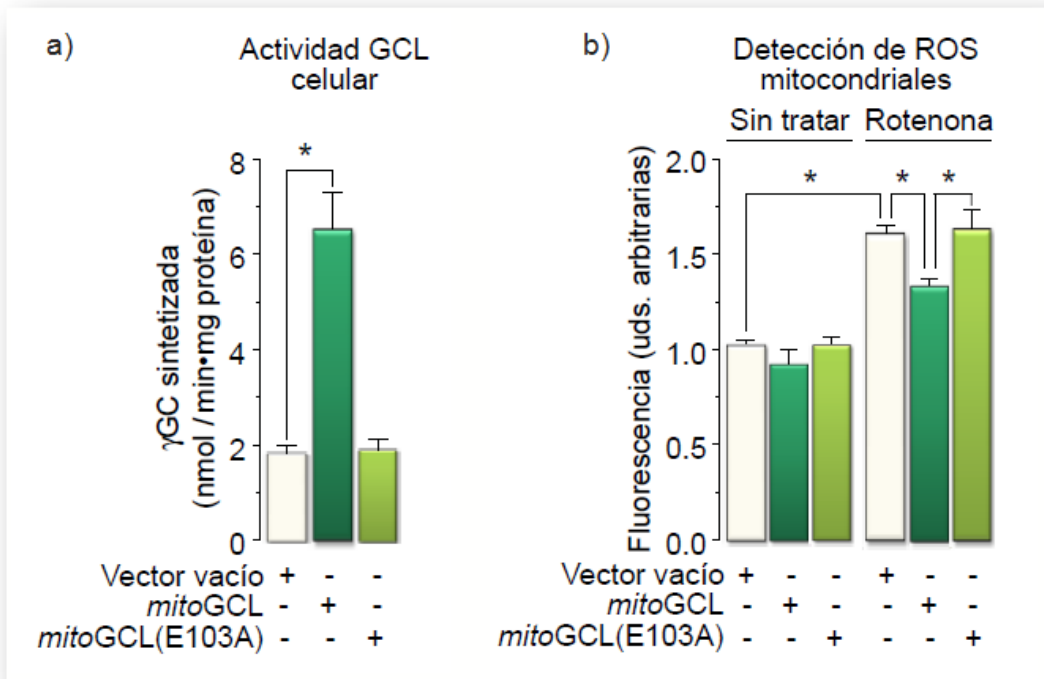


Figura 11. La mutación E103A previene la síntesis de γ GC por *mitoGCL* y su actividad antioxidante. a) Determinación *in vitro* de la actividad GCL de la forma inactiva *mitoGCL(E103A)* en célula entera HEK293T. La γ GC sintetizada durante 15 min se cuantificó por HPLC con detección electroquímica. **b)** Detección de ROS mitocondriales mediante citometría de flujo, tras incubación con MitoSOX 2 μ M. Para la inducción del estrés oxidativo, las células HEK293T se trataron durante 4h con rotenona 1 μ M.

*, $p < 0.05$ (ANOVA)

*, $p < 0.05$ con respecto al respectivo control de transfección con el vector vacío.

5. MitoGCL disminuye los niveles mitocondriales de ROS en ausencia de GCL citosólica.

Dado que la función de *mitoGCL* se ha observado en presencia de niveles fisiológicos de GCL, podría haber la posibilidad de un solapamiento entre la función antioxidante de γ GC y la de GSH endógeno. Por ello, decidimos eliminar la función de GCL sin afectar la de *mitoGCL*, para lo cual diseñamos una forma de *mitoGCL* refractaria a la interferencia por shGCL. Mediante mutagénesis dirigida, se introdujeron mutaciones silenciosas en la secuencia de GCL que es reconocida por el shRNA. La expresión de esta forma mutada de *mitoGCL* (*mitoGCL*(mut)) no indujo cambio alguno en la abundancia de la proteína con respecto a *mitoGCL*, ni se vio afectada por la acción de shGCL (**figura 12a**).

Como se observa en la **figura 12b**, shGCL disminuyó drásticamente la concentración de GSH, independientemente de la presencia de *mitoGCL* silvestre o mutado.

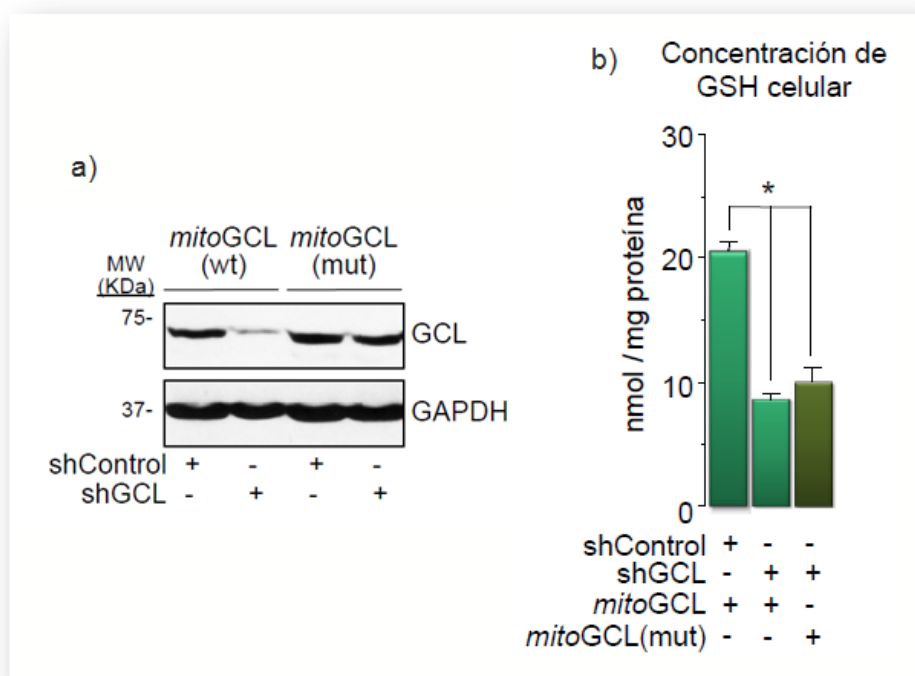


Figura 12. *MitoGCL*(mut) es refractario al silenciamiento de GCL a) La expresión del shRNA contra la GCL (shGCL) o contra la luciferasa (shControl) se realizó mediante la transfección con un vector pSUPER-NeoGFP. Tres días después de la transfección en células HEK293T, se analizó la expresión de la GCL por transferencia de western en células que expresaron la forma original de *mitoGCL* (wt) o refractaria (mut) al shGCL (24 h post-transfección). b) Determinación de la concentración de GSH celular en células HEK293T, analizada después de tres días de silenciamiento y 24 h post-transfección con los plásmidos de sobre-expresión.

*, $p < 0.05$ con respecto a control (ANOVA)

Tal y como era de esperar, el silenciamiento de GCL endógena y consecuente disminución de GSH incrementó los ROS mitocondriales inducidos por rotenona (**figura 13**). Este incremento de ROS se previno por *mitoGCL(mut)*, lo que sugiere que la síntesis mitocondrial de γ GC es suficiente para reducir ROS, a niveles presentes en células control, incluso en ausencia (o disminución) de síntesis citosólica de GSH (**figura 12b**).

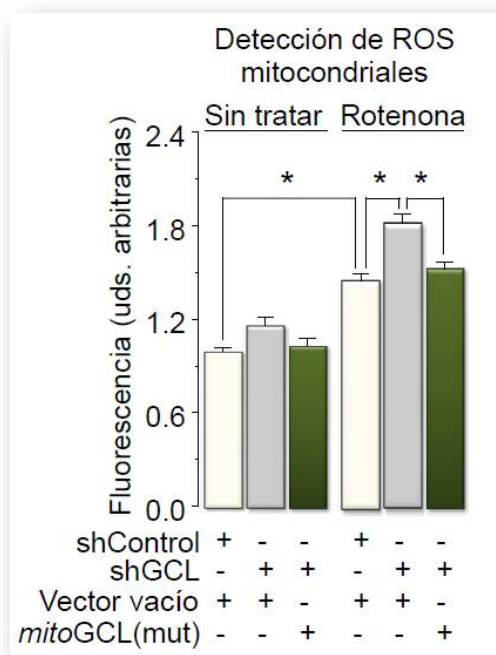


Figura 13. Modulación de ROS mitocondriales por *mitoGCL* tras el silenciamiento de la GCL endógena.

Mediante marcaje de células HEK293T con la sonda MitoSOX, se determinaron los niveles de ROS mitocondriales, después de 3 días de expresión de shRNA contra luciferasa (shControl) o GCL (shGCL) y tras 24 h de la transfección con los plásmidos de sobreexpresión.

*, $p < 0.05$ con respecto al correspondiente control (ANOVA).

6. Mecanismo de acción de la actividad antioxidante de γ GC.

6.1. Efecto del silenciamiento de enzimas antioxidantes.

El mecanismo por el cual γ GC elimina ROS en la mitocondria podría ser, en principio, por reacción directa con H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$, comportándose así como un atrapador o “scavenger”, tal y como se ha sugerido que puede hacer ocasionalmente GSH (Ross et al., 1985; Wefers and Sies, 1983; Winterbourn and Metodiewa, 1994). Sin embargo, también cabría la posibilidad de que, por semejanza estructural con GSH, el efecto antioxidante de γ GC esté mediado por alguno(s) de los sistemas enzimáticos que utilizan GSH como cofactor. Con objeto de dilucidar el mecanismo de acción de la γ GC, contemplamos ambas opciones.

Mediante RNA de interferencia conseguimos silenciar GSS, tal y como se muestra en la **figura 14**. Este efecto aumentó significativamente la concentración de γ GC a la vez que disminuyó la de GSH (**tabla 1**). En las condiciones de estudio analizadas no fue posible detectar la forma oxidada de γ GC en células HEK293T.

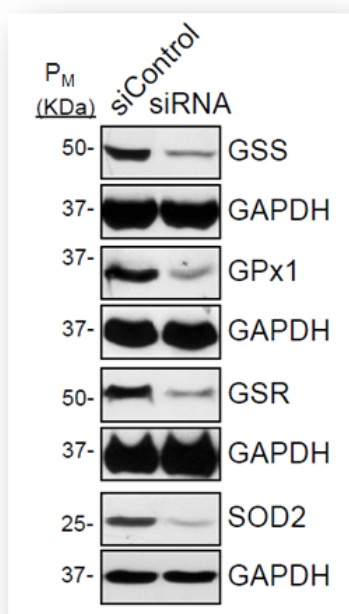


Figura 14. Silenciamiento enzimático por siRNA. Análisis de la eficiencia de silenciamiento proteico en HEK293T, después de tres días de transfección con siRNA 100 nM, contra la glutatión sintetasa (GSS), glutatión peroxidasa 1 (GPx1), glutatión reductasa (GSR) y superóxido dismutasa 2 (SOD2). El siControl es un siRNA diseñado contra la luciferasa. Como control de carga se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Concentraciones de GSH y γ GC oxidada y reducida			
	γ GC reducida (nmol/mg proteína)	γ GC oxidada (nmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)
siControl	0.32±0.01	ND	23.5±0.8
siGSS	0.37±0.02*	ND	13.3±1.3*
siGSS+mitoGCL	0.41±0.02*	ND	13.9±0.2*

Tabla 1. Cuantificación de GSH y las formas oxidada y reducida de γ GC tras silenciamiento de GSS. Concentración de γ GC en células HEK293T que sobre-expresaron *mitoGCL*, analizada por ULPC-MS/MS a los 3 días del silenciamiento de la glutatión sintetasa (siGSS), mediante transfección con siRNA 100 nM. En las condiciones analizadas, no se detectó la forma oxidada de γ GC.

*, $p < 0.05$ con respecto a la transfección con siRNA contra la luciferasa (siControl). ND: No detectable. Los resultados se expresan como la media±SEM (N=8-10).

Sorprendentemente, la interferencia de GSS abolió por completo el incremento de ROS inducido por rotenona, tanto en presencia como en ausencia de *mitoGCL* (**Figura 15**). Este efecto no solo confirma la capacidad antioxidante de γ GC sino que sugiere que GSH es prescindible, al menos en parte, para el mantenimiento del estado redox mitocondrial.

De las isoformas existentes de glutatión peroxidasa (GPx1-4), GPx1 es la que presenta mayor especificidad y capacidad para reducir el H_2O_2 en la mitocondria (Toppo et al., 2009; Yant et al., 2003). Así, procedimos a estudiar su papel en la eliminación de H_2O_2 por γ GC mitocondrial. Una vez corroborada la capacidad y especificidad del siRNA para silenciar GPx1 (**Figura 14**), analizamos los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondriales. Tal y como se muestra en la **Figura 15**, el silenciamiento de GPx1 incrementó significativamente la concentración de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, incluso en células transfectadas con *mitoGCL*.

Por otro lado, el silenciamiento simultáneo de GPx1 y GSS no incrementó más la concentración de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (**Figura 15**). Estos resultados sugieren que GPx1 es imprescindible para la eliminación de ROS por γ GC.

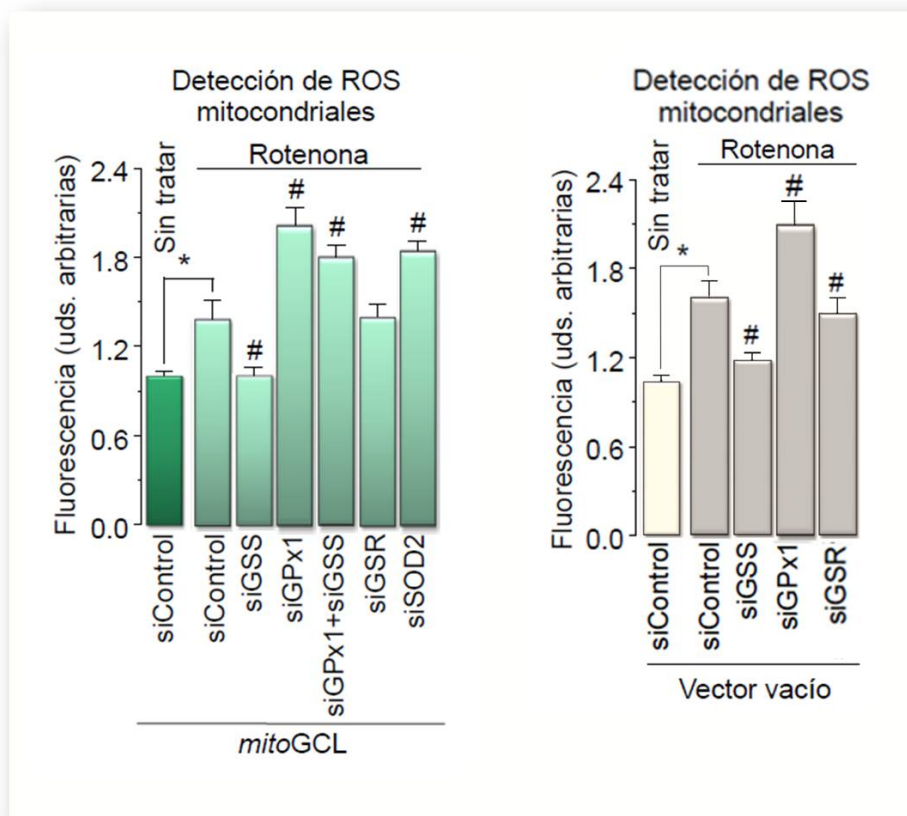


Figura 15. Sistemas enzimáticos implicados en la detoxificación de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial por γ GC. La determinación de la producción de ROS mitocondriales se realizó en células HEK293T, en estado basal o tras el tratamiento con rotenona $1 \mu\text{M}$ durante 4 h, en medio DMEM sin FCS. Para el silenciamiento enzimático, las células se mantuvieron 3 días tras la transfección con 100 nM de siRNA contra la luciferasa (siControl), glutatión sintetasa (siGSS), glutatión peroxidasa (siGPx1), glutatión reductasa (siGSR) y superóxido dismutasa 2 (siSOD2). La fluorescencia de MitoSOX se analizó por citometría de flujo, tras el tratamiento con rotenona y transcurridas 24 h de la transfección con el vector vacío o de expresión de *mitoGCL*.

*, $p < 0.05$ con respecto a la transfección con siRNA contra la luciferasa (siControl) en estado basal (ANOVA).

#, $p < 0.05$ relativo al valor del siControl tratado con rotenona (ANOVA).

El GSH oxidado (GSSG), por acción de GPx1, es reducido por la glutatión reductasa (GSR) (Mari et al., 2009), un proceso de gran importancia en la mitocondria, ya que carece de biosíntesis *de novo* de GSH (Mari et al., 2009; Olafsdottir and Reed, 1988). En nuestras condiciones de estudio no detectamos γ GC oxidada que, teóricamente, podría resultar de su utilización por GPx1, a juzgar por UPLC-MS/MS en células HEK293T (**tabla 1**). No obstante, nos propusimos analizar el efecto del silenciamiento de GSR (**figura 14**) sobre ROS mitocondriales. Como se observa en la **figura 15**, el silenciamiento de GSR no incrementó la producción de $O_2^{\cdot-}$ por la mitocondria en

Resultados

células control ni en las transfectadas con *mitoGCL*. Estos resultados sugieren que GSR no participa en el mecanismo de acción antioxidante de la γ GC mitocondrial.

Con objeto de evaluar la posible capacidad de γ GC de eliminar directamente $O_2^{\bullet-}$, silenciamos SOD2 (**Figura 14**), a fin de evitar la conversión $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Como se muestra en la **figura 15**, este efecto incrementó $O_2^{\bullet-}$ en la mitocondria, tanto en células control como en transfectadas con *mitoGCL*. Estos resultados sugieren que para la eliminación de ROS por γ GC es necesaria la conversión de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y su posterior eliminación mediante GPx1.

6.2. Efecto de γ GC sobre la estabilidad de H_2O_2 *in vitro*.

A la vista de que los resultados anteriores sugieren la participación de GPx1 en el proceso de eliminación de ROS mitocondriales por γ GC, la actividad antioxidante de γ GC parece basada en su capacidad de eliminar H_2O_2 . Con objeto de explorar específicamente esta hipótesis, analizamos el efecto de γ GC sobre la estabilidad de H_2O_2 *in vitro*, en presencia y en ausencia de GPx1. Como control positivo estudiamos el efecto de GSH.

Tanto γ GC (**figura 16a**) como GSH (**figura 16b**), fueron incapaces de eliminar H_2O_2 en ausencia de GPx1. Sin embargo, la presencia de GPx1 eliminó H_2O_2 de manera similar y dependiente de las concentraciones de γ GC y GSH (**figura 16a,b**).

En un contexto celular, la eliminación de H_2O_2 por GPx1 y GSH es seguida de la actividad de la GSR, que cataliza la reducción del GSSG formado tras la eliminación de H_2O_2 (Kelner and Montoya, 2000; Rahman et al., 1999). Así, estudiamos el posible efecto de GSR sobre la capacidad de γ GC de eliminar H_2O_2 en presencia de GPx1. Como se muestra en la **figura 16c**, la presencia de GSR no afectó la estabilidad de H_2O_2 a 200 μ M de γ GC, mientras que sí lo hizo a 200 μ M de GSH (**figura 16d**). Así, la presencia de GSR no mejora la eliminación de H_2O_2 mediada por GPx1 cuando utiliza γ GC como cofactor.

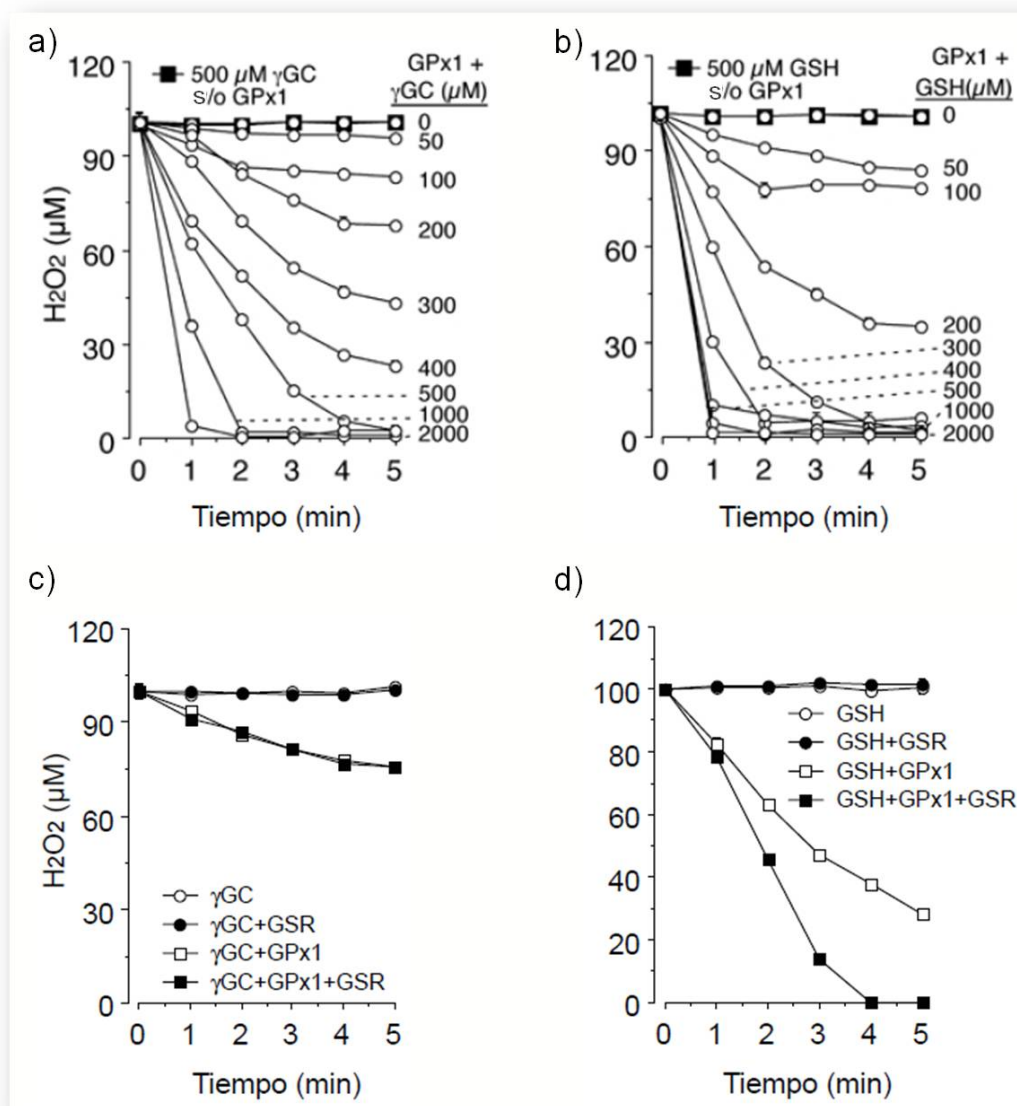


Figura 16. La γGC reacciona *in vitro* con H_2O_2 por mediación de la GPx1 y no es reducida por GSR. La capacidad antioxidante de la γGC se confirmó *in vitro* mediante el estudio de su reactividad con H_2O_2 100 μM . Para ello, se utilizaron concentraciones de γGC (a) o de GSH (b) entre 0 y 2 mM, en presencia de 0.5 U/mL de GPx1 purificada. Para el estudio de la reactividad en presencia de 0.5 U/mL de GPx1 y/o GSR, se realizó a una concentración de γGC (c) o de GSH (d) de 200 μM , manteniendo la concentración de H_2O_2 100 μM . En ausencia de sustratos o de enzimas, el H_2O_2 se mantuvo invariable durante los 5 min del ensayo.

7. Modulación del estado redox de GSH por γ GC.

La oxidación de GSH a GSSG depende de la producción de ROS, de modo que la concentración de GSSG se considera un marcador del estado redox celular [Schafer FQ, 2001, 1191; Jones, 2002, 1974]. Como se observa en la **figura 17**, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de GSH y GSSG en células transfectadas con el vector vacío o con *mitoGCL*. Sin embargo, tras el tratamiento con rotenona se produjo un descenso significativo de GSH en células control, que coincidió con un incremento de GSSG (**Figura 17b**). Por el contrario, las concentraciones de GSH y GSSG se mantuvieron inalteradas en todo momento en presencia de *mitoGCL*. Estos resultados sugieren que γ GC modula el estado redox de GSH.

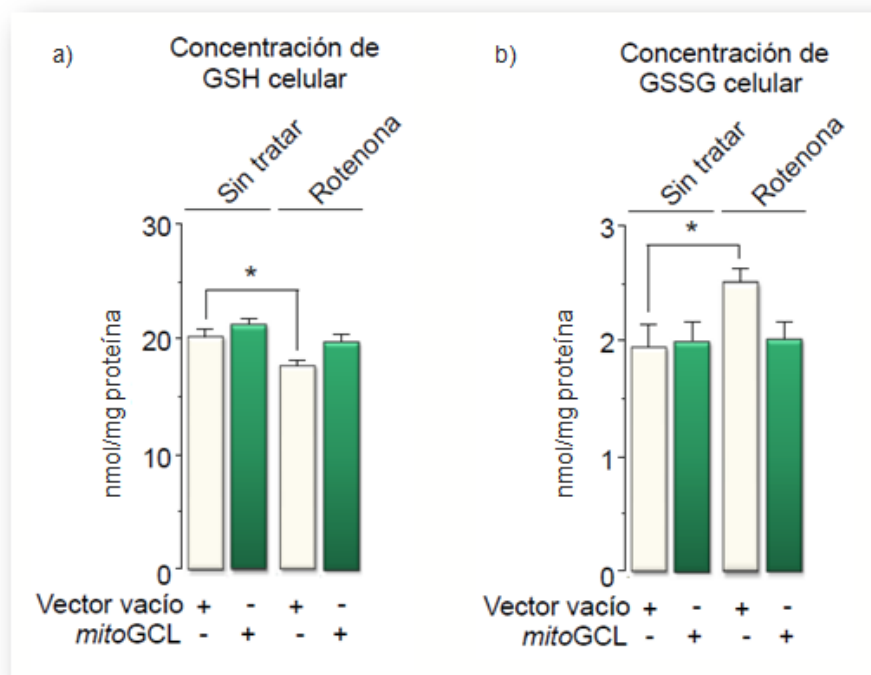


Figura 17. La γ GC mitocondrial previene la oxidación de GSH. Cuantificación de GSH (a) y GSSG (b) en extractos de células HEK293T. *MitoGCL* previno la oxidación de GSH promovida mediante la incubación de las células con rotenona 1 μ M durante 4 h.

*, $p < 0.05$ con respecto al control sin tratar

8. Modulación redox de tioles proteicos por γ GC.

El GSH modula proteínas post-traduccionamente mediante glutationilación (Franco and Cidlowski, 2009; Garcia et al., 2010; Holmgren et al., 2005). En esta función, el residuo sulfhidrilo de la cisteína del GSH desempeña un papel esencial, al ser el mediador de la unión con los residuos proteicos susceptibles de glutationilación. A tenor de su semejanza estructural con GSH, especialmente por la conservación del grupo sulfhidrilo, nos propusimos estudiar la posible modificación de proteínas por γ GC. Para ello, se analizaron por UPLC-MS/MS las concentraciones de γ GC unido a proteínas, tal y como se muestra en la **Tabla 2**. En las condiciones de estudio, no se detectó la presencia de γ GC unida a proteínas, tanto en células control como en aquellas transfectadas con *mitoGCL*. Por el contrario, se comprobó la modificación de proteínas por GSH, la cual no se vio modulada por la expresión de *mitoGCL*. Así, γ GC no parece ser capaz de unirse a proteínas, tal y como lo hace GSH.

Modificación redox de tioles por γGC y GSH		
	Por γGC	Por GSH (pmol/mg proteína)
Vector vacío	ND	5.69±0.56
<i>mitoGCL</i>	ND	5.03±0.36

Tabla 2. Modificaciones redox en tioles proteicos por γ GC o GSH. Mediante análisis por UPLC-MS/MS se determinó la unión de γ GC o GSH a proteínas, en extractos de células HEK293T. La presencia de γ GC unida a proteínas no se detectó (ND) en las condiciones de estudio.

9. Eliminación de ROS por γ GC mitocondrial en neuronas.

Debido a su alta dependencia del metabolismo mitocondrial (Mattson et al., 2008; Schapira, 2002) las neuronas son particularmente susceptibles al estrés oxidativo (Diaz-Hernandez et al., 2005; Dringen and Hirrlinger, 2003; Herrero-Mendez et al., 2009). Por ello, a continuación nos propusimos investigar el posible efecto beneficioso de la síntesis mitocondrial de γ GC en neuronas.

9.1 Efecto de inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial.

Con objeto de corroborar la actividad antioxidante de γ GC en neuronas, utilizamos rotenona, antimicina A y ácido 3-nitropropiónico (3NP), compuestos que producen un incremento de ROS mitocondriales por inhibición de los complejos I, II y III, respectivamente (Calkins et al., 2005; Murphy, 2009).

Como se observa en la **figura 18**, *mitoGCL* promovió un descenso significativo de $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria, en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Es más, este descenso fue aún mayor en presencia de los mencionados inhibidores, y se previno completamente en células que expresaban *mitoGCL*. Estos resultados demuestran la eficacia de *mitoGCL* como sistema antioxidante en neuronas.

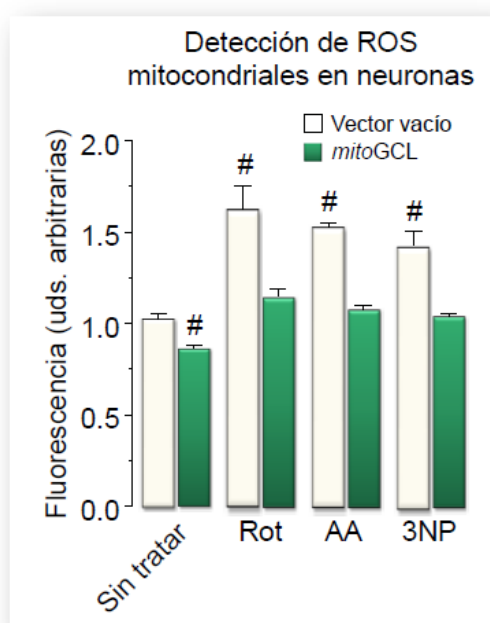


Figura 18. Disminución de ROS mitocondriales en neuronas por *mitoGCL*.

En cultivos primarios neuronales se determinaron los ROS mitocondriales, mediante marcaje con la sonda Mito-SOX y posterior análisis citométrico. La inducción del estrés oxidativo se efectuó con rotenona 10 μ M, antimicina A 10 μ M o 3NP 2mM durante 15 minutos a T^a ambiente en tampón Hank's.

#, $p < 0.05$ con respecto a las células transfectadas con el vector vacío y sin tratamiento.

9.2. Modelo de excitotoxicidad.

La excitotoxicidad, o muerte neuronal por sobreactivación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), está implicada en las enfermedades neurodegenerativas. En este proceso se produce un incremento de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial y la subsiguiente despolarización de la membrana interna mitocondrial, con producción de ROS (Krantic et al., 2005). En este trabajo, nos propusimos estudiar si *mitoGCL* es capaz de prevenir dicha producción de ROS en neuronas en cultivo primario. Como se observa en la **figura 19**, tras inducir un estímulo excitotóxico con glutamato, se apreció un claro incremento en la fluorescencia derivada de la oxidación de MitoSOX en neuronas transfectadas con el vector vacío. Las neuronas que expresaban *mitoGCL* (GFP^+) mostraron menor oxidación de la sonda tras el estímulo glutamatérgico, siendo su fluorescencia similar a la observada en el estado basal. Las neuronas adyacentes (no transfectadas) o aquellas que incorporaron el vector vacío, mostraron una mayor producción mitocondrial de $\text{O}_2^{\bullet-}$, tanto en estado basal como tras la estimulación con glutamato.

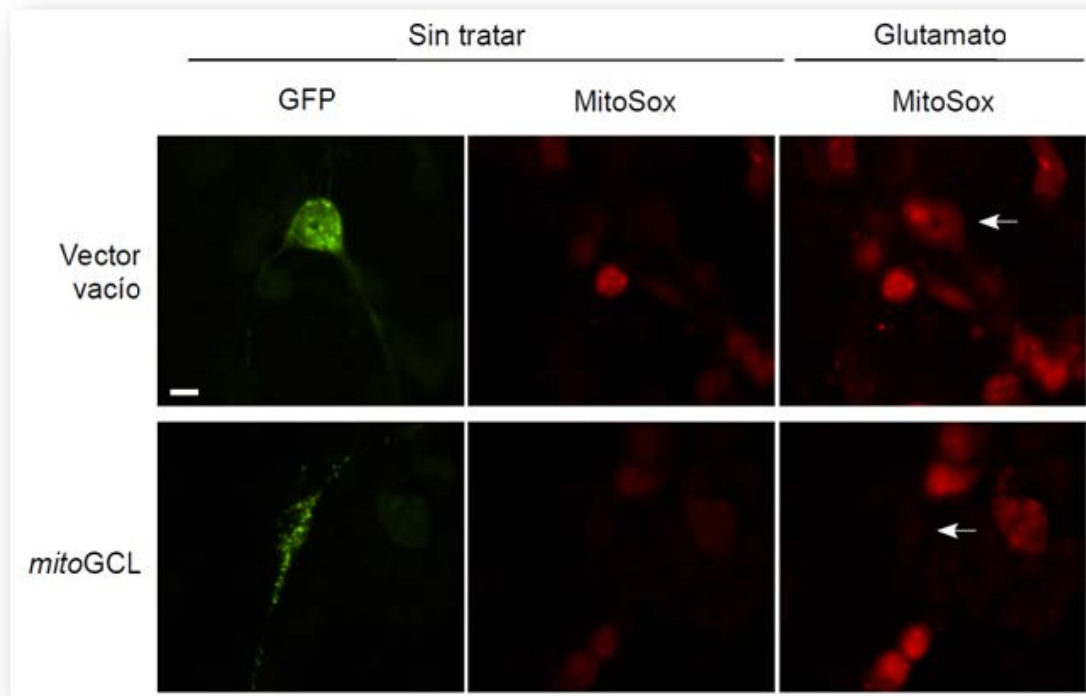


Figura 19. MitoGCL detoxifica ROS en neuronas tras excitotoxicidad glutamatérgica. Determinación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mitocondrial tras estímulo agudo con glutamato $40 \mu\text{M}$ (15 min) en tampón Hank's suplementado con glicina $10 \mu\text{M}$. El cambio de fluorescencia de MitoSOX se analizó mediante microscopía de epifluorescencia. Las flechas señalan las células transfectadas con las construcciones plasmídicas.

Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

Con el propósito de corroborar estos resultado, se determinó mediante citometría de flujo el efecto de *mitoGCL* en la prevención del estrés oxidativo mitocondrial inducido por glutamato. En estos experimentos, la producción de ROS se cuantificó transcurridas 24 h del estímulo excitotóxico. Como se observa en la **figura 20a**, el tratamiento con glutamato incrementó la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial en las neuronas transfectadas con el vector vacío, efecto que se abolió completamente al expresar *mitoGCL*. La prevención del incremento en $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial tras el estímulo glutamatérgico corrobora los resultados observados con los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que confirma la alta eficacia de *mitoGCL* como sistema antioxidante en neuronas.

9.3. GPx1 es necesaria para el efecto antioxidante de γ GC en neuronas.

Con objeto de confirmar que γ GC es necesaria para la acción antioxidante de *mitoGCL* en el modelo de excitotoxicidad, estudiamos el efecto de la forma inactiva *mitoGCL*(E103A). Como se observa en la **figura 20b**, la transfección con *mitoGCL*(E103A) no fue capaz de disminuir la concentración de ROS en la mitocondria promovida por glutamato.

Para corroborar si la acción antioxidante de γ GC dependía de GPx1, utilizamos la misma estrategia de silenciamiento que fue abordada en el apartado 6.1. Tal y como muestra la **figura 20c**, el silenciamiento de GPx1 previno el efecto de *mitoGCL*; por su parte, el silenciamiento de GSS y GSR no promovió un incremento de ROS mitocondrial, sugiriendo que estas proteínas no intervienen en la eliminación de ROS por γ GC. Estos resultados confirman que γ GC ejerce su acción antioxidante en neuronas actuando como cofactor de la GPx1.

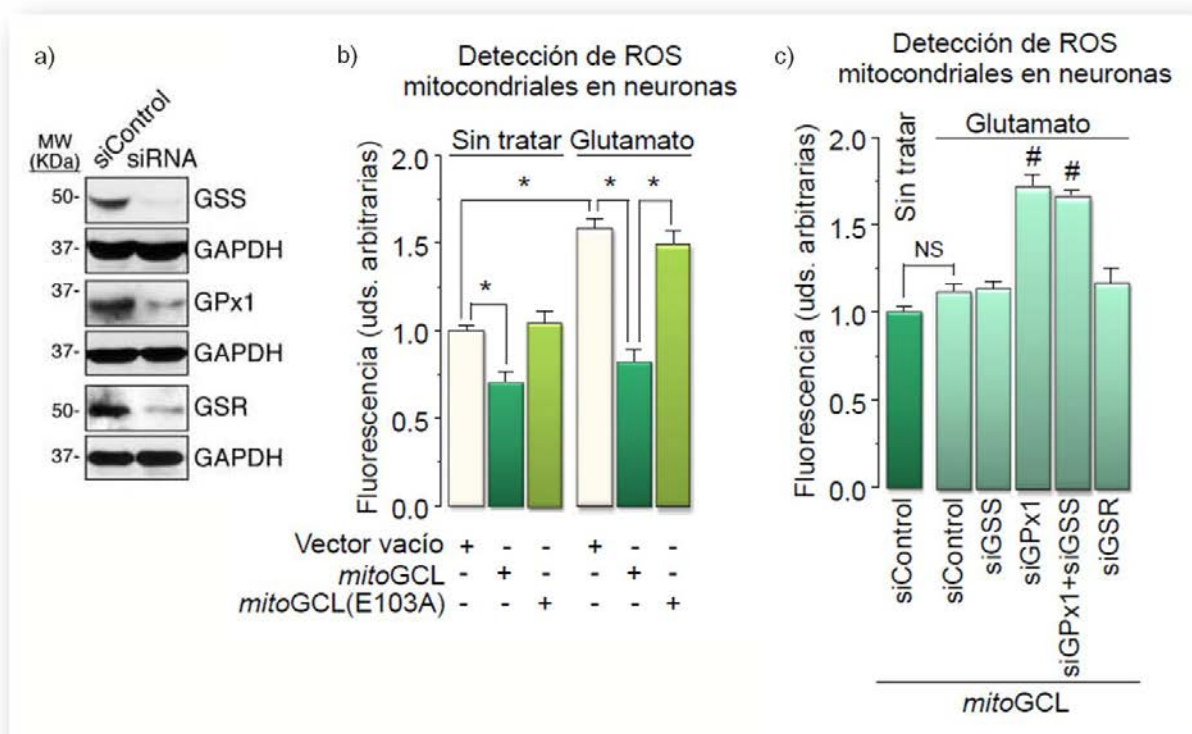


Figura 20. MitoGCL detoxifica ROS a través de GPx1. a) La versión wt, pero no la catalíticamente inactiva de *mitoGCL* (*mitoGCL*(E103A)) previno la formación de $O_2^{\cdot-}$, cuantificado mediante marcaje con MitoSOX b) Determinación de $O_2^{\cdot-}$ tras el silenciamiento de glutatión sintetasa (siGSS), glutatión peroxidasa 1 (siGPx1) o glutatión reductasa (siGSS). El siControl lo representa la transfección con siRNA contra la luciferasa. En todos los casos, el análisis de la producción de ROS se realizó 24 h después de estímulo excitotóxico con glutamato 100 μ M durante 5 min en presencia de glicina 10 μ M.

*, $p < 0.05$ (ANOVA); #, $p < 0.05$ con respecto a las células transfectadas con el vector vacío y no tratadas con glutamato.

10. Acción neuroprotectora de γ GC en cultivo.

Dada la relevancia del glutatión como neuroprotector (Bolaños et al., 1996; Diaz-Hernandez et al., 2005; Dringen and Hirrlinger, 2003), a continuación nos propusimos investigar si el efecto antioxidante de γ GC tiene impacto sobre la supervivencia celular. Como se observa en la **figura 21**, la incubación de las neuronas en cultivo primario con glutamato promovió un aumento de la muerte apoptótica en neuronas transfectadas con el vector vacío, que se previno de forma significativa con *mitoGCL*.

Con objeto de dilucidar si la neuroprotección por *mitoGCL* se debe a la actividad antioxidante de γ GC en la mitocondria, nos propusimos estudiar la activación de la caspasa 3 en neuronas primarias tras el estímulo glutamatérgico. Como se observa en la **Figura 21b**, el tratamiento con glutamato incrementó la abundancia de la caspasa 3 activa, lo que demuestra la participación de la vía intrínseca en la apoptosis promovida por el neurotransmisor. La transfección con *mitoGCL* disminuyó significativamente la activación de la caspasa 3 en estas condiciones, lo que sugiere que la síntesis mitocondrial de γ GC actúa previniendo la vía intrínseca apoptótica.

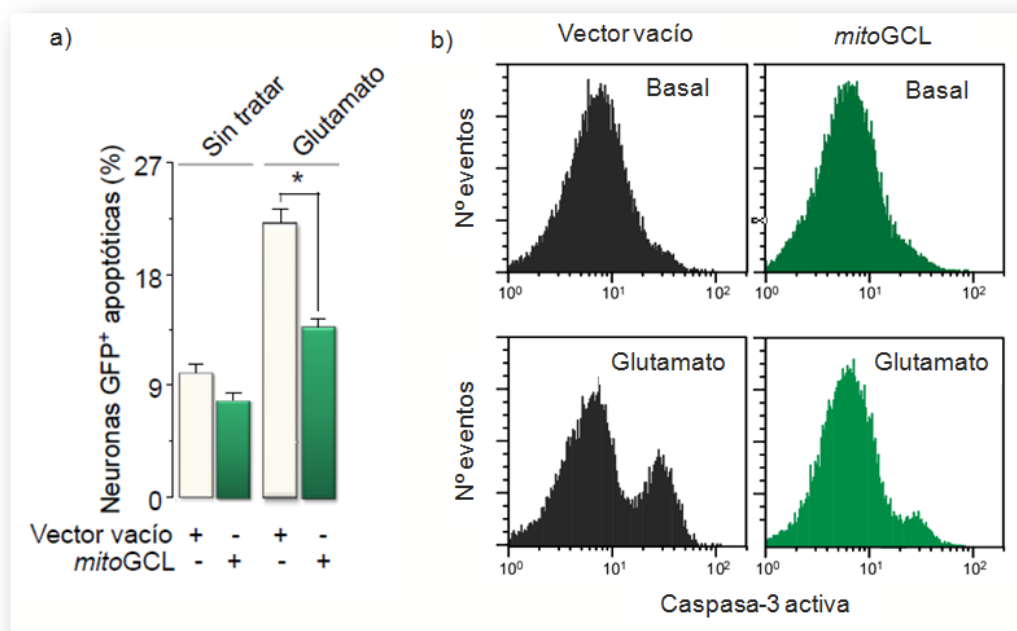


Figura 21. Prevención de la apoptosis neuronal por γ GC. **a)** Cuantificación de la apoptosis neuronal por citometría de flujo, transcurridas 24 h de la estimulación con glutamato 100 μ M (5 min en presencia de glicina 10 μ M). Se consideraron apoptóticas las células positivas para el marcaje con Anexina V-APC y negativas para 7-AAD. **b)** El marcaje con un anticuerpo contra la caspasa-3 activa permitió la determinación de la apoptosis intrínseca por citometría de flujo, transcurridas 24 h del estímulo glutamatérgico. *, $p < 0.05$ (ANOVA).

Por último, estudiamos la participación del receptor NMDA en el incremento del estrés oxidativo mitocondrial y la apoptosis inducidas por glutamato. Para ello, utilizamos MK801, un antagonista específico del receptor NMDA. Así, la preincubación con MK801 abolió el incremento de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial (**figura 22a**), la apoptosis neuronal (**figura 22b**) y el aumento de la caspasa 3 activa (**figura 22c**) producidos por glutamato, lo que confirma la mediación del receptor NMDA en estos procesos.

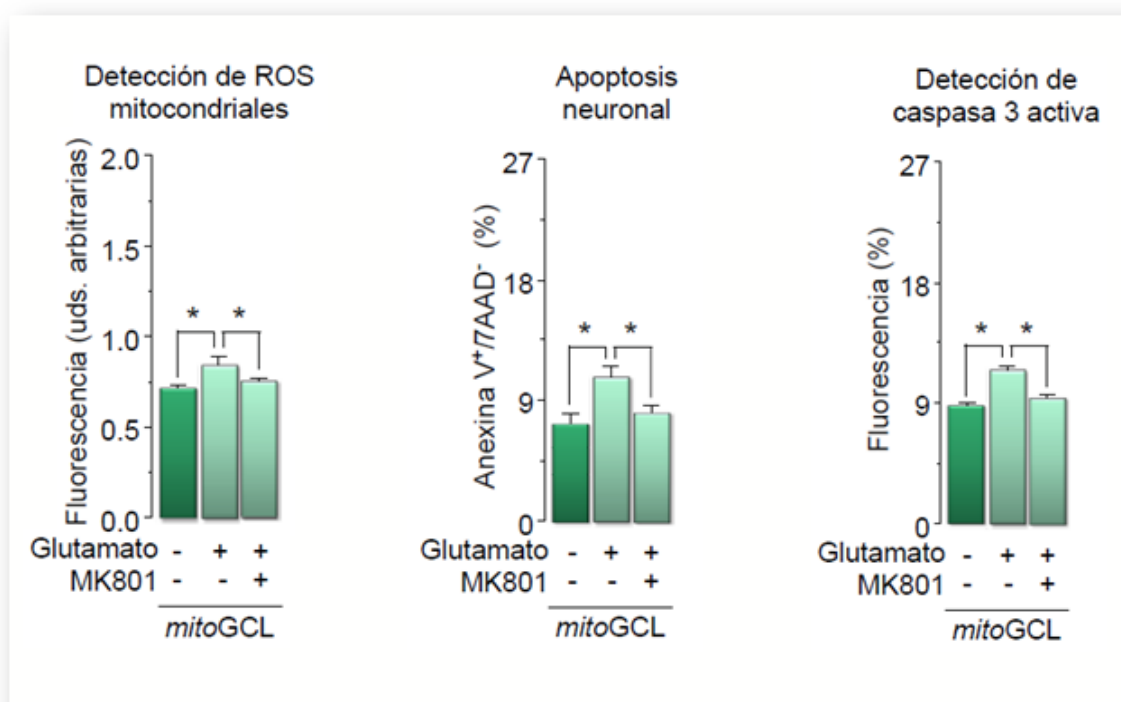


Figura 22. Mediación del receptor NMDA en la excitotoxicidad glutamatérgica. La inhibición farmacológica del receptor NMDA se realizó mediante la incubación con MK801 10 μ M durante los 5 min previos a la estimulación con glutamato 100 μ M (5 min) en presencia de glicina 10 μ M. **a)** Detección de ROS mitocondriales mediante marcaje con MitoSOX. **b)** Apoptosis neuronal, cuantificada como células Anexina⁺/7AAD⁻. **c)** Células positivas para el marcaje con un anticuerpo contra la forma activa de la caspasa 3.

*, $p < 0.05$ en comparación con las células tratadas con glutamato (sin inhibidor).

11. Acción neuroprotectora de γ GC *in vivo*.

11.1. Existencia de γ GC oxidada y reducida *in vivo*.

Teniendo en cuenta la alta eficacia de *mitoGCL* para actuar como sistema antioxidante y protector en neuronas en cultivo, a continuación nos propusimos estudiar la posible utilidad de *mitoGCL* como sistema neuroprotector *in vivo*.

En primer lugar, decidimos investigar la posible existencia de las formas reducida y oxidada de γ GC en diversos tejidos en ratón. Como se aprecia en la **tabla 3**, los tres tejidos estudiados (cerebro, hígado y riñón) expresaron γ GC reducida, si bien a concentraciones que son entre 40 y 100 veces menores que las de GSH. Por otro lado, demostramos que estos tejidos también expresan la forma oxidada de γ GC, lo que representa, a nuestro juicio, la primera evidencia de la existencia de este disulfuro *in vivo*.

Concentraciones <i>in vivo</i> de GSH y γGC oxidada y reducida			
	γGC reducida (nmol/mg proteína)	γGC oxidada (pmol/mg proteína)	GSH (nmol/mg proteína)
Cerebro	0.26±0.01	1.46±0.25	24.2±1.4
Hígado	0.41±0.02	10.63±1.87	63.9±5.2
Riñón	1.66±0.36	1.14±0.25	20.7±3.2

Tabla 3. Concentraciones de γ GC y GSH *in vivo*. Concentraciones de γ GC oxidada y reducida, y GSH reducido, en cerebro, hígado y riñón de ratones C57BL/6J, mediante ULPC-MS/MS. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n= 7-8 ratones).

11.2. *MitoGCL* aumenta la síntesis de γ GC en cerebro *in vivo*.

A continuación, nos propusimos investigar si la transducción con *mitoGCL* era capaz de incrementar la síntesis mitocondrial de γ GC *in vivo*. El análisis de la actividad de la

GCL en los tejidos transducidos por *mitoGCL* se efectuó en muestras obtenidas en paralelo a las utilizadas para la determinación de GSH en tejido fresco. Así, se inyectaron lentivirus portadores de las formas activa (*mitoGCL*) o inactiva (*mitoGCL(E103A)*) de *mitoGCL* en el estriado de ratones C57BL/6J. La determinación de la actividad de GCL en tejido estriatal transducido mostró un incremento significativo de la producción de γ GC por *mitoGCL*, pero no por *mitoGCL(E103A)* (**figura 23a**).

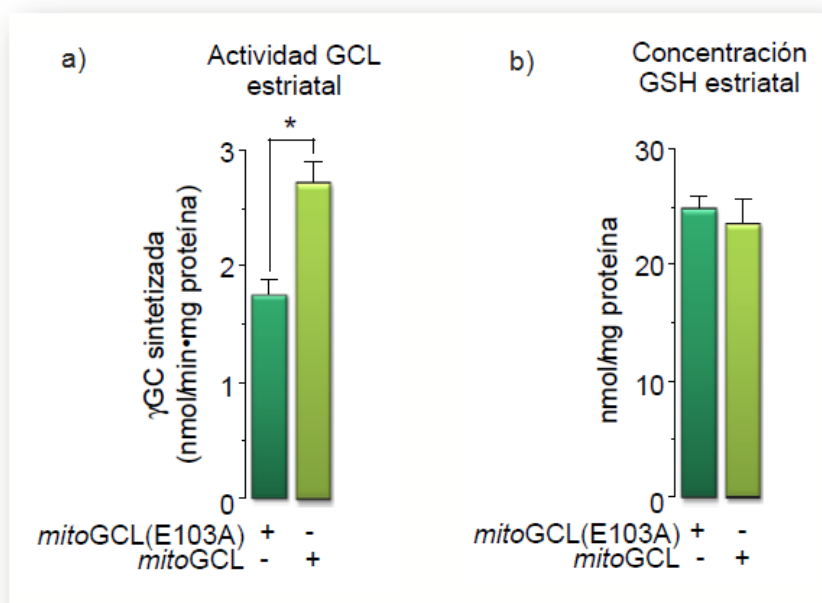


Figura 23. MitoGCL aumenta la síntesis de γ GC *in vitro* sin modular los niveles de GSH. Determinación de γ GC y GSH en tejido estriatal transducido con lentivirus. Las muestras se obtuvieron en fresco, seleccionando mediante una matriz la región de estriado transducida. Para ambas determinaciones, se utilizaron muestras procedentes del mismo tejido. **a)** Determinación por HPLC de γ GC en homogenado de tejido, tras inducción *in vitro* de la actividad GCL. **b)** Cuantificación de GSH en homogenado de tejido estriatal.

*, $p < 0.05$ respecto a tejido transducido con la forma inactiva *mitoGCL(E103A)*.

A fin de confirmar que la transducción con *mitoGCL* únicamente aumenta la producción de γ GC sin modificar la de GSH, analizamos la concentración del tripéptido en el estriado de los cerebros inyectados con lentivirus. La determinación de GSH se realizó en las mismas muestras de tejido fresco que se utilizaron para la determinación de γ GC. Los resultados obtenidos (**Figura 23b**) no mostraron diferencias significativas en la concentración de GSH entre el tejido transducido con *mitoGCL(E103A)* o con

mitoGCL, lo que confirma que la expresión de *mitoGCL* no afecta a la síntesis de GSH *in vivo*, tal y como se observó en los experimentos *in vitro* (ver **figura 6**).

11.3. MitoGCL promueve la supervivencia neuronal *in vivo*.

Con objeto de investigar la eficacia de *mitoGCL* como posible terapia génica neuroprotectora, nos propusimos utilizar un modelo de neurotoxicidad aguda en ratón. Decidimos emplear la administración intraperitoneal de ácido 3-nitropropiónico (3NP), ya que cursa con estrés oxidativo mitocondrial y muerte neuronal en el núcleo estriado (Beal et al., 1993; Calkins et al., 2005).

Como se observa en la **figura 24a**, el tratamiento con 3NP incrementó el marcaje de células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL, mostrando un mayor número de eventos en los ratones inyectados con *mitoGCL*(E103A) con respecto a los inyectados con *mitoGCL*. La apoptosis neuronal se cuantificó en la región de máxima expresión de los lentivirus, para lo cual se seleccionó un área de 0.3 mm² en la zona de inyección, en tres secciones coronales consecutivas de cada ratón. La apoptosis neuronal cuantificación de la, que aparece en la **figura 24b**, muestra una mayor proporción de células NeuN⁺/TUNEL⁺ tras el tratamiento con 3NP únicamente en los animales transducidos con *mitoGCL*(E103A). Así, la expresión de *mitoGCL* previene de la muerte neuronal apoptótica del estriado tras el tratamiento con 3NP *in vivo*. En condiciones basales, la administración de vehículo (PBS) no indujo diferencias significativas entre ambas condiciones (**figura 24**).

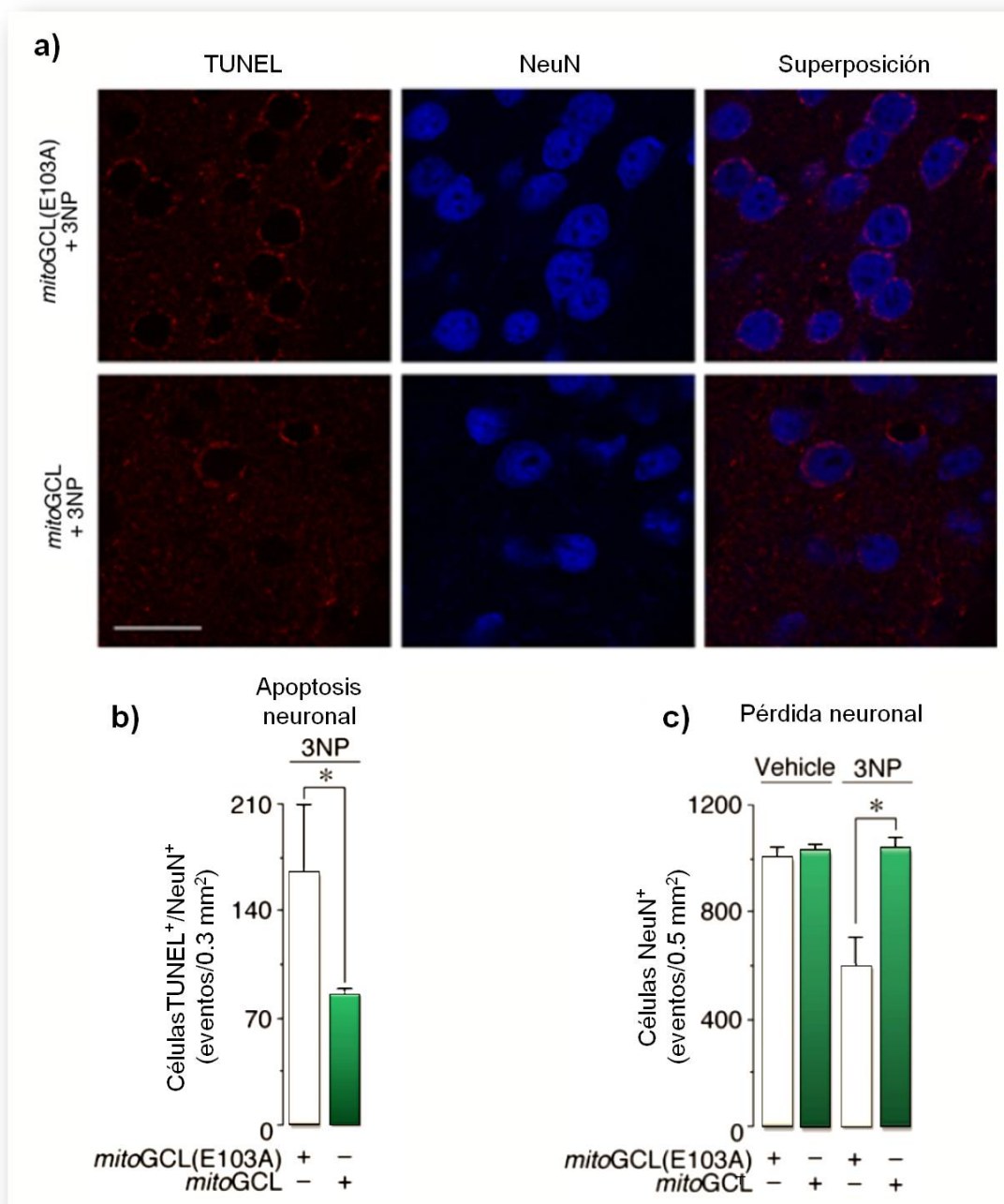


Figura 24. Prevención de la apoptosis y pérdida neuronal en modelo *in vivo* por *mitoGCL*. (a) Análisis de la muerte neuronal apoptótica por microscopía confocal en secciones estriatales de ratones inyectados con partículas lentivirales por estereotaxia. La administración i.p. de 50 mg/Kg de 3NP (50 mg/kg dos veces cada día hasta 7 dosis) produjo un incremento de la muerte neuronal apoptótica (células TUNEL⁺/NeuN⁺) en el estriado de ratones inyectados con *mitoGCL(E103A)*, pero no con la forma activa. Barra de escala = 20 μ m. (b) Análisis cuantitativo del panel a. (c) Cuantificación de la pérdida neuronal (células NeuN⁺) tras el tratamiento con 3NP en relación a la administración de vehículo (PBS).

*, $p < 0.05$ (ANOVA).

*, $p < 0.05$ respecto a tejido transducido con la forma inactiva *mitoGCL(E103A)*.

Resultados

Además, como se observa en la **figura 25**, el tratamiento con 3NP indujo una pérdida de neuronas estriatales transducidas con *mitoGCL(E103A)*, pero no con *mitoGCL* (ver cuantificación en **figura 24c**).

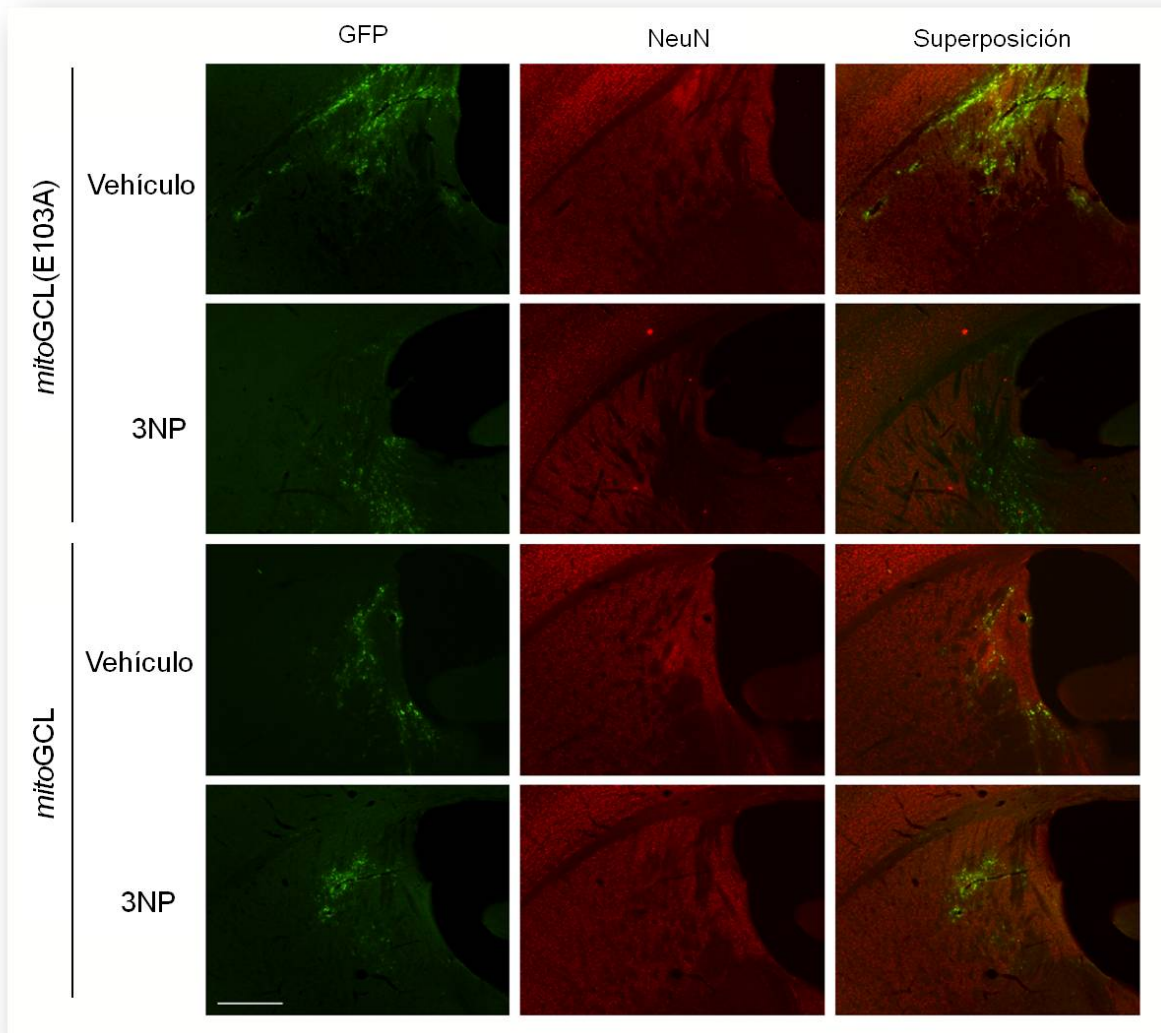


Figura 25. Protección *in vivo* en modelo agudo de neurotoxicidad. Inmunohistoquímica coronal del núcleo estriado de ratones C57BL/6J inyectados con lentivirus por estereotaxia y tratados con 3NP 50 mg/Kg de peso corporal (cada 12 h, hasta 7 dosis) por vía intraperitoneal (i.p.). La inmunohistoquímica evidencia la supervivencia de neuronas (NeuN⁺) transducidas eficientemente (GFP⁺) con *mitoGCL*, y la pérdida de neuronas transducidas con la forma inactiva *mitoGCL(E103A)*, tras el tratamiento con 3NP. La inyección i.p. de PBS (vehículo) no produjo cambios inmunohistoquímicos en el estriado.

Barra de escala: 200 μ m

11.4. *MitoGCL* previene de la descoordinación motora producida por 3NP.

La supervivencia neuronal observada por el análisis inmunohistoquímico muestra que *mitoGCL* previene de la neurodegeneración causada por 3NP. Tal y como han demostrado otros autores (Beal et al., 1993), entre los efectos deletéreos del 3NP se encuentra un déficit motor que está asociado a la pérdida neuronal en el estriado. Así, nuestro siguiente objetivo fue analizar si la prevención de la muerte celular mediada por *mitoGCL* se traducía en una mejora del comportamiento motor. Para ello, se utilizó la prueba de rotarod durante los días de tratamiento con 3NP como medida del balance y coordinación motora de los ratones.

El análisis del comportamiento motor (**figura 26**) demuestra que el tratamiento con PBS no interfiere en el desarrollo de la prueba en los ratones sometidos a la inyección estereotáxica con *mitoGCL* o *mitoGCL*(E103A). Por el contrario, la administración de 3NP indujo una progresiva pérdida de la coordinación motora a lo largo de los tres días de tratamiento en la condición *mitoGCL*(E103A). La inyección de *mitoGCL*, sin embargo, previno muy significativamente la descoordinación motora inducida por 3NP.

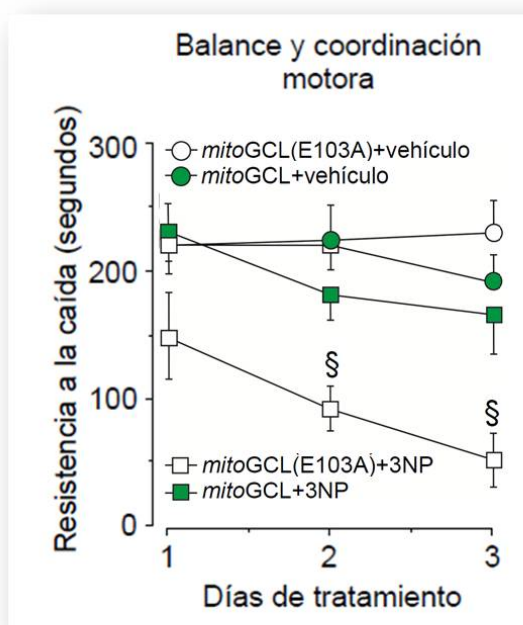


Figura 26. *MitoGCL* previene el déficit motor por tratamiento con 3NP. Test de rotarod para evaluar el comportamiento motor en ratones tratados i.p. con 3NP 50 m/Kg (cada 12 h, hasta 7 dosis) o con PBS (vehículo). La permanencia en la plataforma se determinó hasta un máximo de 300 sg, durante los primeros tres días de tratamiento.

§, $p < 0.05$ frente a cada condición cada día.



Discusión y perspectivas

DISCUSIÓN

Sinopsis

El tripéptido γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina o glutatión (GSH) es el tiol de peso molecular más abundante en la inmensa mayoría de organismos, donde es considerado como el agente antioxidante por excelencia (Dringen et al., 2000). Sin embargo, pese a la gran relevancia de GSH para ésta y otras funciones celulares (Ver tabla I en la introducción), es posible la supervivencia de la célula o del organismo en situaciones de ausencia o supresión del mismo (Ristoff et al., 2002; Shi et al., 2000; Grant et al., 1997; Kim et al., 2008). En base a estas observaciones, nosotros hipotetizamos que γ GC, precursor inmediato en la biosíntesis de GSH, podría asumir sus funciones antioxidantes.

Nuestro laboratorio describió, en 2005, que la expresión de la GCL, enzima encargada de producir γ GC y limitante de la biosíntesis de GSH, es esencial para la supervivencia neuronal (Díaz-Hernández et al., 2005). Sin embargo, estos resultados, así como otros que demuestran que la supresión del gen de la GCL en ratón (Dalton et al., 2000), causa letalidad en el período embrionario, no dilucidan si es la deficiencia de GSH, o la de γ GC, la que es esencial para la supervivencia celular o del organismo. Por este motivo, decidimos estudiar el papel de γ GC en un ambiente fisiológico donde la presencia de GSH no estuviera alterada. Así, dirigiendo su síntesis hacia la mitocondria, describimos que γ GC puede eliminar H_2O_2 , al actuar como un cofactor de la GPx1. La disminución del estrés oxidativo mitocondrial previene la apoptosis celular y confiere neuroprotección en modelos de neurodegeneración *in vitro* e *in vivo*. Más allá de las implicaciones bioquímicas de estas aportaciones, nosotros pensamos que la aplicación de este sistema en terapia génica podría una alternativa de gran valor en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

1. Estrategia de síntesis mitocondrial de γ GC

Para estudiar el papel de γ GC en la célula sin interferir con la biosíntesis de GSH, se eligió a la mitocondria como modelo de estudio, debido a la ausencia de maquinaria biosintética de GSH y tratarse del mayor productor de ROS celular. Mediante la fusión de la secuencia de señalización mitocondrial de la OTC, encargada de su internalización en la matriz mitocondrial, se dirigió la GCL hacia el orgánulo. Así, confirmamos la capacidad de esta secuencia para dirigir esta proteína citosólica hacia la mitocondria (Schriner et al., 2005; Lash et al., 2006) que, tras su escisión, da lugar a la forma nativa de la GCL en el orgánulo.

Algunos autores han propuesto que la presencia de la subunidad moduladora de la GCL es imprescindible para disminuir su K_m por debajo de las concentraciones fisiológicas de glutamato (Dalton et al., 2004; Griffith et al., 1999) y aumentar su K_i para GSH (Chen et al., 2005). Sin embargo, en esta Memoria observamos que la expresión de la subunidad catalítica es suficiente para sintetizar γ GC, cuya acumulación no inhibe GCL_H, al menos en nuestras condiciones de estudio, tal y como han observado otros autores tras la inhibición de Gsh2 (Grant CM et al., 1997). Además, nosotros confirmamos que la presencia de glutámico en el residuo 103 de la GCL es imprescindible para la plena funcionalidad de la enzima, tal y como se ha descrito recientemente (Backos et al., 2010).

La síntesis de γ GC no modificó la concentración de GSH, lo que se debe a la ausencia de GSS en la mitocondria (Griffith et al., 1985). Por tanto, pese a la producción de γ GC en el orgánulo, su forma reducida no parece equilibrarse con el citosol, donde podría convertirse en GSH. Estos resultados concuerdan con la baja exportación de GSH desde la mitocondria hacia el citosol (Rahman et al., 1999).

2. Actividad antioxidante de γ GC

En esta Memoria se describe por primera vez que γ GC posee la capacidad de eliminar H_2O_2 , incluso en presencia de concentraciones fisiológicas de GSH. La eliminación de ROS por γ GC en la mitocondria de neuronas fue mucho más eficiente que la observada en células HEK293T, lo que sugiere que podrían existir diferencias en la forma de eliminación de ROS entre diversos tipos celulares. En estos eventos puede intervenir la alta dependencia del metabolismo mitocondrial en neuronas (Schapira et al., 2002, 207; Mattson et al., 2008), que las hace más susceptibles a los cambios oxidativos en el orgánulo, o las variaciones en el metabolismo de GSH y γ GC en distintos tejidos (Njalsson et al., 2005).

Mediante el silenciamiento de GSS se confirmó que la γ GC endógena puede actuar como antioxidante independiente bajo condiciones de disminución de GSH. Es más, al silenciar GCL en el citosol sin afectar a la expresión de *mitoGCL*, se mantuvieron los niveles de ROS con respecto a las células control. Así, se excluye la posibilidad de que la actividad antioxidante de γ GC recaiga simplemente en la regeneración de GSH, tal y como sucede en otros paradigmas (Lok et al., 2011).

A la vista de que γ GC puede funcionar como un antioxidante, cabe preguntarse si el dipéptido podría sustituir otras funciones celulares de GSH. En efecto, especies del género *Leuconostoc*, la enzima GshB no está presente en condiciones fisiológicas, de manera que ciertas funciones del GSH son asumidas por γ GC (Kim et al., 2008). Por otro lado, la ausencia de GSH en halobacterias se suple por γ GC y se ha demostrado que el dipéptido es más resistente que GSH a la autooxidación en medio salino (Sundquist et al., 1989). En halobacterias que sólo producen γ GC y que carecen de peroxidasa y GST, pero constan de actividad tiol-transferasa, γ GC asume las funciones de GSH en la reducción de tioles. (Sundquist et al., 1989). En nuestras condiciones, sin embargo, a diferencia del GSH (Holmgren et al., 2005; Garcia et al., 2010), el dipéptido no es capaz de modificar proteínas de forma directa o por estado redox de GSH. Por tanto, pese a contar con el sulfhidrilo que interviene reacciones de glutationilación, ésta no parece ser estar entre las funciones de γ GC en células de mamíferos.

Recientemente se ha demostrado que la función como antioxidante del GSH es marginal, actuando como soporte para el mantenimiento del estado redox de tioles por tiorredoxina; no obstante, GSH seguirá siendo esencial para la funcionalidad del grupo

hierro-sulfuro (Kumar et al., 2011). Por otro lado, la ausencia completa de GSH en pacientes es letal (Ristoff et al., 2002, 507; Njalsson et al., 2005), y γ GC por sí misma no es capaz de prevenir las consecuencias metabólicas, motoras y neurológicas, que se exacerban según el grado de depleción de GSH. Considerando estos precedentes, nosotros proponemos que γ GC podría sustituir las funciones antioxidantes, pero no otras funciones esenciales del GSH. Entre éstas, podrían encontrarse la modificación de proteínas (Garcia et al., 2010), la reducción de hidroperóxidos (Maiorino et al., 2007; Mari et al., 2009) o la conjugación y eliminación de compuestos (Kumar et al., 2011; Chaudhuri et al., 1997].

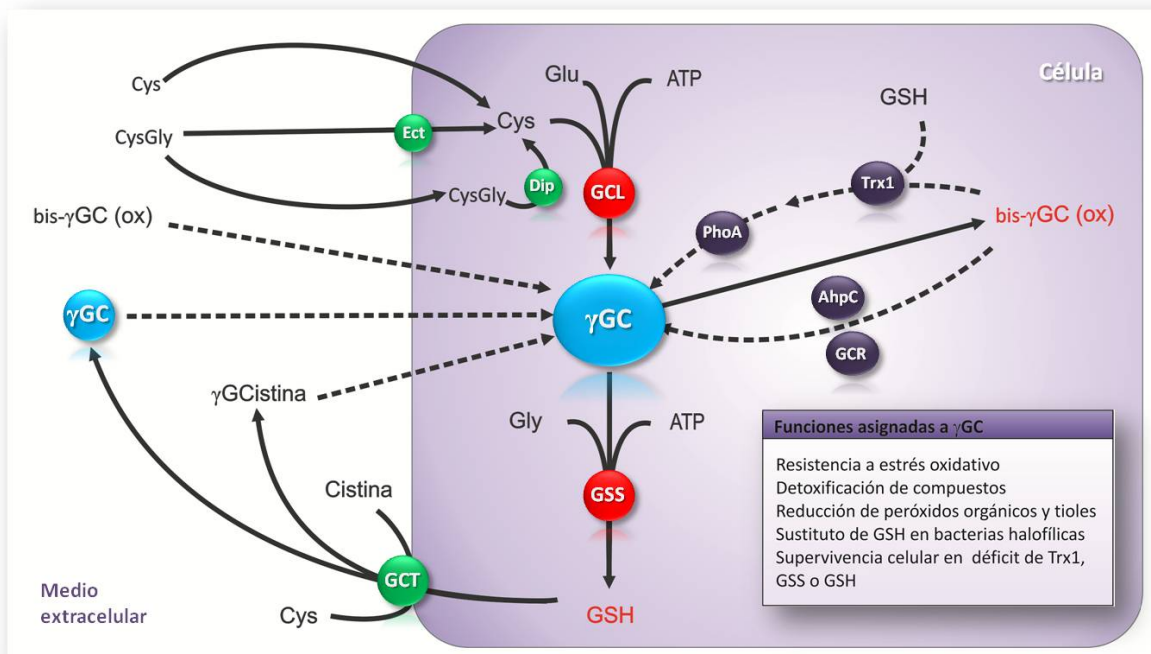
3. γ GC como cofactor de GPx1

Nuestros resultados demuestran que el mecanismo por el cual γ GC elimina H_2O_2 es mediante su acción como cofactor de GPx1. Del análisis estructural de esta enzima se ha deducido que, para la actividad de la GPx1 es necesaria la unión de los grupos carboxilos de la glicina y del glutamato del GSH (Epp O et al., 1983; Toppo S et al., 2009). Así, γ GC actuaría como cofactor de GPx1 al contar el residuo de glutámico, imprescindible para la interacción con la enzima, y con el sulfhidrilo de la cisteína, necesario para la reacción de reducción (Fourquet S et al., 2008, Toppo S et al., 2009). Sin embargo, a la vista de la menor actividad de GPx1 con γ GC, cabría pensar que la glicina facilitaría la interacción con el sitio activo y la reducción de H_2O_2 .

En la mitocondria, GPx1 es una de las principales enzimas responsables de la eliminación de ROS. Sin embargo, no se puede descartar que otras enzimas del metabolismo de GSH también utilicen γ GC como cofactor. De hecho, se ha demostrado que puede actuar como cofactor de la GST, aunque con una *Km* entre 6 y 20 veces superior que para GSH (Sugimoto et al., 1985). También cabría la posibilidad de que la GPx4, capaz de aceptar una amplia variedad de agentes reductores (Toppo et al., 2009), utilice γ GC para reducir hidroperóxidos. Futuros estudios podrán dilucidar esta posibilidad.

La presencia de la forma oxidada de γ GC en tejidos, demuestra la existencia de un ciclo redox de la γ GC. Sin embargo, el silenciamiento de la GSR no induce diferencias

en la capacidad de la γ GC para reducir H_2O_2 , y la presencia de GSR no mejora la velocidad de eliminación de H_2O_2 por el sistema γ GC/GPx1. Estos resultados descartan la regeneración de γ GC, al menos por esta enzima. En halobacterias, se ha descrito una bis- γ -glutamilcistina reductasa (GCR), dependiente de NADPH, similar a GSR en su actividad, pero altamente específica para bis-7-glutamilcistina que es incapaz de reducir GSSG (Sundquist et al., 1989). Por otro lado, Faulkner y colaboradores (Faulkner et al., 2008) han demostrado que la expresión de la peroxirredoxina AhpC puede reducir γ GC oxidada y suplir así el déficit de GSH en cepas de *Escherichia coli* carentes de GshB (equivalente a GSS en mamíferos). Estos autores sugieren que el disulfuro de γ GC se uniría con Trx1, incrementando así la susceptibilidad de reducirse por la fosfatasa alcalina (PhoA) (Faulkner et al., 2008). La idea de que la Trx puede reducir el disulfuro de γ GC está apoyada por los resultados de Tan y colaboradores (Tan et al., 2010), que han demostrado que el sistema Trx-Trx reductasa puede reducir el GSSG a GSH. La participación de éstos u otros sistemas para reducir el disulfuro de γ GC en células de mamífero requiere de un estudio en profundidad, fuera del alcance de esta Tesis Doctoral.



Formación y reciclaje de γ GC. El dipéptido γ GC puede formarse a partir de diversos precursores, de forma directa o por mediación de la glutamato-cisteína ligasa (GCL). Además de originar GSH, por acción de la glutatión sintetasa (GSS), puede oxidarse a disulfuro de γ GC (bis- γ GC (ox)). Entre los sistemas propuestos para su reducción, se encuentra la peroxirredoxina AhpC, la bis- γ -glutamilcistina reductasa (GCR) o el par tiorredoxina 1 (Trx1) / fosfatasa alcalina (PhoA).

4. Neuroprotección por γ GC

Es bien sabido que el metabolismo del GSH tiene una alta relevancia en cerebro, dado que su déficit es uno de los eventos más involucrados en las enfermedades neurodegenerativas, que cursan con una producción excesiva de ROS (Bolaños et al., 2009). Muestra de ello es la enfermedad de Parkinson, en la que se ha descrito una deficiencia de GSH en la *substantia nigra* de hasta el ~60% como uno de los signos bioquímicos que precede al desarrollo de la enfermedad (Perry et al., 1982).

Atendiendo a la función de γ GC de eliminar ROS eficientemente bajo un déficit de GSH, contemplamos la posibilidad de su posible efecto sobre supervivencia neuronal en modelos de neurodegeneración *in vitro* e *in vivo*. Se sabe que, a diferencia de la GSS, la supresión de laGCL es letal (Dalton et al., 2000; Shi et al., 2000; Grant et al., 1996). En neuronas, la GCL reduce su viabilidad y resistencia frente al estrés oxidativo, incluso en co-cultivo con astrocitos (Díaz-Hernández et al., 2005). Así, la supervivencia celular se mantiene en ausencia de GSH, siempre y cuando γ GC esté presente.

Nuestros resultados demuestran que la eliminación de ROS por γ GC mitocondrial previene de la apoptosis neuronal, lo que confirma la implicación del estrés oxidativo mitocondrial en los procesos neurodegenerativos (Andersen et al., 2004). Sin embargo, en el modelo de sobre-estimulación glutamatérgica, que activa la vía intrínseca de la apoptosis, *mitoGCL* no suprimió por completo la apoptosis neuronal. Esto sugiere que, además del estrés oxidativo mitocondrial, otros procesos derivados de la entrada de Ca^{2+} y la despolarización mitocondrial deberán estar implicados en la muerte neuronal excitotóxica (Krantic et al., 2005).

Teniendo en cuenta la eficacia de *mitoGCL* en neuroprotección en cultivos primarios de neuronas, en este trabajo nos propusimos investigar la posible utilidad de esta herramienta en un modelo *in vivo* de neuroprotección. La administración de precursores de la biosíntesis de GSH, tales como NAC (Pocernich et al., 2000) o etil-éster de γ GC (GCEE) (Chinta et al., 2006; Lok et al., 2011) o de GSH (GEE) (Martin et al., 2009), ha demostrado proteger en diversos modelos de estrés oxidativo *in vivo* e *in vitro*. Por desgracia, la terapia antioxidante no ha sido fructífera en ensayos clínicos [Kamat, 2008, 473]. La transitoriedad de los efectos, o la falta de accesibilidad a la región específica del tejido dañado, son algunas de las principales limitaciones de estos

modelos. En nuestro trabajo, para estudiar la capacidad de *mitoGCL* para conferir neuroprotección *in vivo*, utilizamos un modelo de neurodegeneración aguda por ácido 3-nitropropiónico (Beal, 1993). La transducción de los lentivirus en el estriado expresó correctamente *mitoGCL*, a juzgar por el incremento de γ GC en el tejido. Dado que la concentración de GSH se mantuvo, podemos descartar la utilización de γ GC como precursor en la síntesis de GSH en estas condiciones. El elevado grado de protección ejercido por *mitoGCL in vivo* a pesar del relativamente bajo porcentaje de transducción, sugiere que la supervivencia de los astrocitos podría contribuir a la protección neuronal (Dringen et al., 2000; Hardingham et al., 2011).

En conjunto, en la presente memoria describimos la utilización de γ GC como cofactor de GPx1 en la eliminación de H_2O_2 . En base a nuestro conocimiento de la bibliografía existente, demostramos por primera vez que γ GC es un cofactor de GPx1 y que actúa como antioxidante, de manera independiente a la utilización de GSH. La prevención del estrés oxidativo por γ GC evita la oxidación de GSH, pudiendo contribuir a reservar su utilización para otras funciones esenciales como la conjugación de xenobióticos, el mantenimiento del grupo hierro-sulfuro o la modificación de tioles proteicos. Por otro lado, la actividad antioxidante de γ GC sugiere una revisión de los efectos observados mediante la inhibición de la síntesis de GSH con L-BSO u otros mecanismos de inhibición de GCL (Dalton et al., 2000; Shi et al., 2000; Grant et al., 1996; Kumar et al., 2011; Griffith et al., 1999). Así, el aumento del estrés oxidativo y apoptosis celular observados en estos casos, podrían ser atribuidos a la ausencia de γ GC, y no solo a la de GSH.

Por el momento, desconocemos si γ GC puede sustituir otras funciones propias o relacionadas con el metabolismo de GSH, o incluso tener sus propias funciones al margen de la protección frente al estrés oxidativo. Así, la formación de γ GC por la GGT en el espacio extracelular y contribuir así a la resistencia al estrés oxidativo observada en tumores que cursan con sobreexpresión de GGT (Corti et al., 2010; Backos et al., 2011). De igual manera sucedería con aquellos en los que GCL es la enzima sobreexpresada (Cortes-Wanstreet et al., 2009; Lu et al., 2009; Backos et al., 2011).

La modulación del estrés oxidativo mitocondrial por γ GC podrá ser de gran utilidad para el estudio de los eventos celulares y vías de señalización mediadas por ROS mitocondriales. Los resultados obtenidos *in vivo* sugieren fuertemente la utilización de la terapia antioxidante mitocondrial con γ GC como estrategia de neuroprotección. La

Discusión y perspectivas

búsqueda de estrategias de administración y “targeting” de éste u otros antioxidantes a la mitocondria del SNC, pueden abrir nuevas expectativas en la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

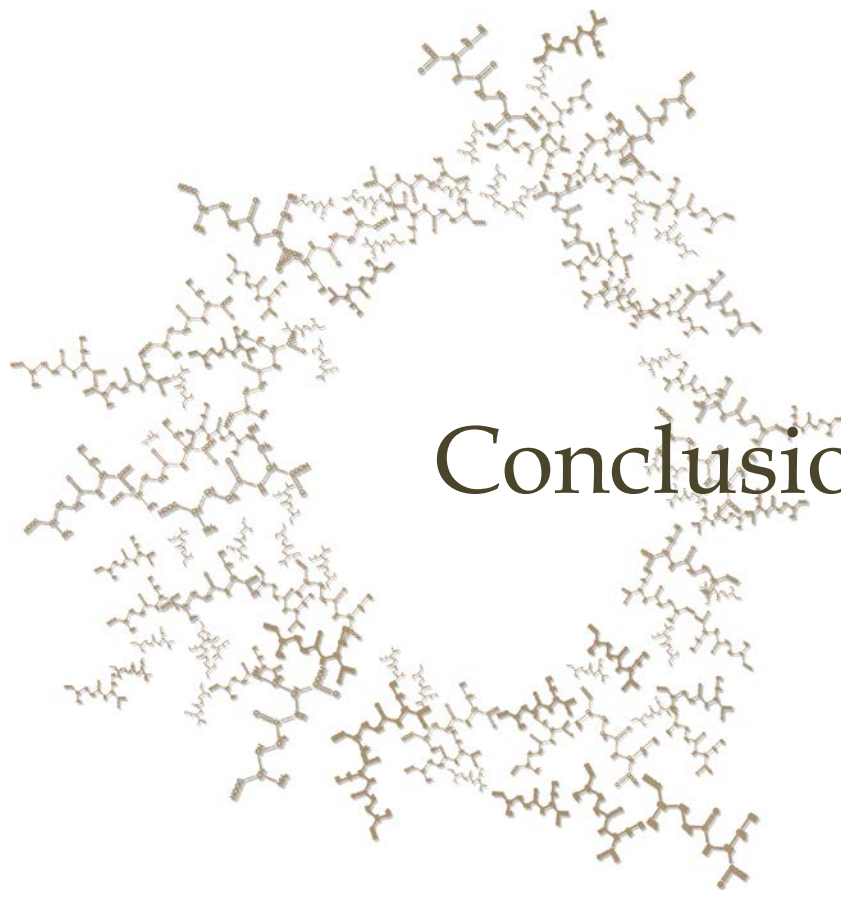
Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta Memoria abren nuevas posibilidades de estudio en el metabolismo de GSH. La función antioxidante de γ GC, actuando como cofactor de GPx1, requiere una caracterización en profundidad. Así, no descartamos la posibilidad de que γ GC se comporte como cofactor para otras enzimas de la familia de las glutatión peroxidasas, así como de otros sistemas del metabolismo de GSH.

Las diferentes concentraciones de GSH y γ GC según el tipo celular o tejido, sugieren un metabolismo dependiente de la especialización celular. Conocer la forma en que γ GC se utiliza en condiciones fisio(pato)lógicas podrá ser de especial interés en la búsqueda de nuevas formas de respuesta frente a diversas situaciones de estrés.

La presencia de disulfuro de γ GC *in vivo* sugiere la existencia de un ciclo redox de γ GC. Aunque se han propuesto diversos sistemas de regeneración de γ GC en microorganismos (Sundquist, et al., 1989; Faulkner et al., 2008), éstos son desconocidos en mamíferos.

Nosotros pensamos que la caracterización bioquímica de las funciones celulares de γ GC en la célula, permitirá abrir nuevas vías de tratamiento frente a enfermedades neurodegenerativas.

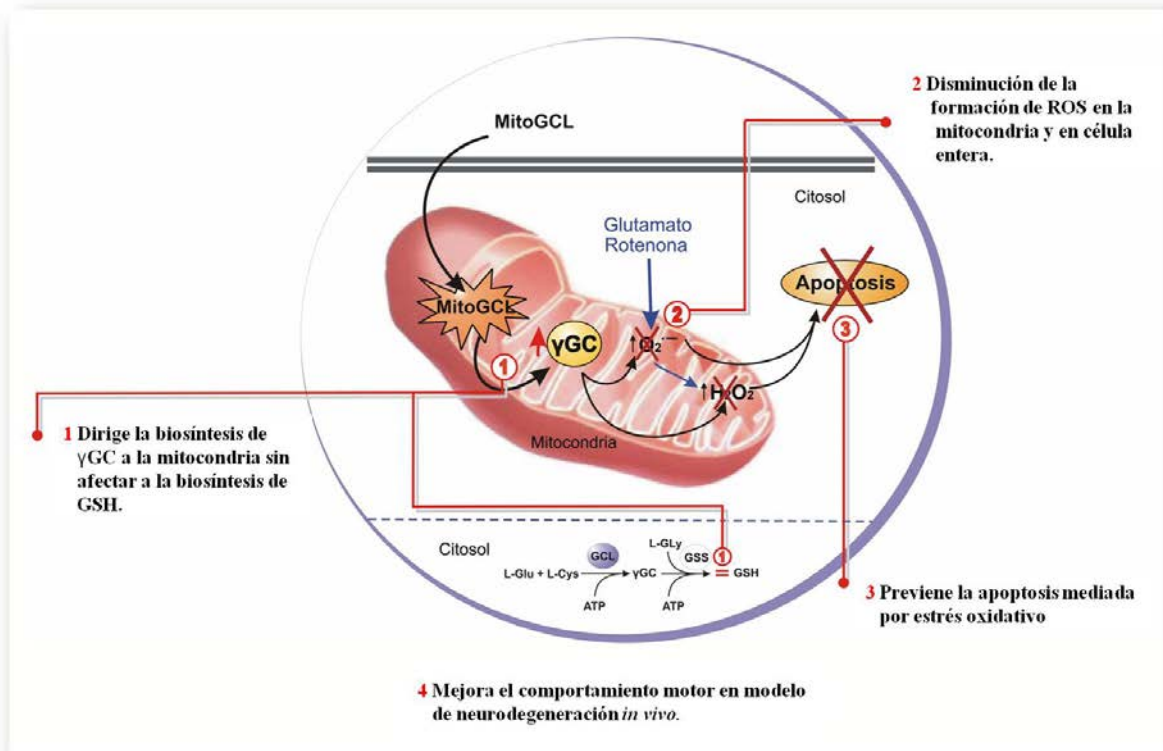


Conclusiones

Conclusiones

A la vista de los resultados presentados en esta Memoria, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. Hemos desarrollado un método que permite la expresión funcional de la subunidad catalítica de glutamato-cisteína ligasa en la mitocondria. Con este método, mostramos que es posible sintetizar γ -glutamilcisteína en la mitocondria sin interferir con la biosíntesis de glutatión en el citosol.
2. γ -Glutamilcisteína contribuye a eliminar el peróxido de hidrógeno producido por la mitocondria, actuando como cofactor de la glutatión peroxidasa-1.
3. La presencia de la forma oxidada de γ -glutamilcisteína *in vivo* sugiere la existencia de un ciclo redox del dipéptido en condiciones fisiológicas.
4. γ -glutamilcisteína no induce, en nuestras condiciones experimentales, modificaciones redox en tioles de forma directa ni mediada por glutatión.
5. En neuronas, la γ -glutamilcisteína previene del estrés oxidativo mitocondrial causado por diversos estímulos, lo que se traduce en la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis.
6. Mediante terapia génica *in vivo*, demostramos que la síntesis mitocondrial de γ -glutamilcisteína en el estriado de cerebro de ratón previene la pérdida neuronal por muerte apoptótica y la disfunción motora en un modelo de neurodegeneración, en ratón.



Síntesis mitocondrial de γ -glutamilcisteína como antioxidante y neuroprotector. La síntesis de γ -glutamilcisteína en la mitocondria, se produce sin modificar la concentración de GSH y previene el estrés oxidativo y la muerte apoptótica. En terapia génica, previene la apoptosis neuronal y mejora la actividad motora en un modelo de neurodegeneración en raton.



Summary



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

Antioxidant function of γ -glutamylcysteine.
Application in neuroprotective gene therapy

-DOCTORAL THESIS-
(SUMMARY)

RUUBÉN QUINTANA CABRERA

Salamanca, 2012

Introduction

Mitochondria are both producers and targets of reactive oxygen species (ROS). A well-balanced equilibrium between mitochondrial ROS production and their elimination is critical for the control of redox-mediated cell signaling processes¹. By disposing ROS, glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine, GSH) is thought to be the main small thiol antioxidant derivative^{2,3}. GSH is synthesized exclusively in the cytosol in two consecutive ATP-requiring steps, the first of which, and rate-limiting, being γ -glutamylcysteine formation by glutamate-cysteine ligase (GCL); glutathione synthetase (GSS) then forms the tripeptide by linking glycine to γ -glutamylcysteine^{2,3}. It is well documented that pharmacological inhibition of GCL activity⁴ or knockdown of the catalytic GCL subunit⁵ increases ROS abundance, which mediates cellular damage; GCL genetic deletion is embryonically lethal^{6,7}.

Interestingly, GSH is dispensable for the cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* genetically deleted of GSS⁸. In addition, it has been recently demonstrated that, in *S. cerevisiae* devoid of GSS, GSH is essential for iron-sulfur cluster assembly, but not for thiol-redox control⁹. Both in yeast⁸ and in human fibroblasts¹⁰, genetic GSS deletion results in γ -glutamylcysteine accumulation.

Hypothesis and objectives

Hypothesis

At the light of the previous observation, we hypothesized whether the antioxidant function of GSH might be adopted by γ -glutamylcysteine.

General objective

We aimed to investigate whether –and if so, how– γ -glutamylcysteine detoxifies hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) under intact, physiological GSH concentrations.

Specific objectives

1. To design and obtain a plasmid construct to target the biosynthesis of γ -glutamylcysteine to mitochondria, an organelle that could not further transform γ -glutamylcysteine into GSH due to the absence of GSS¹¹.
2. To investigate the possible function of γ -glutamylcysteine at detoxifying ROS in mitochondria and intact cells.
3. To study whether γ -glutamylcysteine modulates cellular thiol redox status and survival.
4. To investigate the possible neuroprotective role of γ -glutamylcysteine in neurodegeneration paradigms, both *in vitro* and *in vivo*.

Results

To direct γ -glutamylcysteine synthesis to mitochondria, the full-length cDNA encoding the catalytic GCL subunit was fused with the mitochondrial targeting signal of ornithine transcarbamylase. When expressed in HEK293T cells, this construct (*mitoGCL*) yielded a GCL protein that was confined to mitochondria and absent in the cytosol, as revealed by western blotting after cellular fractionation (Fig. 1a) and confocal microscopy (Fig. 1b). In contrast, expression of untagged GCL was exclusively present in the cytosol (Fig. 1a,b). Whole cell extracts expressing *mitoGCL* revealed a super-shifted anti-GCL band that was not present in the untagged GCL-expressing cells or in the *mitoGCL*-transfected mitochondria (Fig. 1c), suggesting that only the mitochondrial-targeting epitope-processed form of the protein was present in the mitochondrial fraction.

Then, we assessed whether expressed *mitoGCL* yielded functional GCL within mitochondria. As shown in Fig. 2a, GCL activity was undetectable in mitochondria isolated from control cells, but present in *mitoGCL*-transfected cells. Furthermore, neither mitochondrial (Fig. 2b, left panel) nor cytosolic (Fig. 2b, right panel) GSH concentrations changed by *mitoGCL* expression. Expression of *mitoGCL* prevented the conversion of GSH to its oxidized form (GSSG) caused by rotenone (Fig. 2c). Interestingly, H_2O_2 detection was significantly diminished by *mitoGCL* expression, as measured both in mitochondria (Fig. 3a -left panel- and 3b) and in intact cells (Fig. 3a, right panel).

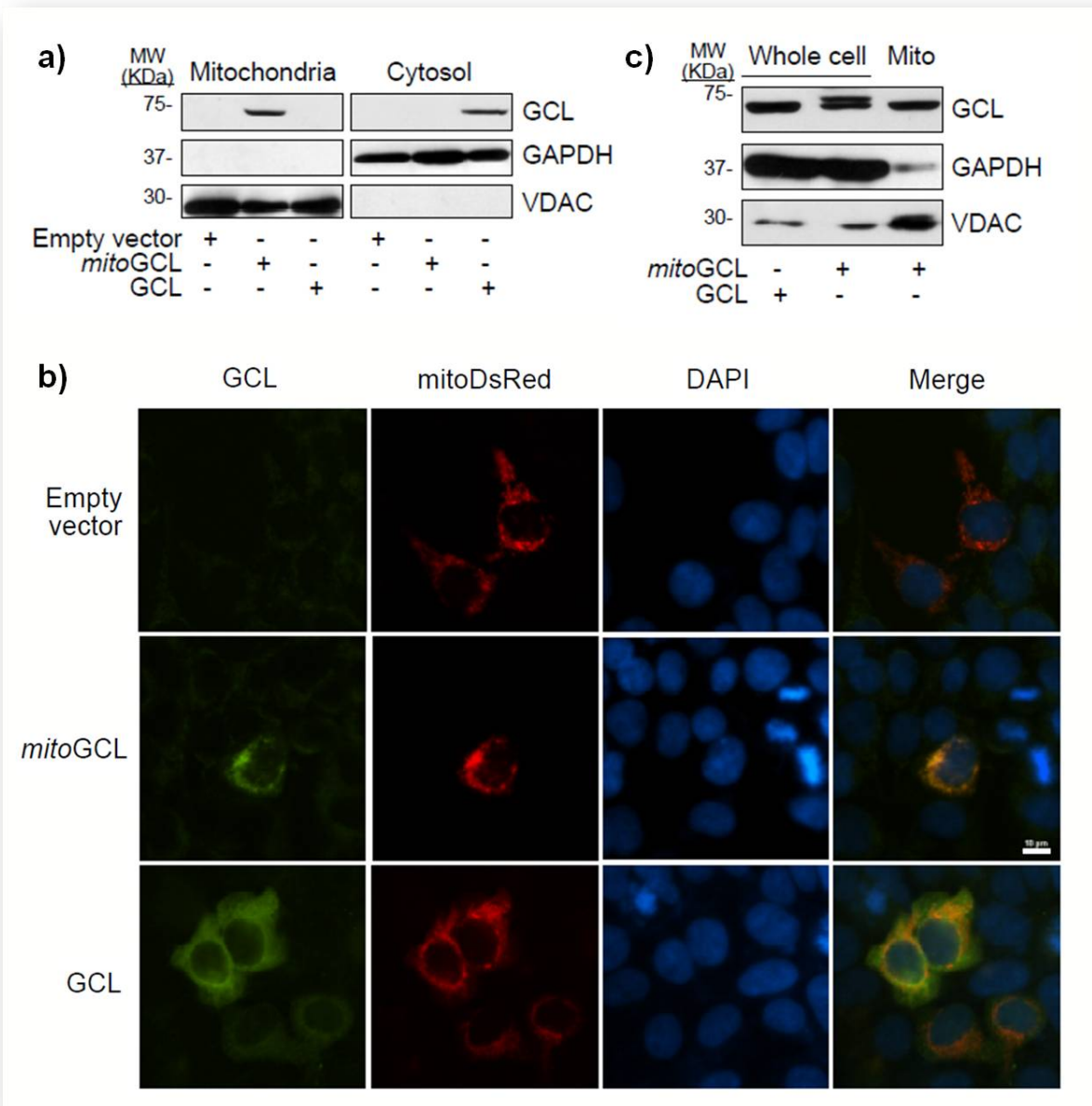


Figure 1. Targeting of glutamate-cysteine ligase (GCL) to mitochondria (a) Expression of GCL fused with the mitochondrial epitope of ornithine transcarbamylase (*mitoGCL*) in HEK293T cells shows its localization in the mitochondrial, not in the cytosolic fraction, as judged by Western blotting. Native (un-tagged) GCL is exclusively expressed in cytosol. (b) Confocal images show co-localization of *mitoGCL* with the mitochondrial marker mitoDsRed, whereas native GCL showed typical cytosolic diffused pattern. Cells nuclei were stained with DAPI. Scale bar=10 μ m. (c) Whole extracts of cells expressing *mitoGCL* shows both native and mitochondrial-tagged GCL, as judged by the loss of the super-shifted band in the mitochondrial fraction. VDAC, Voltage Dependent Anion Channel; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Scale bar=10 μ m.

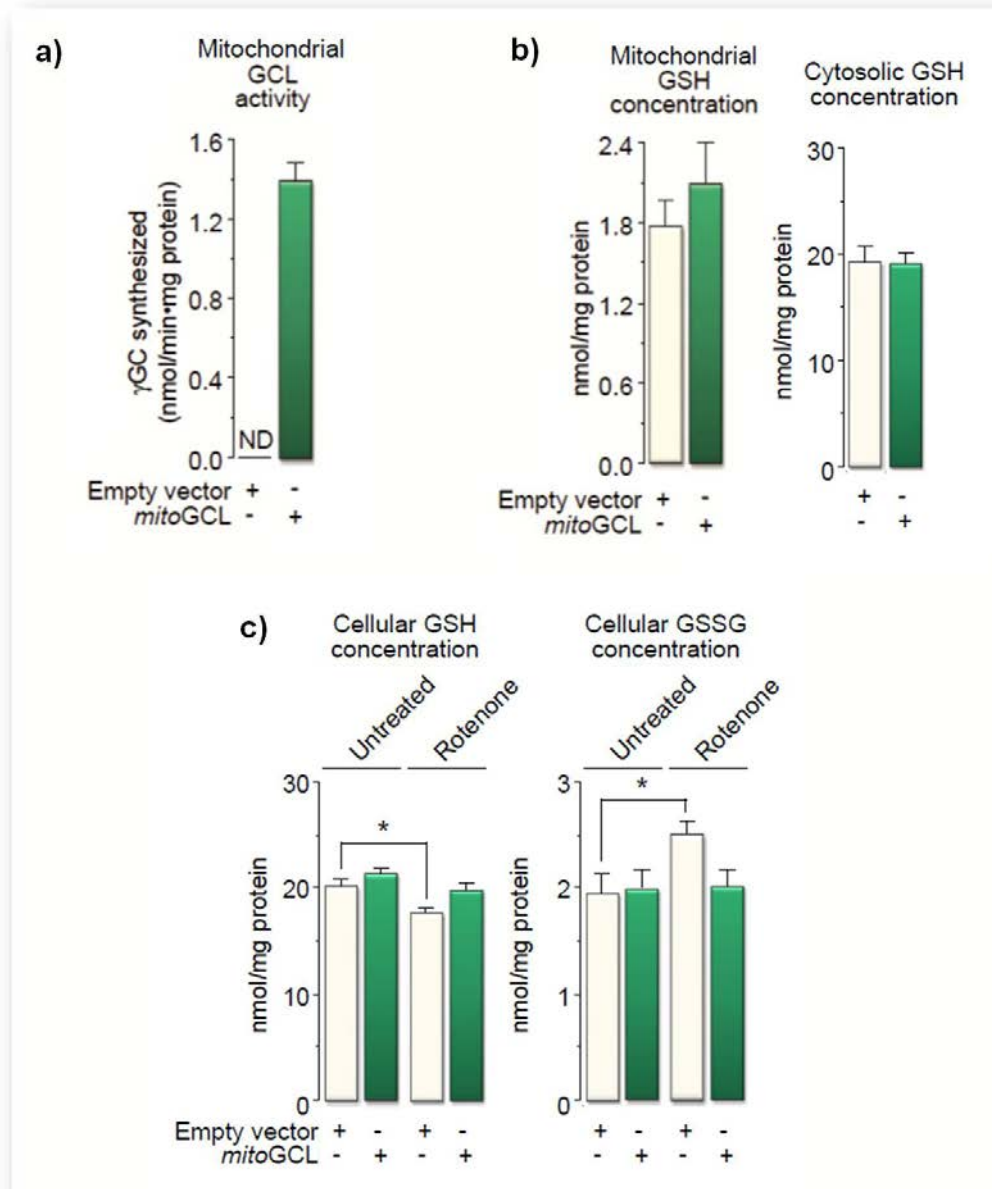


Figure 2. *MitoGCL* is functional in mitochondria and prevents GSH oxidation without modifying its levels (a) *MitoGCL* is functional, as judged by the presence of GCL activity (synthesis of γ -glutamylcysteine, γ GC) in the mitochondrial fraction (b) Mitochondrial (left panel) or cytosolic (right panel) GSH concentration was unaltered by *mitoGCL* expression. (c) Rotenone ($1 \mu\text{M}/4 \text{ h}$) decreased the reduced form of glutathione (GSH), and increased its oxidized form (GSSG) that was prevented by expression of *mitoGCL* in HEK293T cells. ; ND, not detected; * $p < 0.05$ (ANOVA).

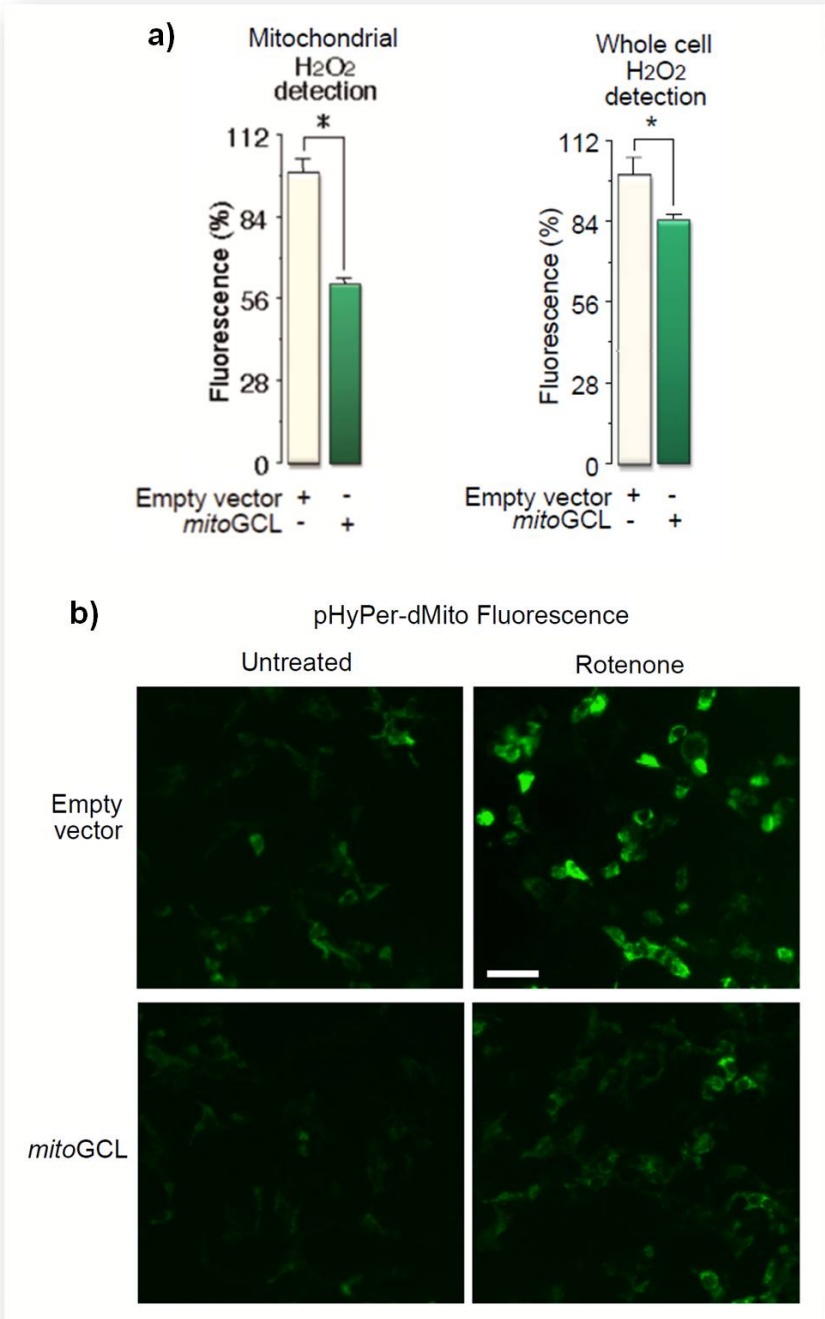


Figure 3. H₂O₂ detoxification by *mitoGCL* (a) The rate of H₂O₂ production (AmplexRedTM), after treatment with 10 μM rotenone, significantly decreased (right panel). (b) Measurement of the rate of H₂O₂ detection by the AmplexRed method evidenced significant decrease in detected H₂O₂ in intact HEK293T cells. (c) The increase in mitochondrial H₂O₂ detection caused by rotenone (10 μM/15 min) was prevented by *mitoGCL*, as judged by the fluorescence emitted from the expression of the mitochondrial-tagged plasmid probe, pHyPer-dMito, in intact HEK203T cells; scale bar=50 μm. *p<0.05 (ANOVA).

To confirm that GCL activity wholly accounted for ROS down-modulation, we expressed (Fig. 4a) a E103A mutant¹², inactive (Fig. 4b) form of *mitoGCL*. We found that rotenone-induced mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ was significantly decreased by wild type *mitoGCL*, but not by the E103A inactive form (Fig. 4c). These data confirm that γ -glutamylcysteine is required for the observed antioxidant function.

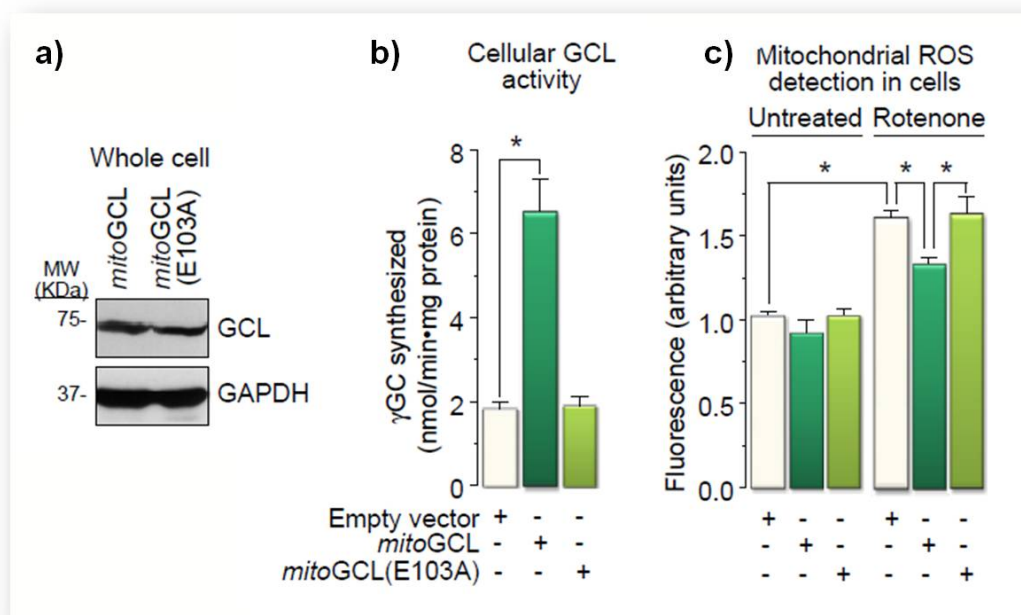


Figure 4. ROS down-modulation relies on GCL activity in mitochondria (a) Expression of the wild type and the E103A mutant forms of *mitoGCL* showed identical protein abundance. (b) The E103A mutant *mitoGCL* form is inactive, as judged by the lack of γ GC formation in transfected cells; (c) Rotenone (1 μ M/4 h) induced an increase in mitochondrial superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) abundance, as revealed by MitoSox fluorescence detection followed by flow cytometry; this increase was partially prevented by the wild-type, but not by the E103A mutant inactive *mitoGCL* form (right panel). The cytosolic enzyme GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used to assess equal loading in immunoblots. * $p < 0.05$ (ANOVA; $n = 3$ independent experiments).

To decipher how γ -glutamylcysteine detoxified ROS but otherwise avoiding the influence of cytosolic GCL, we expressed a silent mutant *mitoGCL* form (*mitoGCL*(mut)) refractory to the action of a small hairpin RNA against GCL (shGCL)⁵, in HEK293T cells (Fig. 5a). Knocking down GCL dramatically reduced total cellular GSH in both *mitoGCL* and *mitoGCL*(mut) transfected cells (Fig. 5b). GCL knockdown was insufficient to trigger a significant increase in mitochondrial $O_2^{\bullet-}$, but this was strongly potentiated by rotenone, and rescued by *mitoGCL*(mut) (Fig. 5c). Thus, in unstressed HEK293T cells, γ -glutamylcysteine may not contribute to the basal $O_2^{\bullet-}$

regulation that can occur in primary neurons, in which we previously reported a significant increase in $O_2^{\bullet-}$ by shGCL¹³. It therefore appears that the impact of γ -glutamylcysteine as a physiological redox regulator differs amongst cell types.

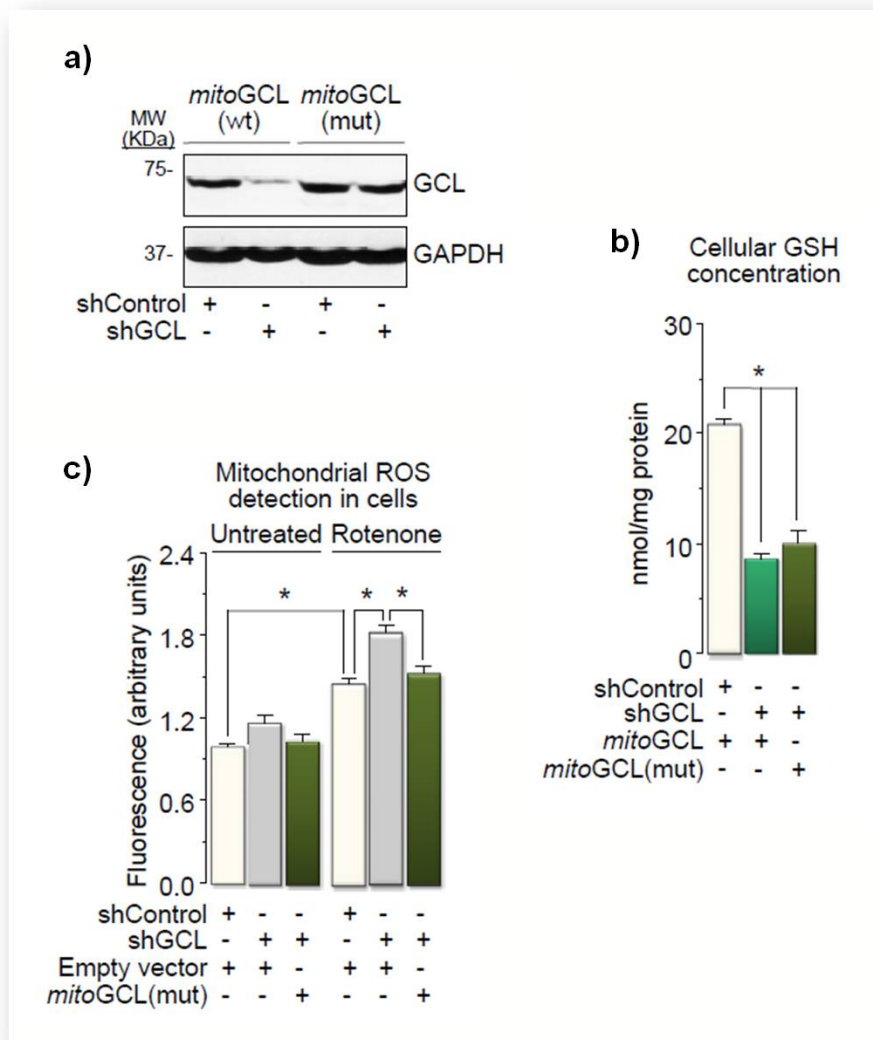


Figure 5. *MitoGCL* protects against ROS in cells after down-regulation of native GCL (a) Expression of a shRNA against GCL (shGCL) in HEK293T cells efficiently knockdowns wild type *mitoGCL*, but not a mutant form of *mitoGCL* (*mitoGCL*(mut)) that is refractory to shGCL. (b) Total cellular GSH concentration was efficiently decreased 3 days after transfection of HEK293T cells with an shRNA against GCL (shGCL) in the presence of wild type *mitoGCL*, but not in the presence of the shGCL-refractory form, *mitoGCL*(mut). (c) Treatment of cells with rotenone (1 μ M; 4 h) increased mitochondrial $O_2^{\bullet-}$, as revealed by MitoSox fluorescence; this was further enhanced by GCL silencing (shGCL), and rescued by *mitoGCL*(mut) expression; GCL silencing in the absence of rotenone did not significantly modify mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ in HEK293T cells. * $p < 0.05$ (ANOVA).

Next, we knocked down GSS (Fig. 6a), which resulted in endogenous γ -glutamylcysteine accumulation and GSH decrease (Table 1). We found that GSS knockdown abolished the increase in rotenone-induced $O_2^{\cdot-}$, both in the absence (Fig. 6b, right panel) and in the presence of *mitoGCL* (Fig. 6b, left panel).

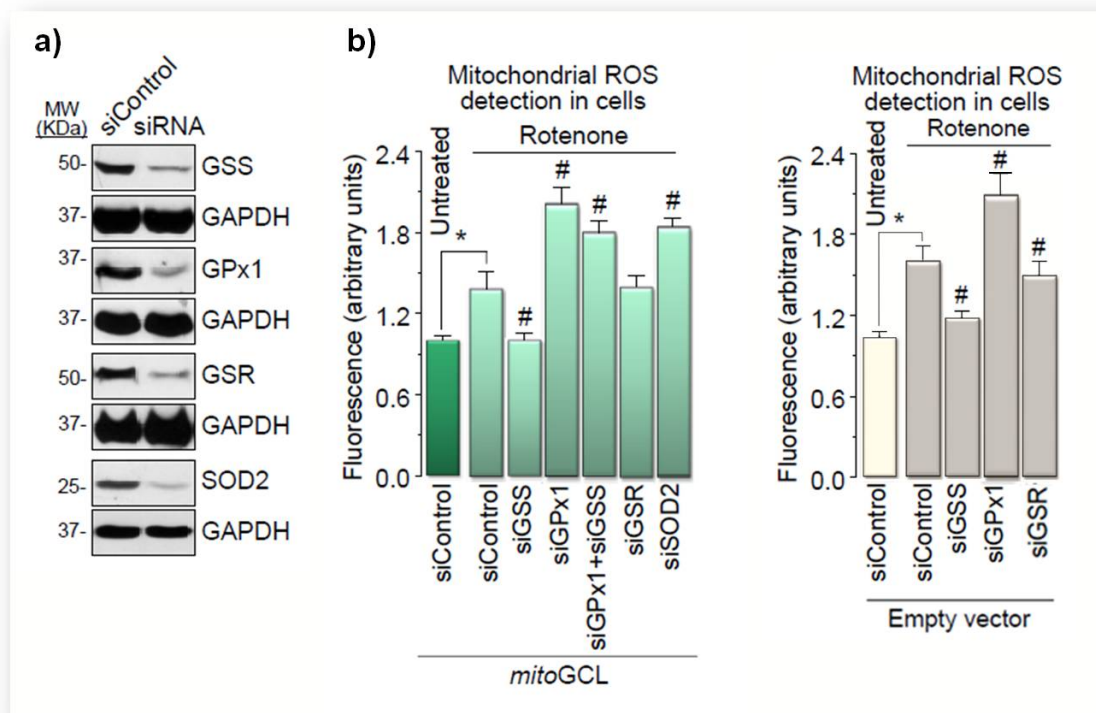


Figure 6. Enzymatic systems involved in ROS detoxification by *mitoGCL* (a) Western blots showing the efficacy of different siRNAs, used at 100 nM for 3 days in HEK293T cells, against glutathione synthetase (GSS), glutathione peroxidase-1 (GPx1), glutathione reductase (GSR) and superoxide dismutase-2 (SOD2); control siRNA is siRNA against luciferase; GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as loading control. (b) Rotenone (1 μ M; 4 h) increased mitochondrial $O_2^{\cdot-}$, as judged by MitoSox fluorescence, in both wt (right panel) and *mitoGCL*-expressing cells (left panel); this effect was abolished by GSS silencing and enhanced by GPx1 knockdown; silencing GSS did not rescue the increase in $O_2^{\cdot-}$ caused by GPx1 knockdown; GSR silencing did not alter, and SOD2 silencing enhanced rotenone-induced ROS. * $p < 0.05$; # $p < 0.05$ versus siControl (*mitoGCL*) (ANOVA).

	Reduced γ -glutamylcysteine (nmol/mg protein)	Oxidized γ -glutamylcysteine	GSH (nmol/mg protein)
siControl	0.32 \pm 0.01	ND	23.5 \pm 0.8
siGSS	0.37 \pm 0.02*	ND	13.3 \pm 1.3*
siGSS+ <i>mitoGCL</i>	0.41 \pm 0.02*	ND	13.9 \pm 0.2*

Table 1. Concentrations of reduced and oxidized γ -glutamylcysteine, and reduced glutathione (GSH), after GSS knockdown in HEK293 cells. Results are mean \pm SEM values (n=8-10); * $p < 0.05$ versus siControl (ANOVA); ND, not detected.

Summary

We then sought to elucidate if γ -glutamylcysteine served as a glutathione peroxidase cofactor. Since glutathione peroxidase-1 (GPx1) largely accounts for mitochondrial H_2O_2 detoxification¹⁴, we knocked down it (Fig. 6a), which resulted in a significant enhancement of rotenone-induced $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 6b). Furthermore, GSS knockdown was unable to decrease $O_2^{\bullet-}$ levels during GPx1 silencing (Fig. 6b). The oxidized form of γ -glutamylcysteine was undetectable in cultured cells (Table 1), but it was present in all tissues analyzed *in vivo* (brain, liver and kidney; Table 2). Knocking down glutathione reductase (GSR) failed to enhance rotenone-induced $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 6b). To disregard a direct interaction of γ -glutamylcysteine with $O_2^{\bullet-}$, we silenced the mitochondrial isoform of superoxide dismutase (SOD2) (Fig. 6a), which enhanced rotenone-induced $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 6b).

	Reduced γ -glutamylcysteine (nmol/mg protein)	Oxidized γ -glutamylcysteine (pmol/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)
Brain	0.26±0.01	1.46±0.25	24.2±1.4
Liver	0.41±0.02	10.63±1.87	63.9±5.2
Kidney	1.66±0.36	1.14±0.25	20.7±3.2

Table 2. Concentrations of reduced and oxidized forms of γ -glutamylcysteine, and reduced glutathione (GSH) in different tissues in adult male mice *in vivo*. Results are mean \pm SEM values (n=7-8 mice).

The ability of either γ -glutamylcysteine or its cognate cofactor, GSH, to dispose H_2O_2 *in vitro* was then assessed in the absence or presence of purified GPx1. As shown in Figure 7a, γ -glutamylcysteine and GSH were unable to detoxify H_2O_2 , unless GPx1 was present; γ -glutamylcysteine dose-dependently accelerated GPx1-mediated H_2O_2 disposal at a similar efficiency to that by GSH, at least at low concentrations of the thiols (Fig. 7a). GSR failed to improve the GPx1-dependent ability of γ -glutamylcysteine, but not that of GSH, at disposing H_2O_2 (Fig. 7b). We also tested the ability of γ -glutamylcysteine to induce protein modification, which was found to be well below that of GSH (Table 3).

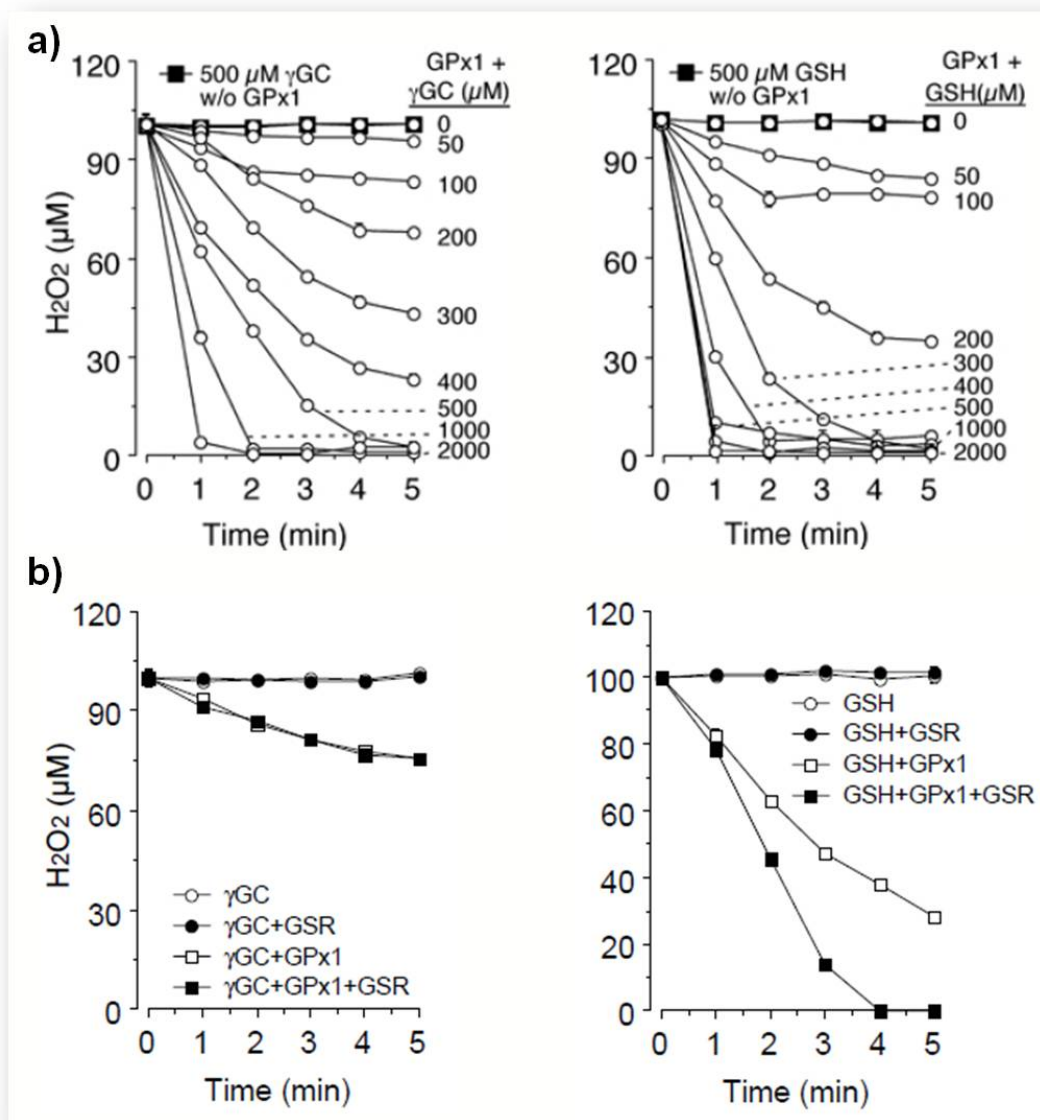


Figure 7. γ -Glutamylcysteine (γ GC) is a glutathione peroxidase-1 (GPx1) cofactor at detoxifying mitochondrial H_2O_2 . (a) γ GC or GSH dose-dependently disposed H_2O_2 *in vitro* only when GPx1 was present. (b) H_2O_2 disposal by GPx1 was not potentiated by GSR in the presence of 200 μ M γ GC, but it was in the presence of 200 μ M GSH. (c) Thiol-redox modification of proteins by γ -glutamylcysteine or glutathione after expression of mitoGCL in HEK293 cells. ND, not detected.

	By γ -glutamylcysteine	By glutathione (pmol/mg protein)
Empty vector	ND	5.69 \pm 0.56
mitoGCL	ND	5.03 \pm 0.36

Table 3. Thiol-redox modification of proteins by γ -glutamylcysteine or glutathione after expression of mitoGCL in HEK293 cells. Results are mean \pm SEM values (n=3); ND, not detected.

Neurons are particularly vulnerable against excess ROS hence requiring continuous supply and regeneration of GSH for survival¹⁵. We therefore investigated the possible efficacy of γ -glutamylcysteine at detoxifying ROS in (patho)physiologically relevant neuronal death models. Glutamate treatment increased mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ in rat primary neurons (Fig. 8a, d), an effect that was abolished by the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist¹⁶, MK801 (Fig. 9c, left panel). Expression of *mitoGCL* in neurons was sufficient to decrease basal mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 8a), which contrasts with the lack of effect in HEK293T cells (Fig. 4c).

The different response of these cells to *mitoGCL* expression is likely due to the above-mentioned vulnerability of neurons to oxidative stress¹⁵ *versus* the resistance of HEK293T cells (Fig. 5c). Furthermore, *mitoGCL*, but not its inactive E103A mutant form, prevented the increase in mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ induced by glutamate-receptor stimulation (Fig. 8a). GPx1 – but not GSS or GSR– knockdown (Fig. 8b) significantly enhanced $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 8c), despite neurons expressed *mitoGCL*, indicating that GPx1 use of γ -glutamylcysteine is essential for γ -glutamylcysteine-mediated $O_2^{\bullet-}$ detoxification in this model of excitotoxicity. Glutamate triggered an increase in the proportion of neurons with annexin V⁺/7-AAD⁻ staining (Fig. 9a) and with active caspase-3 (Fig. 9b), indicating an intrinsic (mitochondrial) mode of apoptotic death; this was prevented by antagonizing the NMDA receptors (Fig. 9c, middle and right panels). Notably, *mitoGCL* largely –but not fully– prevented the rise in the percentage of neurons with the apoptotic phenotype (Fig. 9a,b). In addition, *mitoGCL* abolished $O_2^{\bullet-}$ enhancement triggered by other mitochondrial ROS-inducing agents^{17,18}, such as rotenone, antimycin and 3-nitropropionic acid (3NP) (Fig. 9d).

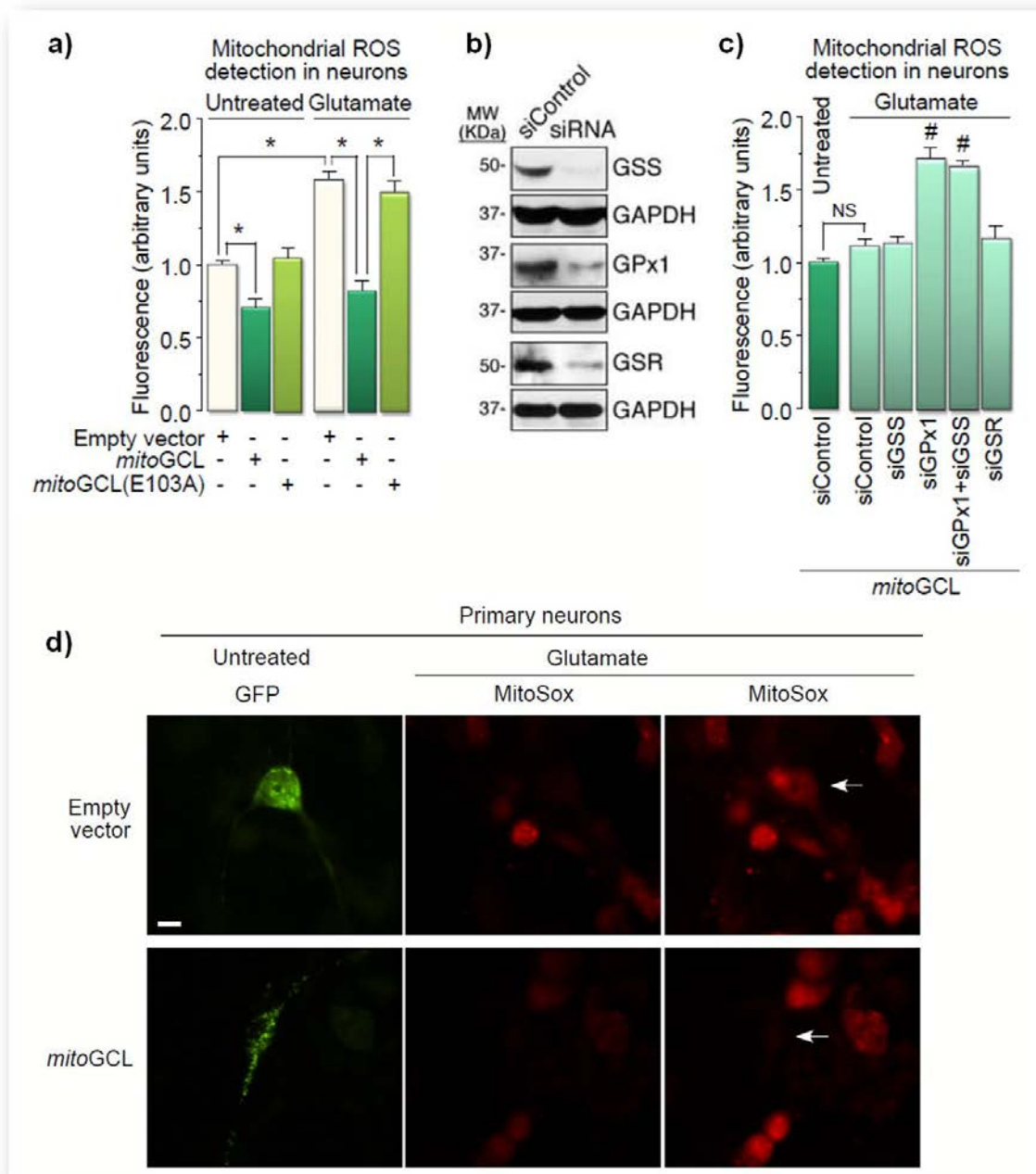


Figure 8. Mitochondrial γ GC potently down-modulates glutamate-derived ROS in primary neurons

(a) Transfection of rat primary neurons with *mitoGCL*, but not with its inactive form (*mitoGCL(E103A)*), significantly decreased basal levels of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$, as quantified by MitoSox fluorescence in the transfected neurons (identified by GFP⁺ fluorescence); *mitoGCL* –but not *mitoGCL(mut)*– fully prevented glutamate (100 μ M/5 min)-induced mitochondrial $O_2^{\cdot-}$, as quantified 24 h after glutamate treatment, by MitoSox fluorescence. (b) Western blots showing the efficacy of siRNA duplexes, used at 100 nM for 3 days in primary neurons, against glutathione synthetase (GSS), glutathione peroxidase-1 (GPx1) and glutathione reductase (GSR). siRNA against luciferase is siControl; GAPDH (Glycerol phosphate dehydrogenase). (c) Silencing glutathione peroxidase-1 (siGPx1), but not glutathione synthetase (siGSS) or glutathione reductase (siGSR), significantly enhanced glutamate-mediated mitochondrial ROS in *mitoGCL*-expressing neurons; such enhancement was not affected by GSS co-silencing. (d) Real-time fluorescence imaging of rat primary neurons incubated with the mitochondrial probe, MitoSox, revealed increased ROS detection by glutamate treatment (40 μ M/15 min) in efficiently transfected neurons (GFP⁺) with the empty vector, but not with the vector expressing *mitoGCL*; scale bar=10 μ m. * p <0.05; # p <0.05 versus siControl (*mitoGCL*) (ANOVA).

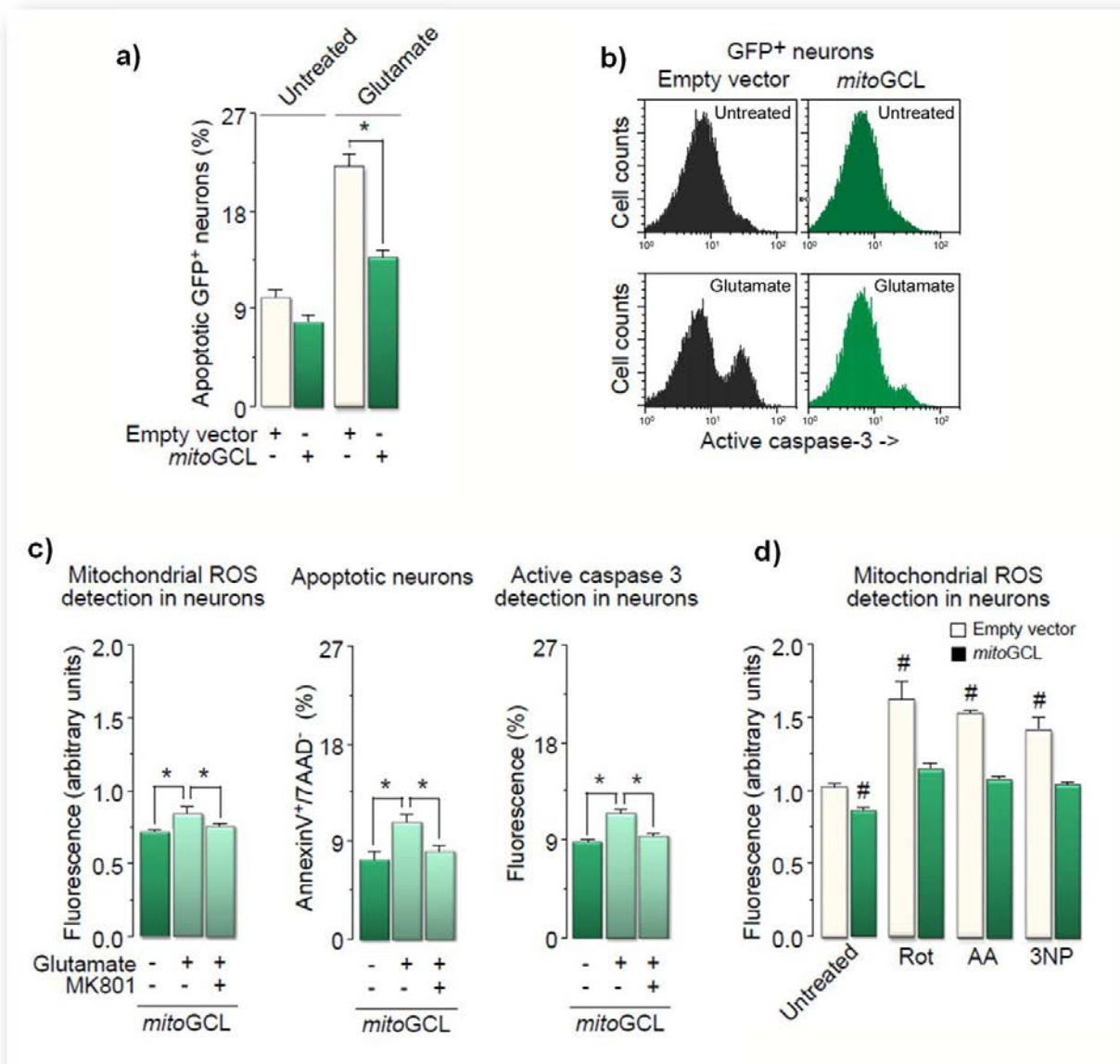


Figure 9. MitoGCL prevents ROS from neurotoxic insults and apoptosis triggered by glutamate NMDA mediated excitotoxicity (a) *mitoGCL* expression prevented neuronal apoptotic death, as revealed by annexin V⁺/7-AAD⁻ neurons 24 h after glutamate treatment (100 μ M/5 min). (b) Expression of *mitoGCL* rescued the increase in active caspase-3 GFP⁺-neurons triggered by glutamate. (c) Blockade of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor with its antagonist, MK801 (1 μ M) prevented the increase in mitochondrial ROS (MitoSox fluorescence; left panel), active caspase-3 neurons (middle panel), and apoptotic (annexin V⁺/7-AAD⁻) neurons (right panel), triggered by the incubation with glutamate (100 μ M/5 min). (d) *MitoGCL* prevented the increase in mitochondrial ROS caused by incubation of neurons with rotenone (Rot, 10 μ M), antimycin A (AA, 10 μ M) or 3-nitropropionic acid (3NP, 2 mM) for 15 min. * p <0.05 (ANOVA).

To confirm that γ -glutamylcysteine exerted neuroprotection *in vivo*, lentiviral particles expressing wild type or inactive (E103A) *mitoGCL* were stereotaxically injected into the *striatum* of adult mice. After three days, striatal GCL activity was significantly higher in mice injected with *mitoGCL* than in those injected with inactive *mitoGCL*(E103A), whereas striatal GSH concentrations remained unchanged (Fig. 10a).

Three days after lentiviral injections, mice were intraperitoneally injected with 3NP (seven doses of 50 mg/kg, twice per day), a well described model of neurodegeneration¹⁸. Indeed, we observed that 3NP treatment induced a significant increase in neuronal apoptotic death in the *striatum*, as judged by TUNEL assay, in the mice pre-injected with inactive *mitoGCL*(E103A), but not in those pre-injected with wild type *mitoGCL* (Fig. 11a,b). Notably, there was a significant loss of striatal neurons in the mice pre-injected with the inactive *mitoGCL*(E103A), but not in those pre-injected with the wild type *mitoGCL* (10c, 11c) Mice treated with vehicle instead of 3NP showed no neuronal loss, regardless of the isoform of *mitoGCL* (wild type or inactive) pre-injected (10c, 11c).

To evaluate behavioral function, these mice were tested for motor coordination and balance. As shown in Fig. 10b, 3NP treatment induced a progressive motor impairment in the mice that were pre-injected with the inactive *mitoGCL*(E103A), but not in those pre-injected with the wild type *mitoGCL*; mice treated with vehicle instead of 3NP showed no motor impairment, regardless of the isoform of *mitoGCL* (wild type or inactive) pre-injected (Fig. 10b).

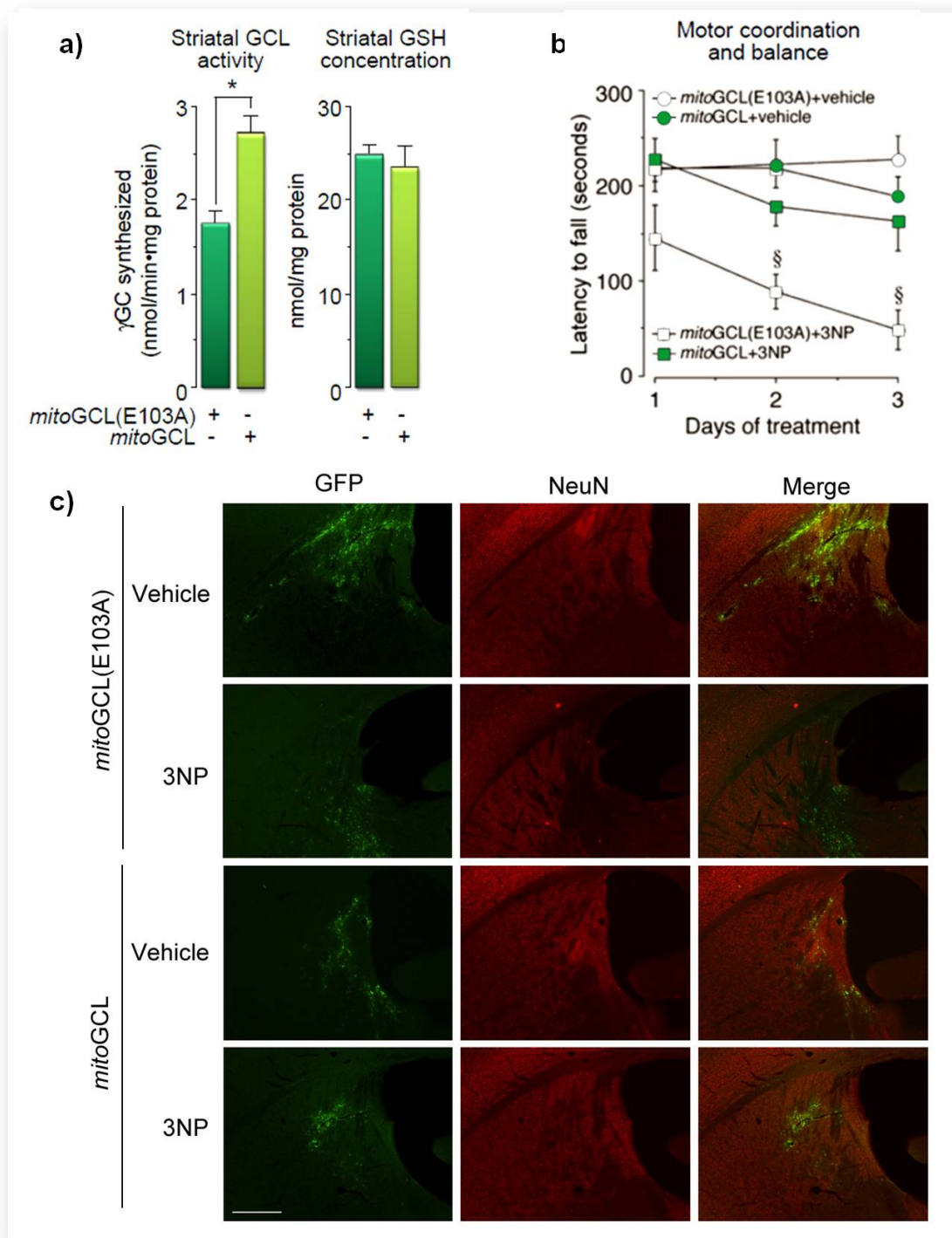


Figure 10. Mitochondrial γ GC exerts *in vivo* neuroprotection (a) Intraestriatal stereotaxic injection of *mitoGCL*-containing lentiviral particles in mouse significantly increased, after 3 days, striatal GCL activity without altering GSH concentration. (b) Three days after lentiviral particles injections, 3NP was intraperitoneally injected, which induced, 3 days later, a progressive motor impairment (rotarod test) in mice pre-injected with inactive *mitoGCL(E103A)*, but with wild type *mitoGCL*; mice treated with vehicle, instead of 3NP, showed no neuronal loss, regardless of the isoform of *mitoGCL* (wild type or inactive) pre-injected. (c) Fluorescence images of coronal sections of mouse brain slices show the survival of neurons (NeuN⁺) efficiently transduced (GFP⁺) with *mitoGCL*, and the loss of neurons transduced with the mutant inactive *mitoGCL(E103A)*, in the striatum of mice subjected to the 3-nitropropionic (3NP) model of neurodegeneration; scale bar=200 μ m. * $p < 0.05$ * ; § $p < 0.05$ versus all conditions on each day (ANOVA); Student's *t* test for panel a. n=6-8 mice for panel b

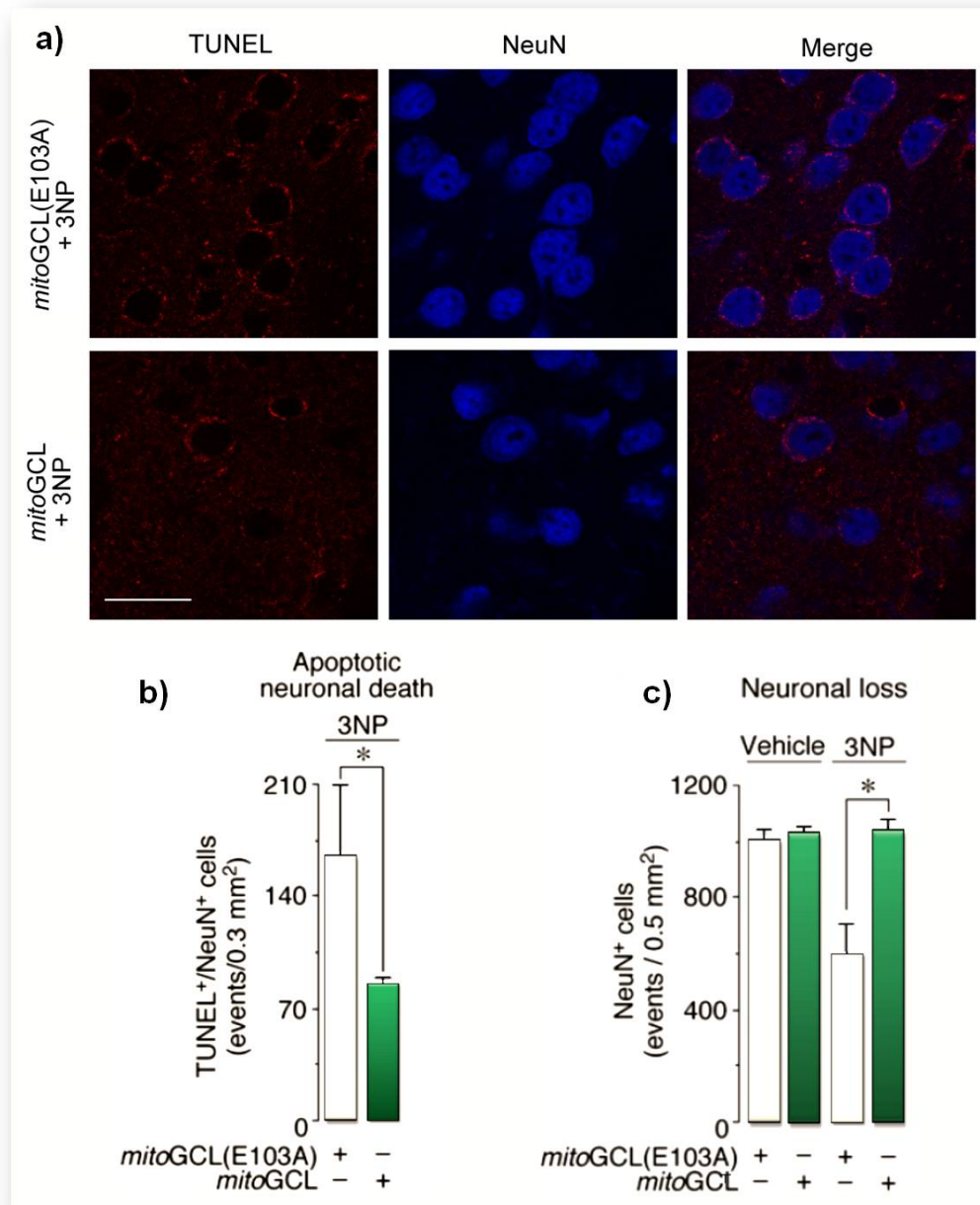


Figure 11. Mitochondrial γ GC improves neuronal survival *in vivo* (a) Confocal images of striatal sections showing neuronal apoptotic death. Three days after lentiviral particles injections, 3NP was intraperitoneally injected (seven doses of 50 mg/kg, twice per day), which induced a significant increase in neuronal apoptotic death (TUNEL⁺/Neu⁺ cells) in the *striatum*, in the mice pre-injected with inactive *mitoGCL(E103A)*, but not in those pre-injected with wild type *mitoGCL*; scale bar=20 μ m. (b) This panel shows the quantitative data of panel g. (c) Three days after lentiviral particles injections, 3NP was intraperitoneally injected, which induced, 3 days later, a significant loss of striatal NeuN⁺ neurons only in the mice that received inactive *mitoGCL(E103A)*, but not in those that received wild type *mitoGCL*; mice treated with vehicle instead of 3NP showed no neuronal loss regardless of the isoform of *mitoGCL* (wild type or inactive) lentiviral particles injected; the quantitative analysis is shown. * $p < 0.05$ (ANOVA); Student's *t* test for panel b.

Discussion

Here we show that γ -glutamylcysteine is a thiol-redox regulator that efficiently detoxifies mitochondrial ROS. This was evidenced by confining γ -glutamylcysteine synthesis to mitochondria, which were unable to convert the newly synthesized γ -glutamylcysteine into GSH due to the lack of mitochondrial GSS¹¹. Thus, down-modulation of mitochondrial ROS by γ -glutamylcysteine took place under physiological GSH concentrations. Furthermore, the robust antioxidant protection observed in intact GSS-knockdown cells corroborates such a role by endogenous γ -glutamylcysteine. Notably, impairing γ -glutamylcysteine biosynthesis in the cytosol, but not in mitochondria, still allowed γ -glutamylcysteine to efficiently detoxify ROS. Together, these results indicate that the antioxidant action of γ -glutamylcysteine takes place regardless of GSH concentrations, thus cannot simply rely on its ability to replenish GSH, as it can be seen in other paradigms¹⁹.

Our results also reveal that GPx1 is an essential component in the detoxifying redox cycle of γ -glutamylcysteine. Furthermore, the occurrence of an oxidized form of γ -glutamylcysteine in all tissues analyzed, *in vivo*, strongly suggests the notion of a γ -glutamylcysteine redox cycle. However, knocking down glutathione reductase (GSR) – presumably required for an eventual regeneration of reduced γ -glutamylcysteine from its oxidized form – failed to enhance $O_2^{\bullet-}$. The biochemical pathway responsible for the reduction of γ -glutamylcysteine from its oxidized form therefore remains to be elucidated. On the other hand, a putative function of γ -glutamylcysteine as direct superoxide anion scavenger is disregarded, since SOD2 knockdown could not further enhance rotenone-induced $O_2^{\bullet-}$. Our data obtained by knocking down GPx1, both in the human HEK293T cells and in rat neurons, together with the *in vitro* experiments, strongly suggest that endogenous γ -glutamylcysteine is a GPx1 cofactor for H_2O_2 detoxification. It cannot be ruled out that γ -glutamylcysteine could also act as a cofactor for other isoforms of the glutathione peroxidase family; however, GPx1 largely accounts for most mitochondrial H_2O_2 detoxification¹⁴, suggesting a major role for this isoform. Moreover, previous studies have shown that GPx1 can accept, albeit at a much

lower efficiency, a range of thiol-derivatives besides GSH as the electron donor²⁰. The essential cysteinyl-sulfhydryl and glutamyl-carboxylic groups for GPx1 active site interaction and catalysis¹⁴ are both preserved in γ -glutamylcysteine, indicating the structural feasibility for this function.

Due to its very low ability to synthesize and regenerate GSH, the brain is one of the most vulnerable tissues to excess ROS^{15,21}. In Parkinson's disease, there is a ~60% reduction in GSH concentration in the *substantia nigra* of presymptomatic patients²², suggesting GSH deficiency as one of the earliest biochemical signs of this disorder. Moreover, signs of excess ROS are associated with the pathophysiology of other neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, or disorders affecting motor functional disturbances such as Amyotrophic Lateral Sclerosis or Huntington's disease²³. At the light of our data, GPx1 is essential for γ -glutamylcysteine-mediated ROS detoxification and neuroprotection against different insults triggering neurodegeneration in primary neurons. Furthermore, we also show neuroprotection and motor improvement in an *in vivo* mouse model of neurodegeneration¹⁸. Thus, targeting γ -glutamylcysteine to neuronal mitochondria represents an improvement over the protection activity of neighboring astrocytes^{24,25}.

In conclusion, our results demonstrate that γ -glutamylcysteine is a thiol-redox regulator that efficiently detoxifies mitochondrial ROS through GPx1. In the presence of γ -glutamylcysteine taking an antioxidant function, GSH stops from being oxidized; moreover, the ability of γ -glutamylcysteine to induce protein modification is well below that of GSH. Thus, when γ -glutamylcysteine takes the antioxidant functions, GSH utilization may be preserved for iron-sulfur cluster assembly and protein thiol-redox modifications, as recently reported⁹. How the antioxidant role of γ -glutamylcysteine is regulated under (patho)physiological conditions now needs to be deciphered. In this context, it should be noted that, besides GCL, alternative pathways can account for intracellular γ -glutamylcysteine^{2,3}. For instance, γ -glutamyltransferase (GGT) forms γ -glutamylcysteine at the extracellular side of the plasma membrane and then is taken up by the cells through the glutamyl-amino acid transporter². It would be interesting to investigate if increased γ -glutamylcysteine could explain the drug resistance observed in tumors associated with GGT overexpression²⁶. In addition, whether GSH deficiency is

Summary

the prime mode of the pro-oxidant actions of the GCL/GSS/glutamyl-amino acid transporter inhibitor, L-buthionine sulfoximine⁴ needs to be revisited. Finally, our results, showing neuroprotection by mitochondrial-targeted γ -glutamylcysteine biosynthesis, supports the oxidative hypothesis of neurodegeneration²⁷. Whilst classical antioxidant drugs failed in clinical trials against neurodegenerative disorders²⁸, *mitoGCL*, by acting as a persistent antioxidant source for mitochondria, may represent a new gene therapy strategy to improve the transient efficacy of the formers.

Methods

1. Plasmids construction.

The 5'-end of the full-length cDNA (2,023 bp) encoding the catalytic subunit of human glutamate-cysteine ligase (GCL; GenBank™ accession number NM_012815)⁵ was fused with a cDNA fragment encoding the first 32 amino acids of human ornithine transcarbamylase (GenBank™ accession number NM_000531), previously shown to represent the mitochondrial-targeting signal^{40,41}. The forward and reverse oligonucleotides of this fragment were, respectively:

5'-

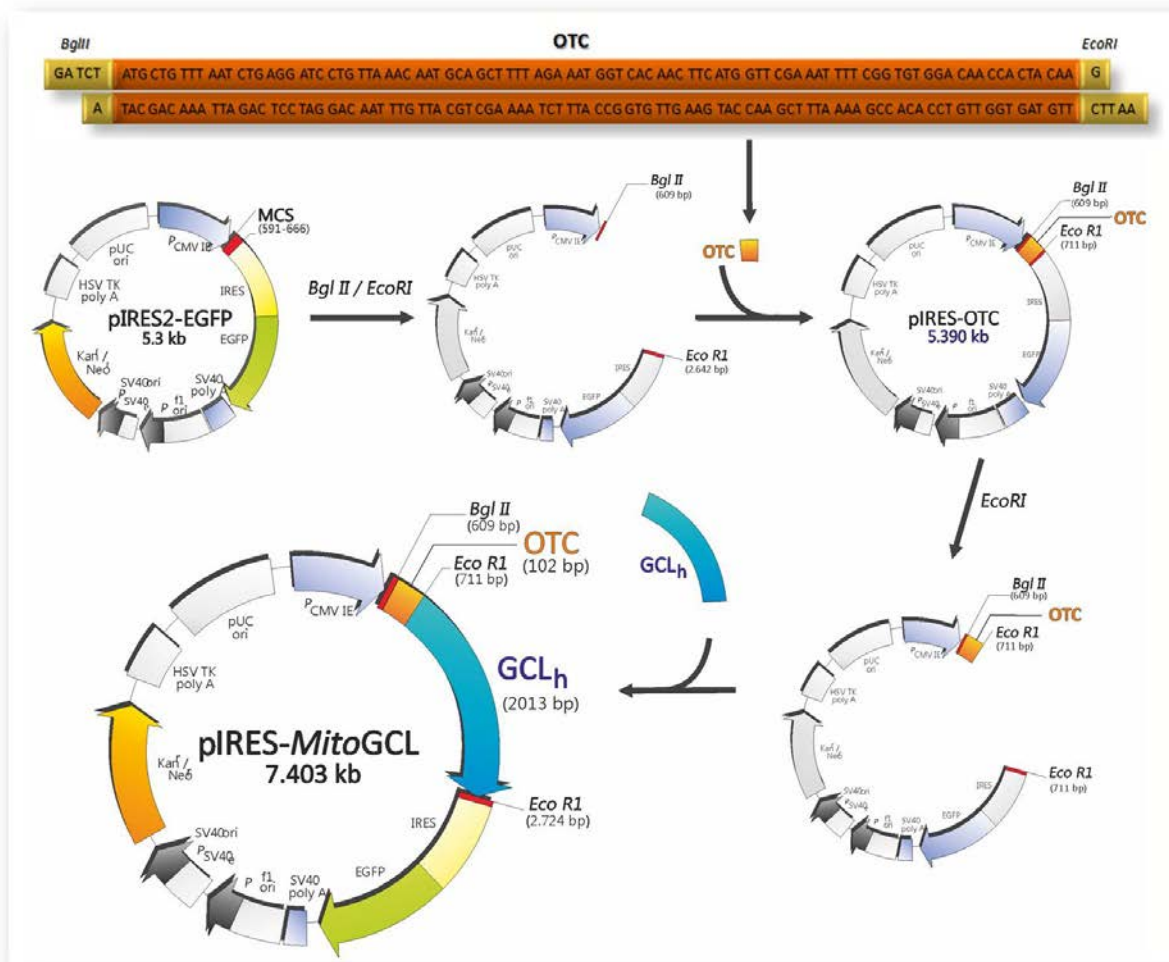
GATCTATGCTGTTTAATCTGAGGATCCTGTTAAACAATGCAGCTTTTAGAAA
TGGTCACAACCTTCATGGTTCGAAATTTTCGGTGTGGACAACCACTACAAG-3'
 and

5'-

AATTCTTGTAGTGGTTGTCCACACCGAAAATTTTCGAACCATGAAGTTGTGAC
CATTTCTAAAAGCTGCATTGTTTAACAGGATCCTCAGATTAACAGCATA-3'
 (*Bgl*III and *Eco*RI sites underlined) (Thermo Scientific, Offenbach, Germany). The fused cDNA construct (*mito*GCL) was inserted in pIRES2-EGFP (Invitrogen) vector and sequence-verified; *mito*GCL was then subcloned into pcDNA3.1⁺ (Invitrogen) and into pIRES2-DsRed2 (Clontech, Laboratories Inc. Palo Alto, CA, USA) with *Nhe*I/*Sma*I or *Nhe*I/*Xma*I restriction enzymes, respectively. To direct GCL expression to the cytosol we used non-tagged GCL⁵. To knockdown GCL we used a vector-based small hairpin RNA (shRNA) approach using the targeting sequence 5'-GAAGGAGGCTACTTCTATA-3', as we previously described⁵. For control transfections, we used the firefly luciferase-targeted oligonucleotide 5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3', as previously described²⁹. In all cases, the forward and reverse 64 nt-long oligonucleotides (Isogen Life Science, Maarsen, The Netherlands) were annealed and inserted into the *Bgl*III/*Hind*III sites of pSuper-neo/GFP vector (OligoEngine, Seattle, WA). These constructions express 19-bp, 9-nucleotide stem-loop shRNAs, targeted against the catalytic subunit of human GCL or luciferase

Summary

mRNAs. The concomitant expression of green fluorescent protein from these pSuper-neo/GFP-derived vectors allowed the identification of transfected cells by fluorescence microscopy and flow cytometry.



Scheme I. MitoGCL plasmid construction. Restriction sequences containing the *Bgl*III and *Eco*RI motifs were added to the mitochondrial leading sequence of ornithine transcarbamylase (OTC). Then, OTC mitochondrial epitope was subcloned fused to the N-terminal domain of GCL sequence in the multiple cloning site (MCS) of a pIRES2-EGFP, giving the final construction pIRES-MitoGCL.

1.1. Site-directed mutagenesis.

To generate a mutant form of *mitoGCL* refractory to the shRNA against GCL (*mitoGCLmut*) we used the site-directed mutagenesis QuikChange XL kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), followed by *Dpn*I digestion. The forward and reverse

oligonucleotides of the sequence 5'-GAAAGAAGCCACGTCAGTT-3', carrying silent third-codon base point mutations (mutant nucleotides underlined) were used. To generate a catalytically inactive form of *mitoGCL*, we obtained a E103A mutant¹² using the forward and reverse oligonucleotides of the sequence 5'-CAGAGTATGGGAGTTACATGATTGCAGGGACACCTGGCCAGCCGTACGGA-3' (mutant nucleotides underlined). Polymerase chain reaction (PCR) conditions were 1 min at 95°C, 18 cycles of 50 s at 95°C, 50 s at 60°C, 1 min per plasmid kb at 68°C; final extension was carried out for 10 min at 68°C.

Site directed mutagenesis	
<p><i>MitoGCL</i> mut</p> <p>Sense oligonucleotide: 5'- CATGAGGAAACGCCGAA<u>AGA</u><u>AGCC</u><u>ACGTC</u><u>AGTT</u>TTAGGAGAACATCAG-3'</p> <p>Antisense oligonucleotide: 5'- CTGATGTTCTCCTAA<u>AA</u><u>ACT</u><u>GAC</u><u>GTGG</u><u>CTTCT</u>TTCCGGCGTTTCTCATG-3'</p>	<p>PCR conditions</p> <p>1' a 95 °C</p> <p>50s a 95°C</p> <p>50s a 60 °C</p> <p>8' a 68°C</p> <p>10' a 68 °C</p> <p>18 times</p>
<p><i>MitoGCL</i> (E103A)</p> <p>Sense oligonucleotide: 5'- CAGAGTATGGGAGTTACATGATT<u>GCA</u>GGGACACCTGGCCAGCCGTACGGA-3'</p> <p>Antisense oligonucleotide: 5'- TCCGTACGGCTGGCCAGGTGTC<u>CC</u><u>TGCA</u>AATCATGTA<u>ACT</u>CCCATACTCTG-3'</p>	

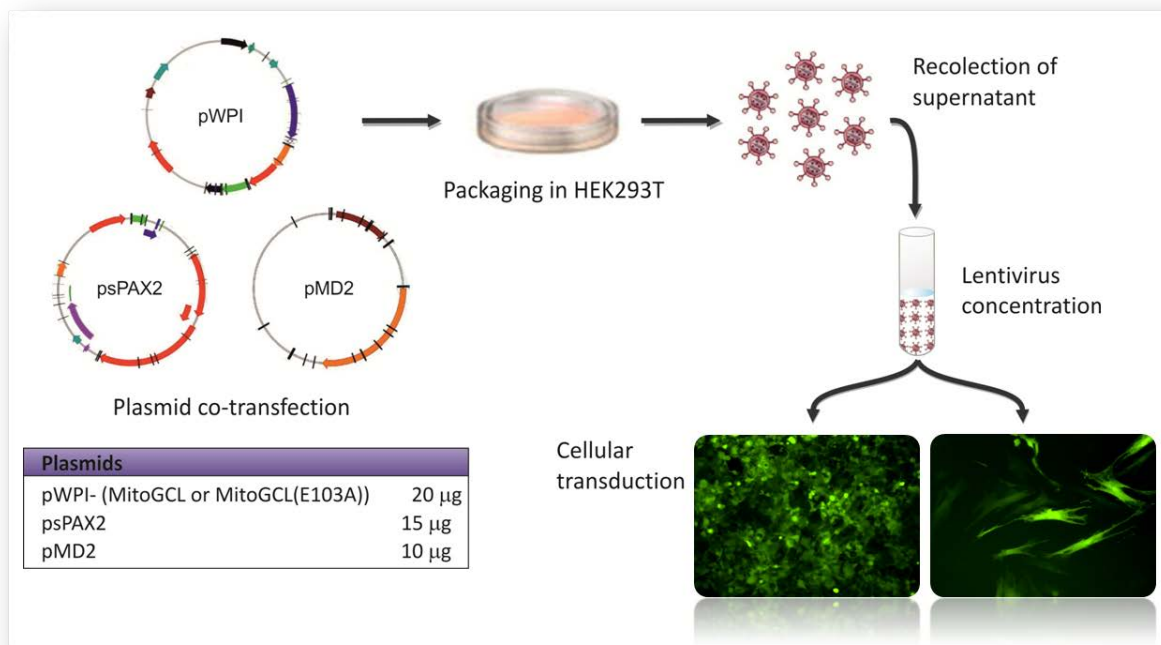
Table II. Oligonucleotides used to mutate *mitoGCL*. Oligonucleotides to create the refractory form to shGCL, *mitoGCL*(mut), are represented in the upper part, with silent point mutations underlined. The oligonucleotides used to mutate the residue 103 of *mitoGCL* (underlined) are also represented.

2. Production of lentiviral particles

The full-length cDNA encoding *mitoGCL* was digested with Eco47III/SmaI restriction enzymes to generate blunt ends, and then subcloned into the *PmeI* site of pWPI lentiviral vector (*mitoGCL*-pWPI) (Didier Trono laboratory, Lausanne, Switzerland). To generate recombinant lentivirus we used a standard protocol³⁰. In brief, Human Embryonic Kidney (HEK293T) cells were seeded at 2×10^6 cells/cm² in 60 cm²

Summary

dishes and then transiently transfected with a mixture of 20 µg of the *mitoGCL*-pWPI, 10 µg of pMD2 (packaging plasmid) and 15 µg of pPAX2 (envelope plasmid) (Didier Trono laboratory), using 1 µM polyethylenimine (PEI) transfection reagent. 72-h after transfection, supernatants were collected, centrifuged at 300xg for 5 min and filtered through a 0.45 µm filter (Millex-HV PDVF, Millipore, Cork, Ireland). This crude virus fraction was concentrated by ultracentrifugation at 20,000xg for 2 h at 4°C, re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7.8 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄; pH 7.4) and stored at -80°C until used. Viral titers were determined after incubation of 3T3 cells with increasing dilutions of lentivirus in the presence of 8 µg/ml polybrene (Millipore). After an overnight incubation with lentiviral particles, medium was changed and cells were allowed to express GFP protein during 48 h, collected and analyzed for GFP fluorescence quantification by flow cytometry. Lentiviral particles were re-suspended to a final concentration of 1.7x10⁶ plaque formation units (p.f.u.)/µl.



Scheme II. Lentiviral particles production. To produce lentiviral particles, we co-transfected HEK293T cells with pWPI, psPAX2 and pMD2 plasmids, coding for protein expression plasmid, viral capsid and viral envelope, respectively. Culture medium with lentiviral particles was collected, filtered and concentrated by centrifugation. Lentiviral concentrate was added to 3T3 cells to quantify the efficiency of transduction and concentration.

3. Small interfering RNA (siRNA)

Using previously reported rational criteria^{31,32}, we designed the following target sequences to get gene expression-specific knockdown by siRNA. For glutathione synthetase (GSS): 5'-AGGAAATTGCTGTGGTTTA-3' (nucleotides 856-874 of the human sequence NM_000178) and 5'-AGAGAAGGAAAGAAACATA-3' (nucleotides 713-731 of the rat sequence NM_012962).

siRNA sequences			
<u>Protein</u>	<u>Access number</u>	<u>Sequence</u>	<u>Position</u>
GSS	NM_000178 (humano) NM_012962 (rat)	5'- AGGAAATTGCTGTGGTTTA -3' (Neurons)	856-874
		5'- AGAGAAGGAAAGAAACATA - (HEK293T)	713-731
GSR	NM_000637 (humano) NM_053906 (rat)	5'-TGAAACAGATCGAAATCAA -3'	499-517
		5'- GGACCTGAGTTTAAACAAA - 3' (Neurons)	1154-1172
		5'- AGACGAATTCAGAATACC - 3' (HEK293T)	1211-1229
GPx1	NM_00581 (humano) NM_030826.3 (rat)	5'- GCACGGAGGAGCTGGAGAA - 3'	967-983
		5'- CGCCAAGAACGAAGAGATT - 3' (Neurons and HEK293T)	338-356
SOD2 (MnSOD)	NM_000636 (humano) NM_017051 (rat)	5'- GGTTCGAGCCCAACTTCATGCTCTT -3' (*)	391-415
		5'- GGGAGTTGCTGGAAGCCAT - 3'	381-399
Luciferase		5'- CTGACGCGGAATACTTCGATT -3'	

Table II. siRNA sequences. siRNAs were designed to recognise human and rat variants of the same protein. Up to three different sequences were designed and tested for glutathione synthetase (GSS), glutathione reductase (GSR), glutathione peroxidase 1, superoxide dismutase 2 (SOD2) and luciferase (Control siRNA). The most effective siRNAs sequences at downregulating proteins were selected (in bold characters) (*) Zhang et al.⁴²

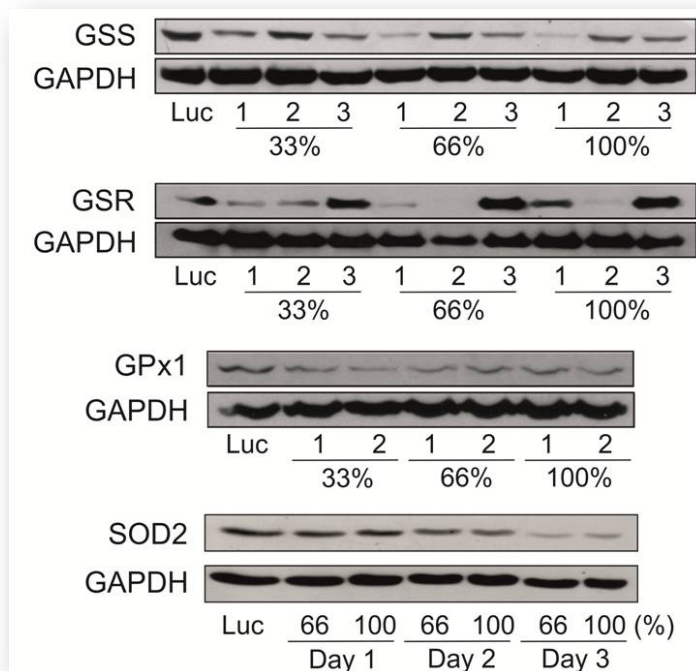


Figure I. siRNA selection.

siRNAs were selected through a rational design method and were tested in HEK 293T (shown in this figure) and neurons. Selection of siRNAs was based on the higher dose-response to silence glutathione synthetase (GSS), glutathione reductase (GSR), glutathione peroxidase-1 (GPx1) or superoxide dismutase 2 (SOD2). In the figure are represented the percentages of siRNA (higher dose=100 nM) and number of siRNA tested for each protein.

For glutathione reductase (GSR): 5'-AGACGAATTCCAGAATACC-3' (nucleotides 1211-1229 of the human sequence NM_000637) and 5'-GGACCTGAGTTTAAACAAA-3' (nucleotides 1154-1172 of the rat sequence NM_053906). For glutathione peroxidase-1 (GPx1): 5'-CGCCAAGAACGAAGAGATT-3' (nucleotides 338-356 for both human, NM_00581, and rat, NM_030826.3 sequences). Superoxide dismutase-2 (SOD2 or MnSOD): 5'-GGGAGTTGCTGGAAGCCAT-3' (nucleotides 381-399 for both human, NM_000636, and rat, NM_017051 sequences). In all cases, a siRNA against luciferase (5'-CTGACGCGGAATACTTCGATT-3'), was used for control transfections. We purchased the high-pressure liquid chromatography-purified siRNAs from Dharmacon (Abgene, Thermo Fisher, Epsom, UK).

4. Cell culture

Cortical neurons in primary culture were prepared from fetal Wistar rats (E16), seeded at 2.5×10^5 cells/cm² in six- or 12-well plates previously coated with poly-D-

lysine (15 $\mu\text{g/ml}$) in DMEM (Sigma, Madrid, Spain) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, Roche Diagnostics, Heidelberg, Germany). Cells were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified 5% CO_2 -containing atmosphere. At 48 h after plating, the medium was replaced with DMEM supplemented with 5% horse serum (Sigma), 20 mM D-glucose and, on day 4, cytosine arabinoside (10 μM) to prevent non-neuronal proliferation⁴³. Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T) cells were maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS.

5. Cell transfections and treatments

Transfections of primary neurons with siRNAs were performed at day 3 *in vitro*, although experiments and sample collection were done at day 6. In all siRNA-mediated knockdown experiments, a preliminary set of transfections were performed using a range of 20 to 100 nM of each siRNA to obtain a concentration-dependent knockdown effect; however, the results shown correspond to those experiments using 100 nM of each siRNA. Transfections of primary neurons with plasmid vectors were performed at day 4 or 5 *in vitro*. In these, we used 0.4–1.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each plasmid. All transfections in neurons were performed using Lipofectamine2000 (Invitrogen, Madrid, Spain), following the manufacturer's instructions, also described elsewhere⁴⁴. After 6 h, the medium was removed and cells were further incubated, for the times indicated in the figures, in the presence of culture medium. For plasmids, the transfection efficiencies in neurons were, approximately, 7%, as judged by the proportion of GFP⁺ neurons versus total number of neurons (as evidenced by DAPI-staining); for siRNA duplexes, the transfection efficiencies were >90%, as judged by the level of protein knockdown shown in the corresponding figures. For experiments involving glutamate-receptor stimulation, neurons were incubated at day 6 *in vitro* (i.e., 1-3 days after transfections, when applicable) with 100 μM glutamate (in the presence of 10 μM glycine) in buffered Hank's solution (134.2 mM NaCl, 5.26 mM KCl, 0.43 mM KH_2PO_4 , 4.09 mM NaHCO_3 , 0.33 mM Na_2HPO_4 , 5.44 mM glucose, 20 mM HEPES, 4 mM CaCl_2 , pH 7.4) for 5 min, following a standard procedure¹⁶, washed, and further incubated for 24 h

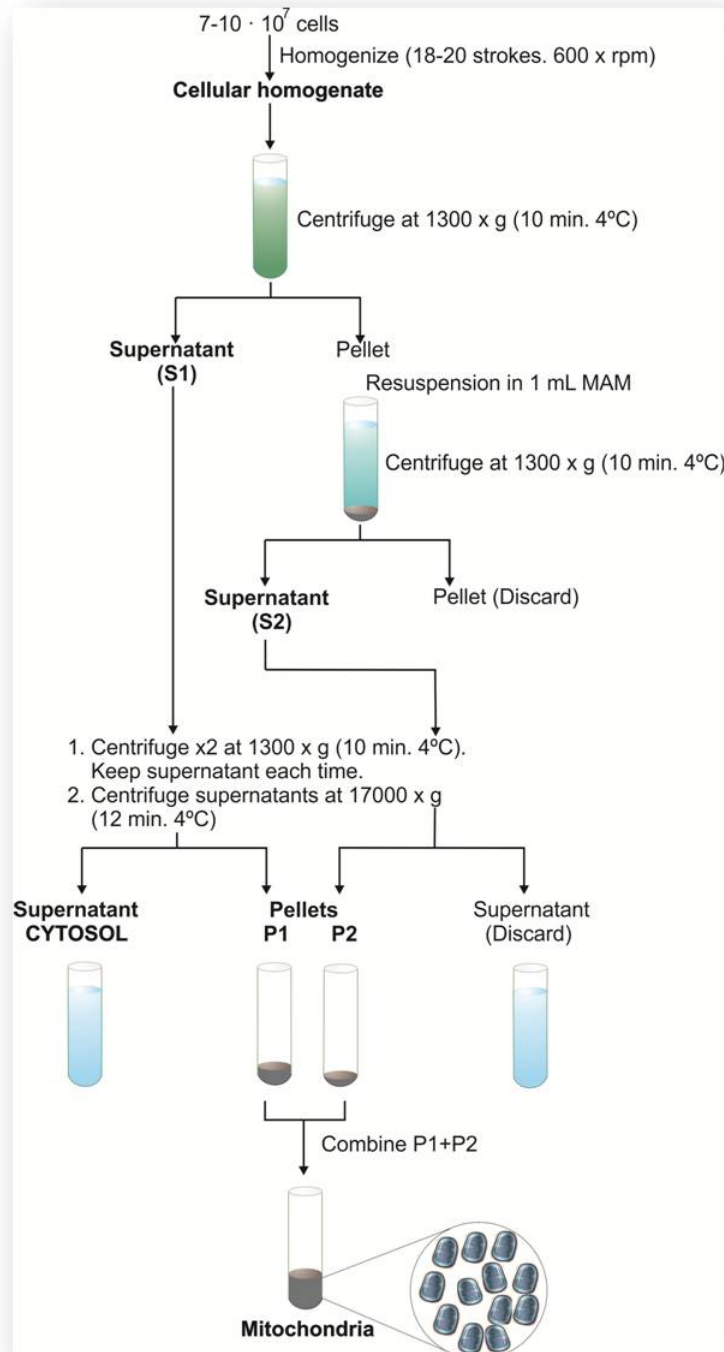
Summary

post-stimulation (unless otherwise specified) in DMEM. To block N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, neurons were pre-incubated with 10 μ M of MK801 (Sigma) 5 min before glutamate additions. In some experiments, instead of glutamate, neurons were incubated in the presence of rotenone (Rot, 10 μ M), antimycin A (AA, 10 μ M) or 3 nitropropionic acid (3-NP, 2 mM). For HEK293T cell treatment, cells were seeded at 1×10^5 cells/cm² or 5×10^4 cells/cm² for experiments involving nucleic acid transfections. In these cases, the cells were used 24 h after transfections with plasmids or 3 days after transfections with siRNAs. For siRNAs, we used Lipofectamine2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions, and for plasmids, we used 1 μ M polyethylenimine (PEI, Sigma)⁴⁵ with some modifications. Briefly, a mix of PEI with the corresponding DNA plasmid was added to cells after an incubation step of 10 min at room temperature in Optimem medium (Invitrogen). Cells were then incubated with this PEI/DNA-containing solution at 37°C during 1 h, followed by washing with PBS and incubation in DMEM supplemented with either 10% or 0.05% FCS (v/v). In some experiments, HEK293T cells were incubated with rotenone (1 μ M for 4 h, or 10 μ M for 15 or 45 min, as indicated) 3-NP (10 mM for 2 h).

6. Subcellular fractionation

To fractionate cytosol from intact mitochondria, we used a differential centrifugation protocol³³. In brief, cells grown in 145 cm² dishes (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) were collected in mitochondria isolation buffer (MIB, 320 mM sucrose, 1 mM potassium EDTA, 10 mM Tris-HCl and the protease inhibitor cocktail (2 mM AEBSF, 0.3 μ M Aprotinin, 130 μ M Bestatin, 1 mM EDTA, 14 μ M E-64, 1 μ M Leupeptin, catalog number P2714, Sigma) at pH 7.4. Cells were centrifuged at 600xg for 5 min at 4°C and the pellet re-suspended in MIB. After a 18 stroke homogenization step in a tight-fitting glass-teflon homogenizer, homogenate was centrifuged three times at 1300xg for 10 min at 4°C, keeping the supernatants in every step. The mitochondrial pellet that resulted from the final centrifugation (at 17,000xg for 12 min at 4°C) was re-suspended in MIB (for reactive oxygen species and enzymatic analysis) or RIPA buffer (see composition below under western blotting subsection), and the supernatant was

kept on ice (cytosolic fraction). To obtain reproducible results, only enriched mitochondrial and cytosolic fractions were used for the experiments, which were always assessed by the analysis of citrate synthase or lactate dehydrogenase activities, as previously described³³.



Scheme III. Subcellular fractionation. Mitochondrial and cytosolic fractions were obtained from HEK293T cells homogenized at 4°C in a tight-fitting glass-teflon homogenizer. After a centrifugation step at $1,300 \times g$ (10 min, 4°C), supernatants were collected (S1). After the resuspension of the pellet in MIB buffer and centrifugation in the same conditions, supernatant was also collected, giving the S2 resuspension. Both S1 and S2 were further centrifugated in the same conditions until no pellet was observed. The pellets from the final centrifugation step at $17,000 \times g$ (12 min, 4°C), were considered as the mitochondrial fraction, whereas supernatant from S1 constituted the cytosolic fraction.

7. Western blotting

Cells or subcellular fractions were lysed in RIPA buffer (2% sodium dodecylsulphate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA and 50 mM Tris pH 7.5), supplemented with phosphatase inhibitors (100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 μ g/ml antipain, 50 μ g/ml pepstatin, 50 μ g/ml amastatin, 50 μ g/ml leupeptin, 50 μ g/ml bestatin, 1 mM *o*-vanadate, 50 mM NaF, and 50 μ g/ml soybean trypsin inhibitor) and boiled for 5 min. Extracts were centrifuged at 13,000xg for 5 min at 4°C, and aliquots of lysates (20-90 μ g protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) electrophoresis on a 8, 10 or 12% acrylamide gel (MiniProtein[®], BioRad) including BenchMark[™] (Invitrogen) or Dual Colors[™] (BioRad) as prestained protein ladders. The resolved proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham Bioscience Europe GmbH, Barcelona, Spain). Membranes were blocked with 5% (w/v) low-fat milk in 20 mM Tris, 500 mM NaCl, and 0.1% (w/v) Tween 20, pH 7.5, for 1 h. After blocking, membranes were immunoblotted with rabbit polyclonal anti-GCL⁵, rabbit polyclonal anti-GPx1 (ab59546, Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-GSS (Sc-166882, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany), mouse monoclonal anti-GSR (Sc-133159, Santa Cruz Biotechnologies), mouse monoclonal anti-SOD2 (ab16956, Abcam), rabbit polyclonal anti-VDAC (Calbiochem, Darmstadt, Germany), or mouse monoclonal anti-GAPDH (1:40,000 dilution, Ambion, Cambridge, UK) antibodies, at dilutions ranging from 1:500 to 1:1000, unless otherwise stated, overnight at 4°C. VDAC and GAPDH were used as mitochondrial and cytosolic (or whole cell) loading controls, respectively. After incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000 dilution, Pierce, Thermo Fischer Scientific) or goat anti-mouse IgG (1:1000 dilution, BioRad), membranes were immediately incubated with the enhanced chemiluminescence kit SuperSignal West Dura (Pierce, Thermo Scientific, Illinois, USA) for 5 min, before exposure to Kodak XAR-5 film for 1-5 min, and the autoradiograms scanned.

Antibodies				
Antibody	Host	Dilution (application)	Clon (Reference)	Brand
Glutamate cysteine ligase (Catalytic subunit. GCL _H)	Rabbit (polyclonal)	1:1000 (WB)	ab17926	Abcam
Glutamate cysteine ligase (Catalytic subunit. GCL _H)	Rabbit (polyclonal)	1:40 (ICC) 1:40 (WB)	[Díaz-Hernández, 2005, 38992]	Producción propia
Glutathione Peroxidase1 (GPx1)	Rabbit (polyclonal)	1:1000 (WB)	ab59546	Abcam
Glutathione synthetase (GSS)	Mouse (monoclonal)	1:1000 (WB)	Clon H-7 (Sc 166882)	Santa Cruz
Glutathione Reductase (GSR)	Mouse (monoclonal)	1:1000 (WB)	Clon B-12 (Sc 133159)	Santa Cruz
Superoxide Dismutase 2 (SOD2) o MnSOD	Mouse (monoclonal)	1:2000 (WB)	Clon 2A1 (ab16956)	Abcam
Porin or Voltage Dependent Anion Channel (VDAC)	Rabbit (polyclonal)	1:1000 (WB)	Ab5	Calbiochem
Gliceraldehyde 3-phosphate deshidrogenase (GAPDH)	Mouse (monoclonal)	1:40000 (WB)	Clon 6C5 (AM4300)	Ambion
Neuronal Nuclear Protein (NeuN)	Mouse (monoclonal)	1:1000 (IHC)	Clon A-60 (MAB377)	Chemicon
Green Fluorescent Protein (GFP)	Rabbit (polyclonal)	1:1000 (IHC)	ab290	Abcam
Secondary antibodies				
Mouse anti-IgG (H + L) conjugated with HRP	Goat (polyclonal)	1:1000 (WB)	32230	Pierce
Rabbit anti-IgG (H + L) conjugated with HRP	Goat (polyclonal)	1:1000 (WB)	1858415	Pierce (Thermo)
Rabbit anti-IgG (H + L) conjugated with Alexa 488	Goat (polyclonal)	1:500 (ICQ)	A11008	Molecular Probes (Invitrogen)
Mouse anti-IgG (H + L) conjugated with Alexa 594	Goat (polyclonal)	1:500 (ICC)	A-20004	Molecular Probes (Invitrogen)
Rabbit anti-IgG (H + L) conjugated with Cy5	Goat (polyclonal)	1:400 (ICC)	111-175-144	Jackson Immuno
Mouse anti-IgG (H + L) conjugated with Cy3.	Goat (polyclonal)	1:500 (FC)	111-165-003	Jackson Immuno

Table III. Antibodies used in this work. Primary and secondary used for protein expression analysis by western blot (WB), flow cytometry (FC), immunocytochemistry (ICQ) and immunohistochemistry (IHC). Dilutions used, clones, references and suppliers are also specified.

8. Determination of reactive oxygen species (ROS)

Mitochondrial superoxide was detected using the fluorescent MitoSox probe (Invitrogen). To perform this, cells were incubated in Hank's buffer with 2 μM MitoSox-Red for 30 min at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere, washed with PBS, and the fluorescence assessed by flow cytometry or fluorescence microscopy. We used the FL1, FL2 and FL3 channels of a FACScalibur flow cytometer (15 mW argon ion laser tuned at 488 nm; CellQuest software, Becton Dickinson Biosciences). Thresholds were adjusted by using non-stained and stained cells for MitoSOX fluorescence, and transfected and non-transfected cells for GFP fluorescence. The rate of H_2O_2 production in mitochondria and whole cells were assessed using the luminescent AmplexRed™ probe (Invitrogen) or the fluorogenic pHyPer-dMito plasmid vector (Evrogen, Moscow, Russia). For H_2O_2 assessment in isolated mitochondria, 50 μg protein-aliquots of freshly-obtained mitochondria were incubated with 100 μM AmplexRed in mitochondrial respiration buffer (125 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0.5 mg/ml bovine serum albumin and 10 mM HEPES, pH 7.4) containing horseradish peroxidase (0.5 U/ml). Luminescence was recorded for 45 min at 1 min intervals using a Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) fluorimeter (excitation: 538 nm, emission: 604 nm), and the slopes were used for calculations. For H_2O_2 assessment in whole cell, 1.5×10^4 cells were incubated in 100 μM AmplexRed in Krebs-Ringer Phosphate buffer (145 mM NaCl, 5.7 mM Na_2PO_4 , 4.86 mM KCl, 0.54 mM CaCl_2 , 1.22 mM MgSO_4 and 5.5 mM glucose, pH 7.4), and the luminescence recorded as we did for mitochondria. Mitochondrial H_2O_2 was also detected by fluorescence microscopy in seeded, intact cells following the green fluorescence emitted by cells transfected with pHyPer-dMito plasmid vector, which express a mitochondrial-tagged H_2O_2 -sensitive fluorescent probe.

9. *In vitro* H_2O_2 quantification

To assess the *in vitro* reaction of GSH or γGC with H_2O_2 , we used a previously described protocol³⁴. GSH or γGC (at concentrations ranging from 0 to 2000 μM) were

incubated with H₂O₂ (100 μM), either in the absence or in the presence of 5 U/ml of GPx1 purified from bovine erythrocytes (catalog number 3167, Sigma), and/or (as indicated) 5 U/ml of GSR from bakers yeast (catalog number 3664, Sigma) in reaction buffer (0.1 M NaHPO₄, 1 mM EDTA diK⁺, 0.4 mM NADPH, pH 7.4) at 25°C. The reaction was stopped every 1 min by the addition of 11.4 mM HCl. Then, 3.2 mM ammonium ferrous sulfate hexahydrate (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ and 180 mM KSCN (final concentrations) were added, and the absorbance at 492 nm after 10 min of incubation at room temperature was measured, in a 96-well plate reader (Multiscan Ascent, Thermolabsystems, Belgium). For the calculations, we used a standard curve using 0-240 μM H₂O₂.

10. Determination of lactate dehydrogenase and citrate synthase activities

These were determined as described³³ using 10 μg of protein in a final volume of 1 ml. Lactate dehydrogenase was determined following the rate in the change of absorbance at 340 nm in a 80 mM Tris buffer containing 200 mM NaCl and 0.28 mM NADH at pH 7.5 and at 30°C. Citrate synthase was determined following the rate in the change of absorbance at 412 nm in a 100 mM Tris-HCl buffer containing 0.2 mM oxaloacetate, 0.1 mM acetyl-CoA, 0.2 mM DTNB and 0.1% (v/v) Triton X-100, at pH 8.0 and at 30°C.

11. Determination of γ-glutamylcysteine concentration and GCL activity

This was performed essentially following a previously described method³⁵. In brief, cells were washed, carefully harvested with 1 mM EDTA in PBS, pelleted (500xg for 5

Summary

min), and re-suspended in isolation medium (320 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4). Mitochondrial fraction was obtained (as described above) when necessary. Samples (whole cells or isolated mitochondria) were freeze-thawed three times, and the lysates were filtered through 10-kDa molecular mass cut-off devices (Amicon, Millipore) at 12,000xg for 15 min at 4 °C. The retained protein fraction was immediately used for the determination of γ -glutamylcysteine concentration or assayed for GCL activity in 0.1 M Tris-HCl buffer containing 0.15 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10 mM ATP, 10 mM L-cysteine, 40 mM L-glutamate, and 220 μ M acivicin, pH 8.2, at 37 °C for 15 min. The reaction was stopped by addition of ice-cold ortho-phosphoric acid (15 mM, final concentration), and the reaction product was immediately used for γ -glutamylcysteine determination. This was performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) using a LC-20A Shimadzu equipment (Shimadzu GmbH, Duisburg) with an interphase module (CBM-20A, Shimadzu GmbH) and electrochemical detection (ESA Biosciences, Inc., Chelmsford, MA), with the upstream electrode set at +100 mV (for compounds with low oxidation potential) and downstream electrode set between +100 and +650 mV (in +50 mV increments) for each injected standard to determine the optimum potential for detection. The samples were subjected to analysis with a Teknokroma MediterraneaSea₁₈ ODS column (4.6 \times 250 mm, 5- μ m particle size), using 15 mM orthophosphoric acid as the mobile phase³⁵ at a flow rate of 0.5 ml/min. An external standard of 2.5-10 μ M γ -glutamylcysteine (Bachem, Germany) was used for the calculations. In preliminary experiments, we tested that, under these conditions, γ -glutamylcysteine synthesis was linear with the incubation time at least up to 20 min.

12. Determination of glutathione concentrations.

This was performed by both the enzymatic and the HPLC (with electrochemical detection) methods. For the enzymatic method, 1% (wt/vol) of sulfosalicylic acid was added to cells or isolated mitochondria, the cell lysates were centrifuged at 13,000xg for 5 min at 4°C, and the supernatants were used for the determination of total glutathione (GSH + 2xGSSG), using GSSG (0-50 μ M) as standard, as described previously²¹. Total

glutathione was measured in reaction buffer (0.1 mM NaHPO₄, 1 mM EDTA, 0.3 mM DTNB, 0.4 mM NADPH, glutathione reductase 1 U/ml, pH 7.5) by recording the increase in the absorbance after the reaction of GSH with DTNB. GSSG was measured (either under basal conditions or after incubation of cells with 10 μM rotenone for 3h at 37°C in Hank's buffer). GSSG was quantified after derivation with 2-vinylpyridine (Sigma) plus 0.2 M Tris (pH 5-7). Absorbance at 405 nm was recorded for 2.5 min in 15 s intervals using a (Multiscan Ascent, Thermolabsystems, Belgium) plate reader. GSH concentration values were confirmed by the HPLC method; in this, ice-cold ortho-phosphoric acid (15 mM, final concentration) was added to cells, cytosol or isolated mitochondria, and then subjected to HPLC with electrochemical detection (upstream electrode: +100 mV; downstream electrode: +100 to +650 mV (in +50 mV increments)³⁵ and an external GSH standard (Sigma).

13. Site-directed mutagenesis.

For the assessment of free reduced and oxidized forms low molecular weight thiols, we used a previously reported protocol⁴⁶ with some modifications. Cells were seeded in 60 cm² at a density of 5 x 10⁴ cells/cm². After 4 days in culture, cells were rinsed with PBS and incubated with Hank's buffer (5.5 mM glucose, pH 7.4) for 7 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Then, cells were washed with ice-cold PBS containing 10 mM N-ethylmaleimide (NEM, Sigma) for 2 min and then scraped in 400 μl of the PBS-NEM mixture. For in vivo analyses, mice were anesthetized with isoflurane (Abbot) and sacrificed by cervical dislocation; brain, liver and kidney were rapidly deep-frozen (freeze-clamping) in liquid nitrogen. Aliquots of 100 mg of tissue were homogenized in 400 μl of 10 mM NEM. In all cases, after addition of 4% (v/v) perchloric acid, samples were centrifuged at 13,000xg for 10 min at 4°C, and the supernatant collected and stored at -80°C until thiols determination by ultra performance liquid chromatography and mass spectrometric detection (UPLC-MS/MS).

14. Samples preparation for the determination of protein disulfides formed with low molecular weight thiols.

Cells were seeded as indicated in the previous paragraph for free thiols and disulfides measurement. After washing with ice-cold PBS containing 10 mM NEM for 2 min, cells were detached with 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 10,000xg for 2 min at 4°C. The pellet was washed twice with 10% TCA and dissolved in 50 mM HEPES with 2% SDS, pH 8, with powder NaHCO₃ added until saturation. Once re-suspended, an aliquot of the pellets was used for the determination of protein concentration. Another aliquot was taken and treated with 2.5 mM dithiothreitol (DTT, Sigma). After 1 h incubation at 40°C in agitation and verified the pH to be between 9-10, 10 mM NEM was added and vortex manually. Perchloric acid (4%) was then added, and samples centrifuged at 10,000xg for 10 min at 4°C. Samples were stored at -80°C until analyzed by UPLC-MS/MS.

15. Ultra performance liquid chromatography and mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

This was carried out using a triple-quadruple mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with Xevo TQ-S. Analytical separation was carried out at 50°C using a core shell C19 Kinetex column (100 x 2mm, 3 µm, Phenomenex) using an injection volume of 2 µl. A 6 min gradient elution was performed at a flow rate of 400 µm min⁻¹ as follows: initial conditions A (water, 0.1% v/v HCOOH) 100%, B (acetonitrile, 0.1% v/v HCOOH) were kept for 1 min, followed by a linear gradient up to 85% B in 1.5 min, then isocratic condition was held for 2 min. Finally, a 0.25 min linear gradient was used to return to the initial conditions, which were held for 1.25 min to re-equilibrate the system. Positive ion electrospray tandem mass spectra were recorded using the following conditions: capillary voltage 3 kV, source temperature 350°C, cone and nebulisation gases were set at 750 and 180 L/h, respectively.

16. Flow cytometric analysis of apoptotic cell death.

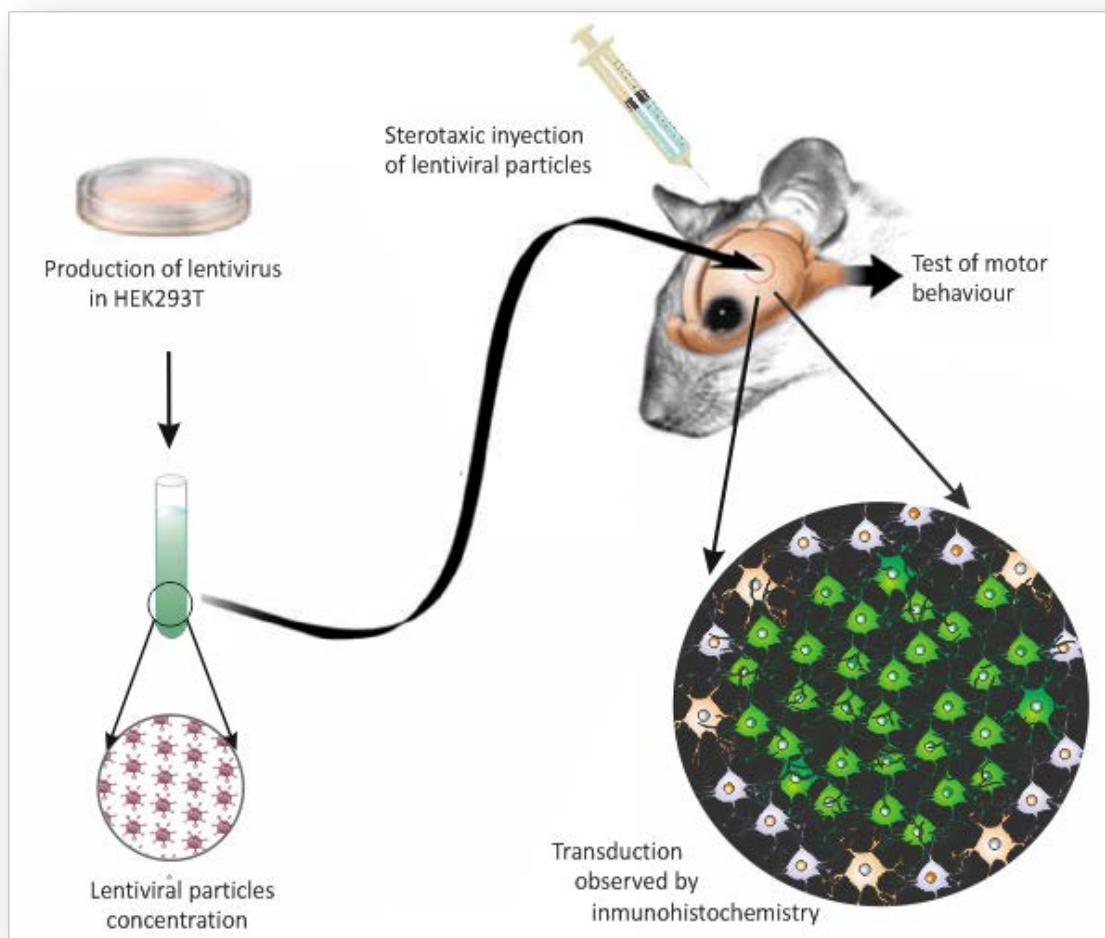
Cells were carefully detached from the plates using 1 mM EDTA (tetrasodium salt) in PBS (pH 7.4). APC-conjugated annexin-V and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (Becton Dickinson Biosciences) were used to determine quantitatively the percentage of apoptotic neurons by flow cytometry. Cells were stained with annexin V-APC and 7-AAD in binding buffer (100 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂), according to the manufacturer's instructions, and 3×10^5 cells were analysed, in four replicates per condition, on a FACScalibur flow cytometer (15 mW argon ion laser tuned at 488 nm; CellQuest software, Becton Dickinson Biosciences). GFP⁺ and GFP⁻ cells were analysed separately, and the annexin V-APC-stained cells that were 7-AAD-negative were considered to be apoptotic⁴³. The analyzer threshold was adjusted on the flow cytometer channel to exclude most of the subcellular debris in order to reduce the background noise owing to the neurite disruption during neuronal detaching. Data were expressed as percentages.

17. Flow cytometric detection of active caspase-3.

Active caspase-3 was detected using the ApoActive3™ Kit (Bachem, San Carlos, CA, USA), following the manufacturer's instructions. After detaching cells with 1 mM EDTA (tetrasodium salt) and centrifuged, cell pellets were fixed during 20 min, re-suspended in PBS + 2% bovine serum albumin (BSA) and incubated for 1 h with 1X rabbit anti-caspase 3. Cells were then incubated with 1:500 anti-rabbit CyC3 (Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, U.S.A.) for 1 h. Between each step, cells were washed with either PBS (until labelling of samples) or PBS + 1% BSA, and re-suspended in PBS + 2% BSA before analysis by flow cytometry (tuned at 488 nm; CellQuest software, Becton Dickinson Biosciences).

18. Stereotaxic injection of lentiviral particles.

Stereotaxic injections were performed as previously described³⁶, with some modifications. Male mice (10-16 weeks old) were anesthetized by inhalatory induction and maintained with sevofluorane (Sevorane. Abbot), using a gas distribution column (Hersill H-3, Madrid, Spain) and a vaporizer (InterMed Penlons Sigma Delta, OX, UK). Mice were placed in a stereotaxic alignment system (Model 1900, David Kopf Instruments, CA, USA) with digital read out (Wizard 550, Anilam, NY, USA) and complemented with a stereomicroscope (Nikon SMZ 645, Tokyo, Japan) and a fibre optic cold light source (Schott KL1500 compact, Mainz, Germany). Injection was performed into both hemispheres at coordinates: 0.5 mm anterior to bregma, 2.1 mm lateral to midline, and 3.8 mm ventral to dura⁴⁷ using a 5- μ l Hamilton syringe (Microliter 65RN, Hamilton, NV, USA) with a 26 S needle (type 2 tip). Lentiviral particles were delivered at a concentration of 5×10^6 total plaque forming units in 3 μ l of PBS with a mini-pump (UltraMicroPump III, World Precision Instruments, USA) and a digital controller (Micro4 (UMC4) World Precision Instruments, USA), during 12 min at a rate of 0.25 μ l/min. The syringe was left in place for 10 min before slowly retracting it to allow for lentivirus infusion and to prevent reflux. Wounds were irrigated with 0.9% sterile saline solution and animals were allowed to recover from anaesthesia in cages placed on a 37°C thermostatted plate (Plactronic Digital, 25x60, JP Selecta, Barcelona, Spain).



Scheme IV. Stereotaxis injection of lentiviral particles. After concentration by a centrifugation step (20,000 x g, 2 h at 4°C), lentivirus produced in HEK293T cells were stereotaxically injected in the striatum of male 10-16 weeks old C57BL/6J mice. Efficiency of cell transduction in tissue was performed by immunohistochemistry, and influence in motor behaviour was assessed with the rotarod test.

19. Induction of *in vivo* neurodegeneration by 3-nitropropionic acid (3NP).

Three days after stereotaxic lentiviral particles injection, *in vivo* neurodegeneration was induced in mice (strain C57BL6/J) following a previously reported protocol³⁷, with some modifications. In brief, 3NP (25 mg/ml) was dissolved in PBS, adjusted to pH 7.4 with 1 M NaOH and maintained at 4°C for up to 1 week. Mice received *i.p.* injections (50 mg/kg of body weight) of 3NP or vehicle (PBS) every 12 h for a total of seven

Summary

injections in a volume of 200 μ l. Six to eight hours after the last dose, mice were perfused for immunohistochemistry.

20. Tissue sampling for biochemical analyses.

Mice (C57BL6/J) were anaesthetized with xylacine hydrochloride and ketamine hydrochloride (4:1) and sacrificed 6 days after stereotaxic administration of lentiviral particles. After decapitation, brains were extracted and dissected out coronally in an adult mouse matrix (ASI instruments, MI, USA), collecting the tissue comprised between lines 7 and 11 (1 mm/line, caudal-rostral sense) of the matrix and verifying the presence of the scars derived from stereotaxic surgery in the recollected fraction. After removal of the cortex in each hemisphere, the remaining tissue was excised in two parts, for determination of GSH concentration and GCL activity from the same tissue, and each fragment was weighed. Tissue was washed twice with PBS, and 10 μ l/mg tissue of 1% (wt/vol) of sulfosalicylic acid, or isolation medium (320 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) was added for the determination of GSH or GCL activity, respectively. Tissue was homogenized in a tight-fitting glass-teflon homogenizer (20 strokes) and centrifuged at 13,000xg for 15 min at 4°C, keeping the supernatants for the determinations.

21. Immunocytochemistry.

Cells grown on glass coverslips or μ -slide 8 well plastic bottom dishes (Ibidi, Martinsried, Germany) were fixed with 4% paraformaldehyde (vol/vol, in PBS) for 30 min, rinsed with PBS and permeabilized for 5 min with 0.3% Triton X-100. Cells were then incubated for 30 min at room temperature in PBS containing blocking solution (0.1% triton X-100, 5% horse serum) and kept overnight at 4°C with anti-GCL antibody (1:40 dilution)⁵. After washing with PBS, cells were incubated with the secondary

antibody Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit (1:400 dilution; Molecular Probes, Invitrogen) for 1 h at room temperature. Cells transfected with pMitoDsRed2 plasmid vector (Clontech) expressed red fluorescent protein in mitochondria, whereas cells transfected with pIRES2-EGFP plasmid vector revealed diffused GFP fluorescence in the cytosol. Dishes and coverslips were washed, and coverslips were mounted in SlowFade[®] light antifade reagent (Molecular Probes, Oregon, USA) on glass slides for phase-contrast or fluorescence microphotographs at x40 or x60 magnification.

22. Immunohistochemistry and determination of lentiviral transduction efficiency and neuronal loss.

Mice (C57BL6/J) were deeply anaesthetized by i.p. injection of a mixture (1:4) of and xilacine hydrochloride (Rompún; Bayer, Kiel, Germany) and ketamine hydrochloride/chlorbutol (Imalgene; Merial, Lyon, France), using 1 ml of the mixture per kg of body weight, and then perfused intra-aortically with 0.9% NaCl, followed by 5 ml/g per body weight of Somogy's fixative (4% (p/v) paraformaldehyde, 0.2% (p/v) picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). After perfusion, brains were dissected out coronally in two parts and post-fixed, using the Somogy's fixative, for overnight at 4 °C. Brain blocks were then rinsed successively for 10 min, 30 min, and 2 h with 0.1 M PB solution (pH 7.4), and immersed in 20% and 30% (w/v) sucrose in PB solution sequentially until they sank. After cryoprotection, 40 µm-thick coronal sections were obtained with a freezing-sliding cryostat (Leica CM 1950 AgProtect, Leica, Nussloch, Germany). The sections were collected in 0.05% sodium azide (wt/vol) in 0.1 M PB. Coronal sections were rinsed in 0.1 M PB three times each for 10 minutes, and then incubated sequentially in: (i) 5 mg/ml sodium borohydride in PB for 30 minutes to remove aldehyde autofluorescence; (ii) 1:1000 rabbit anti-GFP (ab290, Abcam) and 1:1000 mouse anti-NeuN (MAB377, Chemicon international. Temecula, CA, USA), in 0.2% Triton X-100 (Sigma) and 5% normal goat serum (Jackson Immoresearch, Pennsylvania, U.S.A.) for 72 h at 4 °C in 0.1 M PB; (iii) 1:500 Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit and 1:500 Alexa 594-conjugated goat anti-mouse (Molecular Probes,

Summary

Invitrogen, Oregon, USA) for 2 h at room temperature; (iv) 0.5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI in PB for 10 minutes at room temperature. Except between the staining with secondary antibodies and DAPI, after each step the sections were carefully rinsed three times each for 10 min in PB. After rinsing, sections were mounted with Fluoromount (Sigma) aqueous mounting medium. Sections were examined with epifluorescence and appropriated filters sets using a microscope (Nikon Inverted microscope Eclipse Ti-E, Japan) equipped with a pre-centered fiber illuminator (Nikon Intensilight C-HGFI, Tokyo, Japan) and B/W CCD digital camera (Hamamatsu ORCA-ER, Hamamatsu, Japan), or a confocal microscope (TCS SP2; Leica, Mannheim, Germany). To determine the efficiency of transduction of the lentiviral particles, vehicle +*mitoGCL*-treated mice ($n=4$) were used. An area of 0.5 mm^2 in the injection zone was counted in 3 striatal slices/mouse. A $8.8\pm 1.6\%$ of the striatal neurons, identified by NeuN staining (610 ± 60 NeuN⁺ cells per slice) were GFP⁺ (efficiently transduced). In addition, a $40.8\pm 5.7\%$ (mean \pm SEM) of cells that were efficiently transduced (i.e., GFP⁺) in the striatum were found to be NeuN⁺. To determine neuronal loss, the number of NeuN⁺ cells was counted in a peri-injection area of 0.5 mm^2 in 3 striatal slices/mouse.

23. TUNEL assay.

Apoptotic cell death after *in vivo* treatments was assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling (TUNEL) assay (Roche Diagnostics). Brain sections, fixed as above, were pre-incubated in TUNEL buffer containing 1 mM CoCl_2 , 140 mM sodium cacodylate and 0.3% Triton X-100 in 30 mM Tris buffer, pH 7.2, for 30 min. After incubation at 37°C with the TUNEL reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase (800 U/ml) and nucleotide mixture (1 μM) for 90 min, sections were rinsed with PBS and counterstained with Cy3-streptavidin (Jackson Immunoresearch Laboratories). Each data point was obtained by counting TUNEL⁺/NeuN⁺ cells in a 0.3 mm^2 area in three striatal slices.

24. Rotarod test.

Motor balance and coordination was analysed using the rotarod test as described³⁸ once daily during days 1, 2 and 3 of 3NP treatment. Mice were trained for 3 days before the stereotaxic surgery. All determinations were carried out at the same time every day. Mice were allowed to stay for 300 s on a five-lane accelerating rotarod (Model 47600. Ugo Basile, Comerio, Italy) rotating rod with a continuous accelerating rotation speed from 4 to 40 rpm, increasing 4 rpm every 30 s and reaching the final speed at 270 s. Latency to fall was measured during this period, annotating the time the animal stayed on the rotation rod. Data from tests in which animals completed 3 turns without walking were disregarded.

25. Protein determinations.

Protein concentrations were determined in the cell suspensions, lysates, mitochondrial fractions, cytosolic fractions or in parallel cell culture incubations after solubilization with 0.1 M NaOH. Protein concentrations were determined as described⁴⁸ or by the BCATM protein assay kit (Pierce), using bovine serum albumin as standard.

26. Ethical statement regarding the use of animals.

All animals used in this work were obtained from the Animal Experimentation Unit of the University of Salamanca, in accordance with Spanish legislation (RD 1201/2005) under license from the Spanish Ministry of Science and Innovation. Protocols were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca.

27. Statistical analysis.

All measurements in cell culture were carried out, at least, in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SEM values from at least three different culture preparations. For *in vivo* experiments we used 6-8 animals per condition. Statistical analysis of the results was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the least significant difference multiple range test test, or by the Student's *t* test for comparisons between two groups of values. In all cases, $p < 0.05$ was considered significant.

Conclusions

At the light of the results presented in this Thesis, we have obtained the following conclusions:

1. We have developed a method that allows the functional expression of the catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase in mitochondria. Using this strategy, we showed that it is possible to synthesize γ -glutamylcysteine in mitochondria without interfering with the biosynthesis of glutathione in the cytosol.
2. γ -Glutamylcysteine detoxifies mitochondrially-produced hydrogen peroxide, independently on cytosolic glutathione, by acting as glutathione-peroxidase-1 cofactor.
3. The occurrence of an oxidized form of γ -glutamylcysteine in brain, liver and kidney suggests a redox cycle of the dipeptide in physiological conditions.
4. γ -Glutamylcysteine does not induce thiol-redox modifications directly or through modulation of the glutathione status.
5. In neurons, prevention of mitochondrial oxidative stress by γ -glutamylcysteine results in a lower activation of the intrinsic apoptotic pathway by glutamate excitotoxicity.
6. By its use as an *in vivo* gene therapy strategy, the mitochondrial synthesis of γ -glutamylcysteine in the *striatum* prevents apoptotic neuronal loss and motor dysfunction in a mouse model of neurodegeneration.

Bibliography

1. Dickinson, B.C. & Chang, C.J. *Nat Chem Biol* **7**, 504-11 (2011).
2. Meister, A. & Anderson, M.E. *Annu Rev Biochem* **52**, 711-60 (1983).
3. Veeravalli, K., Boyd, D., Iverson, B.L., Beckwith, J. & Georgiou, G. *Nat Chem Biol* **7**, 101-5 (2011).
4. Griffith, O.W., Bridges, R.J. & Meister, A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6319-6322 (1979).
5. Diaz-Hernandez, J.I., Almeida, A., Delgado-Esteban, M., Fernandez, E. & Bolanos, J.P. *J Biol Chem*. **280**, 38992-39001 (2005).
6. Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Yang, Y., Shertzer, H.G. & Nebert, D.W. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 324-329 (2000).
7. Shi, Z.Z. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5101-5106 (2000).
8. Grant, C.M., MacIver, F.H. & Dawes, I.W. *Mol Biol Cell* **8**, 1699-707 (1997).
9. Kumar, C. et al. *Embo J* **30**, 2044-56 (2011).
10. Ristoff, E. et al. *J Inherit Metab Dis* **25**, 577-84 (2002).
11. Griffith, O.W. & Meister, A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4668-72 (1985).
12. Backos, D.S., Brocker, C.N. & Franklin, C.C. *Toxicol Appl Pharmacol* **243**, 35-45 (2010).
13. Diaz-Hernandez, J.I., Moncada, S., Bolanos, J.P. & Almeida, A. *Cell Death Differ* **14**, 1211-21 (2007).
14. Toppo, S., Flohe, L., Ursini, F., Vanin, S. & Maiorino, M. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1486-500 (2009).
15. Herrero-Mendez, A. et al. *Nat Cell Biol* **11**, 747-52 (2009).
16. Almeida, A. & Bolaños, J.P. *J Neurochem* **77**, 676-690 (2001).
17. Murphy, M.P. *Biochem J* **417**, 1-13 (2009).
18. Beal, M.F. et al. *J Neurosci* **13**, 4181-92 (1993).
19. Lok, J. et al. *J Neurochem* **118**, 248-255 (2011).
20. Flohe, L., Gunzler, W., Jung, G., Schaich, E. & Schneider, F. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **352**, 159-69 (1971).
21. Garcia-Nogales, P., Almeida, A. & Bolanos, J.P. *J Biol Chem* **278**, 864-74 (2003).
22. Perry, T.L., Godin, D.V. & Hansen, S. *Neurosci Lett*. **33**, 305-310 (1982).
23. Bolaños, J.P., Moro, M.A., Lizasoain, I. & Almeida, A. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 1299-315 (2009).
24. Dringen, R. *Progr. Neurobiol.* **62**, 649-671 (2000).

25. Hardingham, G.E. & Lipton, S.A. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1421-4 (2011).
26. Corti, A., Franzini, M., Paolicchi, A. & Pompella, A. *Anticancer Res* **30**, 1169-81 (2010).
27. Andersen, J.K. *Nat Med* **10 Suppl**, S18-25 (2004).
28. Kamat, C.D. et al. *J Alzheimers Dis* **15**, 473-93 (2008).
29. Ohtsuka, T. et al. *Nat. Cell Biol.* **6**, 121-128 (2004).
30. Belzile, J.P. et al. *PLoS Pathog* **3**, e85 (2007).
31. Reynolds, A. et al. *Nat Biotechnol* **22**, 326-330 (2004).
32. Ui-Tei, K. et al. *Nucleic Acids Res* **32**, 936-48 (2004).
33. Almeida, A. & Medina, J.M. *Brain Res. Prot.* **2**, 209-214 (1998).
34. Heinzl, B., John, M., Klatt, P., Böhme, E. & Mayer, B. *Biochem. J.* **281**, 627-630 (1992).
35. Gegg, M.E., Clark, J.B. & Heales, S.J.R. *Anal. Biochem.* **304**, 26-32 (2002).
36. Shih, A.Y. et al. *J Biol Chem* **280**, 22925-36 (2005).
37. Calkins, M.J. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 244-9 (2005).
38. L'Episcopo, F. et al. *J Neuroinflammation* **7**, 83 (2010).
39. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A. & Randall, R.J. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
40. Schriener, S.E. et al. *Science* **308**, 1909-1911 (2005).
41. Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellman, I. & Rosenberg, L.E. *Embo J* **4**, 1129-1135 (1985).
42. Zhang, Y., Hardy, D.E. & Loscalzo, J. *Circ. Res.* **96**, 831-7
43. Almeida, A., Moncada, S. & Bolaños, J.P. *Nat. Cell Biol.* **6**, 45-51 (2004).
44. Almeida, A., Bolanos, J.P. & Moreno, S. *J Neurosci.* **25**, 8115-8121 (2005).
45. Boussif, O. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301 (1995).
46. Rogers, L.K., Leinweber, B.L. & Smith, C.V. *Anal Biochem* **358**, 171-184 (2006).
47. Paxinos, G. & Franklin, K. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Academic Press, Academic Press, 2001).
48. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A. & Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).



Abreviaturas

Abreviaturas

7-AAD: 7-amino-actinomicina

ABC: *Cassette* de unión a ATP

AP-1: Proteína activadora 1

ApN: Aminopeptidasa N

ARE: Elemento de respuesta a antioxidantes

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albumina serica bovina

cDNA: DNA codificante

CS: Citrato Sintasa

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIC: Transportador de dicarboxilatos

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Acido desoxirribonucleico

DNAsa: Desoxirribonucleasa

DTNB: ácido 5-5'-ditio-bis 2-nitrobenzoico

EBSS: Solucion salina equilibrada de Earle

EDTA: Acido etilendiaminotetraacetico

EpRE: Elemento de Respuesta a Electrófilos

ETC: Cadena Transportadora de Electrones (Electron Transport Chain)

FCS: Suero fetal de ternera

γGC: Gamma-glutamylcisteína

GCEE: Etil-éster de γGC

GCL: Glutamato-Cisteína Ligasa o gamma-glutamyl cisteína sintetasa (GCS)??

GCL_H: Subunidad catalítica o pesada de GCL

GCL_L: Subunidad moduladora o ligera de GCL

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GGT: gamma-glutamyltranspeptidasa

GPx: Glutación Peroxidasa

GRX: Glutarredoxina

GSH: Glutación reducido

Abreviaturas

GSR: Glutación Reductasa

GSS: Glutación Sintetasa

GSSG: Glutación oxidado (disulfuro de glutación)

GSSPr: Disulfuro de glutación con proteínas

GSSX: Disulfuro de glutación con xenobióticos u otros compuestos

GST: Glutación S-Transferasa

HEK293T: Línea celular embrionaria de riñón (Human Embryonic Kidney)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

i.p.: Intraperitoneal.

ko: Genéticamente deficiente (“Knock-out”)

L-BSO: L-Butionina s-sulfoximina

LDH: Lactato Deshidrogenasa

MAO: Monoamina oxidasa

MME: Membrana mitocondrial externa

MMI: Membrana mitocondrial interna

MRE: Elemento de respuesta a metales

MRP: Proteína de resistencia múltiple a drogas

NAC: N-Acetil-Cisteína

NAD⁺: Nucleotido de nicotinamida y adenina (oxidado)

NADPH : Nucleotido de nicotinamida y adenina fosfato (reducido)

NeuN: Proteína de nuclear neuronal

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

Nrf2: factor relacionado al factor nuclear eritroide-2

OATP: Proteína transportadora de aniones orgánicos

OGC: Transportador de 2-oxoglutarato

ONOO⁻: Radical peroxinitrito

OTC: Ornitina Transcarbamilasa

OXPHOS: Fosforilación oxidativa mitocondrial

PBS: Tampon fosfato salino

PCR: Reaccion en cadena de la polimerasa

PD: Enfermedad de Parkinson

Prx: Peroxirredoxina

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RNA: Acido ribonucleico

RNAi: RNA de interferencia

RNA_m: RNA mensajero

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

S.E.M.: Error estandar de la media

shRNA: RNA de interferencia (*small hairping* RNA)

siRNA: RNA de interferencia (*small interfering* RNA)

SN: *Substantia Nigra*

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD1 o **Cu/ZnSOD:** Superóxido Dismutasa 1 o Cu/Zn-superóxido dismutasa (isoforma citosólica)

SOD2 o **MnSOD:** Superóxido Dismutasa 2 o Mn-superóxido dismutasa (isoforma mitocondrial)

TCA: Ciclo del ácido tricarbóxico

Trx: Tiorredoxina

TrxR: Tiorredoxina reductasa

UPLC-MS/MS : Cromatografía líquida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas en tándem

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

Wt: Forma o cepa silvestre (wild type)



Bibliografía

- Abbott WA, Griffith OW & Meister A. Gamma-glutamyl-glutathione. Natural occurrence and enzymology. *J Biol Chem* **261**, 13657-13661 (1986).
- Adam-Vizi V & Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 639-645 (2006).
- Almeida A, Bolanos JP & Moreno S. Cdh1/hct1-apc is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci.* **25**, 8115-8121 (2005).
- Almeida A & Bolaños JP. A transient inhibition of mitochondrial atp synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J. Neurochem.* **77**, 676-690 (2001).
- Almeida A, Heales SJR, Bolaños JP & Medina JM. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res.* **790**, 209-216 (1998).
- Anderson ME & Meister A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 707-711 (1983).
- Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS & Sims NR. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett* **354**, 163-165 (2004a).
- Anderson MF, Nilsson M & Sims NR. Glutathione monoethylester prevents mitochondrial glutathione depletion during focal cerebral ischemia. *Neurochem Int* **44**, 153-159 (2004b).
- Backos DS, Brocker CN & Franklin CC. Manipulation of cellular gsh biosynthetic capacity via tat-mediated protein transduction of wild-type or a dominant-negative mutant of glutamate cysteine ligase alters cell sensitivity to oxidant-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **243**, 35-45 (2010).
- Balijepalli S, Boyd MR & Ravindranath V. Human brain thioltransferase: Constitutive expression and localization by fluorescence in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* **85**, 123-132 (2000).
- Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM & Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: Role of the mrp/cftr/abcc and oatp/slc21a families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**, 238-255 (2005).
- Ballatori N, Krance SM, Marchan R & Hammond CL. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med* **30**, 13-28 (2009).
- Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci* **27**, 595-600 (2004).

Bibliografía

Beal MF. Less stress, longer life. *Nat Med* **11**, 598-599 (2005).

Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR & Hyman BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* **13**, 4181-4192 (1993).

Beatrice MC, Stiers DL & Pfeiffer DR. The role of glutathione in the retention of ca²⁺ by liver mitochondria. *J Biol Chem* **259**, 1279-1287 (1984).

Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV & Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* **3**, 281-286 (2006).

Belzile JP, Duisit G, Rougeau N, Mercier J, Finzi A & Cohen EA. Hiv-1 vpr-mediated g2 arrest involves the ddb1-cul4avprbp e3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog* **3**, e85 (2007).

Benassi B, Fanciulli M, Fiorentino F, Porrello A, Chiorino G, Loda M, Zupi G & Biroccio A. C-myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol Cell* **21**, 509-519 (2006).

Bharath S & Andersen JK. Glutathione depletion in a midbrain-derived immortalized dopaminergic cell line results in limited tyrosine nitration of mitochondrial complex i subunits: Implications for parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* **7**, 900-910 (2005).

Bolaños JP, Heales SJR, Peuchen S, Barker JE, Land JM & Clark JB. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: A potential neuroprotective role for glutathione. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 995-1001 (1996).

Bolaños JP, Moro MA, Lizasoain I & Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 1299-1315 (2009).

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B & Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301 (1995).

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* **105**, 429-435 (1984).

Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* **45**, 466-472 (2010).

Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* **27**, 951-965 (1999).

Cadenas E & Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* **29**, 222-230 (2000).

- Cai J, Chen Y, Seth S, Furukawa S, Compans RW & Jones DP. Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic Biol Med* **34**, 928-936 (2003).
- Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson DA, Chan K, Kan YW & Johnson JA. Protection from mitochondrial complex ii inhibition in vitro and in vivo by nrf2-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 244-249 (2005).
- Cazanave S, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A, Letteron P, Feldmann G, El-Benna J, Fromenty B, Robin MA & Pessayre D. High hepatic glutathione stores alleviate fas-induced apoptosis in mice. *J Hepatol* **46**, 858-868 (2007).
- Chaudhuri B, Ingavale S & Bachhawat AK. Apd1+, a gene required for red pigment formation in ade6 mutants of schizosaccharomyces pombe, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: A role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics* **145**, 75-83 (1997).
- Chen J, Schenker S & Henderson GI. 4-hydroxynonenal detoxification by mitochondrial glutathione s-transferase is compromised by short-term ethanol consumption in rats. *Alcohol Clin Exp Res* **26**, 1252-1258 (2002).
- Chen X, Schechter RL, Griffith OW, Hayward MA, Alpert LC & Batist G. Characterization of 5-oxo-l-prolinase in normal and tumor tissues of humans and rats: A potential new target for biochemical modulation of glutathione. *Clin Cancer Res* **4**, 131-138 (1998).
- Chen Y, Shertzer HG, Schneider SN, Nebert DW & Dalton TP. Glutamate cysteine ligase catalysis: Dependence on atp and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J Biol Chem* **280**, 33766-33774 (2005).
- Chen Z & Lash LH. Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. *J Pharmacol Exp Ther* **285**, 608-618 (1998).
- Chen Z, Putt DA & Lash LH. Enrichment and functional reconstitution of glutathione transport activity from rabbit kidney mitochondria: Further evidence for the role of the dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers in mitochondrial glutathione transport. *Arch Biochem Biophys* **373**, 193-202 (2000).
- Chernyak BV & Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem* **238**, 623-630 (1996).
- Circu ML & Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**, 749-762 (2010).
- Cotgreave IA & Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: A molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 1-9 (1998).
- D'Autreaux B & Toledano MB. Ros as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ros homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 813-824 (2007).

Bibliografía

- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R & Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med* **43**, 883-898 (2007).
- Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW & Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med* **37**, 1511-1526 (2004).
- Dalton TP, Dieter MZ, Yang Y, Shertzer HG & Nebert DW. Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (gclc) gene: Embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 324-329 (2000).
- de la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J & Vina J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *Faseb J* **10**, 333-338 (1996).
- Devesa A, O'Connor JE, Garcia C, Puertes IR & Vina JR. Glutathione metabolism in primary astrocyte cultures: Flow cytometric evidence of heterogeneous distribution of gsh content. *Brain Res* **618**, 181-189 (1993).
- Diaz-Hernandez JI, Almeida A, Delgado-Esteban M, Fernandez E & Bolanos JP. Knockdown of glutamate-cysteine ligase by small hairpin rna reveals that both catalytic and modulatory subunits are essential for the survival of primary neurons. *J Biol Chem.* **280**, 38992-39001 (2005).
- Dickinson DA & Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: Lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* **973**, 488-504 (2002).
- Dikalov S. Cross talk between mitochondria and nadph oxidases. *Free Radic Biol Med* **51**, 1289-1301 (2011).
- Douglas KT. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **59**, 103-167 (1987).
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr. Neurobiol.* **62**, 649-671 (2000).
- Dringen R, Gutterer JM, Gros C & Hirrlinger J. Aminopeptidase n mediates the utilization of the gsh precursor cysgly by cultured neurons. *J Neurosci Res* **66**, 1003-1008 (2001).
- Dringen R & Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* **384**, 505-516 (2003).
- Dringen R, Kranich O & Hamprecht B. The γ -glutamyltranspeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem. Res.* **22**, 727-733 (1997a).

- Dringen R, Kranich O, Löschmann PA & Hamprecht B. Use of dipeptides for the synthesis of glutathione by astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem.* **69**, 868-874 (1997b).
- Dringen R, Pfeiffer B & Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: Supply by astrocytes of cystygly as precursor for neuronal glutathione. *J. Neurosci.* **19**, 562-569 (1999).
- Esteve JM, Mompo J, Garcia de la Asuncion J, Sastre J, Asensi M, Boix J, Vina JR, Vina J & Pallardo FV. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: Studies in vivo and in vitro. *Faseb J* **13**, 1055-1064 (1999).
- Fahey RC, Newton GL, Arrick B, Overdank-Bogart T & Aley SB. Entamoeba histolytica: A eukaryote without glutathione metabolism. *Science* **224**, 70-72 (1984).
- Faulkner MJ, Veeravalli K, Gon S, Georgiou G & Beckwith J. Functional plasticity of a peroxidase allows evolution of diverse disulfide-reducing pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6735-6740 (2008).
- Fernandez A, Llacuna L, Fernandez-Checa JC & Colell A. Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *J Neurosci* **29**, 6394-6405 (2009).
- Filomeni G, Rotilio G & Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol* **64**, 1057-1064 (2002).
- Flohe L. The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1389-1403 (2009).
- Flohe L, Gunzler W, Jung G, Schaich E & Schneider F. [glutathione peroxidase. II. Substrate specificity and inhibitory effects of substrate analogues]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **352**, 159-169 (1971).
- Fourquet S, Huang ME, D'Autreaux B & Toledano MB. The dual functions of thiol-based peroxidases in h₂o₂ scavenging and signaling. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1565-1576 (2008).
- Franco R & Cidlowski JA. Slco/oatp-like transport of glutathione in fasl-induced apoptosis: Glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J Biol Chem* **281**, 29542-29557 (2006).
- Franco R & Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* **16**, 1303-1314 (2009).
- Franklin CC, Krejsa CM, Pierce RH, White CC, Fausto N & Kavanagh TJ. Caspase-3-dependent cleavage of the glutamate-l-cysteine ligase catalytic subunit during apoptotic cell death. *Am J Pathol* **160**, 1887-1894 (2002).

Bibliografía

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

Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Villa P, Eberini I, Vandekerckhove J, Gianazza E & Ghezzi P. Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics* **3**, 1154-1161 (2003).

Frey IM, Rubio-Aliaga I, Siewert A, Sailer D, Drobyshev A, Beckers J, de Angelis MH, Aubert J, Bar Hen A, Fiehn O, Eichinger HM & Daniel H. Profiling at mrna, protein, and metabolite levels reveals alterations in renal amino acid handling and glutathione metabolism in kidney tissue of *pept2^{-/-}* mice. *Physiol Genomics* **28**, 301-310 (2007).

Fukui H & Moraes CT. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: Reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci* **31**, 251-256 (2008).

Garcia J, Han D, Sancheti H, Yap LP, Kaplowitz N & Cadenas E. Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J Biol Chem* **285**, 39646-39654 (2010).

Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C & Fernandez-Checa JC. Defective *tnf*- α -mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest* **111**, 197-208 (2003).

Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N & Fernandez-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor- κ b: Studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* **48**, 825-834 (1995).

Garcia-Ruiz C & Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione: Hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol* **21 Suppl 3**, S3-6 (2006).

Garcia-Ruiz C & Fernandez-Checa JC. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* **22 Suppl 1**, S38-42 (2007).

Gegg ME, Clark JB & Heales SJR. Determination of glutamate-cysteine ligase (γ -glutamylcysteine synthetase) activity by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Anal. Biochem.* **304**, 26-32 (2002).

Ghibelli L, Coppola S, Fanelli C, Rotilio G, Civitareale P, Scovassi AI & Ciriolo MR. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *Faseb J* **13**, 2031-2036 (1999).

Gipp JJ, Bailey HH & Mulcahy RT. Cloning and sequencing of the cDNA for the light subunit of human liver gamma-glutamylcysteine synthetase and relative mRNA levels for heavy and light subunits in human normal tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 584-589 (1995).

Go YM & Jones DP. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1273-1290 (2008).

Grant CM, MacIver FH & Dawes IW. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol Biol Cell* **8**, 1699-1707 (1997).

Green DR, Galluzzi L & Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**, 1109-1112 (2011).

Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* **27**, 922-935 (1999).

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

Gushima H, Yasuda S, Soeda E, Yokota M, Kondo M & Kimura A. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* glutathione synthetase gsh-ii. *Nucleic Acids Res* **12**, 9299-9307 (1984).

Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* **32**, 125-130 (2011).

Hammond CL, Lee TK & Ballatori N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* **34**, 946-954 (2001).

Hammond CL, Marchan R, Krance SM & Ballatori N. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J Biol Chem* **282**, 14337-14347 (2007).

Han D, Canali R, Garcia J, Aguilera R, Gallaher TK & Cadenas E. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: Modulation by citrate and glutathione. *Biochemistry* **44**, 11986-11996 (2005).

Han D, Canali R, Rettori D & Kaplowitz N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Mol Pharmacol* **64**, 1136-1144 (2003).

Harrison FE & May JM. Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter svct2. *Free Radic Biol Med* **46**, 719-730 (2009).

Hayes JD, Flanagan JU & Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 51-88 (2005).

Heales SJR, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM & Clark JB. Nitric oxide, mitochondrial and neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 215-228 (1999).

Bibliografía

- Heinzel B, John M, Klatt P, Böhme E & Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.* **281**, 627-630 (1992).
- Hekimi S, Lapointe J & Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* **21**, 569-576 (2011).
- Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernandez E, Maestre C, Moncada S & Bolanos JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by apc/c-cdh1. *Nat Cell Biol* **11**, 747-752 (2009).
- Hirrlinger J, König J, Kepler D, Lindenau J, Schulz JB & Dringen R. The multidrug resistance protein mrp1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem* **76**, 627-636 (2001).
- Hogg N. The biochemistry and physiology of s-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 585-600 (2002).
- Holmgren A. Regulation of ribonucleotide reductase. *Curr Top Cell Regul* **19**, 47-76 (1981).
- Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lonn ME, Hudemann C & Lillig CH. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans* **33**, 1375-1377 (2005).
- Horwich AL, Kalousek F, Mellman I & Rosenberg LE. A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *Embo J* **4**, 1129-1135 (1985).
- Howard A, Tahir I, Javed S, Waring SM, Ford D & Hirst BH. Glycine transporter glyt1 is essential for glycine-mediated protection of human intestinal epithelial cells against oxidative damage. *J Physiol* **588**, 995-1009 (2010).
- Huang CS, Anderson ME & Meister A. Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **268**, 20578-20583 (1993a).
- Huang CS, Anderson ME & Meister A. Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**, 20578-20583 (1993b).
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME & Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **268**, 19675-19680 (1993c).
- Janaky R, Shaw CA, Varga V, Hermann A, Dohovics R, Saransaari P & Oja SS. Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes. *Neuroscience* **95**, 617-624 (2000).

- Jenner P. Oxidative stress in parkinson's disease. *Ann Neurol* **53 Suppl 3**, S26-36; discussion S36-28 (2003).
- Jones DP, Mody VC, Jr., Carlson JL, Lynn MJ & Sternberg P, Jr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* **33**, 1290-1300 (2002).
- Kakimoto Y, Nakajima T, Kanazawa A, Takesada M & Sano I. Isolation of gamma-l-glutamyl-l-glutamic acid and gamma-l-glutamyl-l-glutamine from bovine brain. *Biochim Biophys Acta* **93**, 333-338 (1964).
- Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN & Hensley K. Antioxidants in central nervous system diseases: Preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis* **15**, 473-493 (2008).
- Kanazawa A, Kakimoto Y, Nakajima T & Sano I. Identification of gamma-glutamylserine, gamma-glutamylalanine, gamma-glutamylvaline and s-methylglutathione of bovine brain. *Biochim Biophys Acta* **111**, 90-95 (1965).
- Kelner MJ & Montoya MA. Structural organization of the human glutathione reductase gene: Determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 366-368 (2000).
- Kensler TW. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environ Health Perspect* **105 Suppl 4**, 965-970 (1997).
- Kiessling K, Roberts N, Gibson JS & Ellory JC. A comparison in normal individuals and sickle cell patients of reduced glutathione precursors and their transport between plasma and red cells. *Hematol J* **1**, 243-249 (2000).
- Kim SG & Lee SJ. Pi3k, rsk, and mtor signal networks for the gst gene regulation. *Toxicol Sci* **96**, 206-213 (2007).
- Krantic S, Mechawar N, Reix S & Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* **28**, 670-676 (2005).
- Krejsa CM, Franklin CC, White CC, Ledbetter JA, Schieven GL & Kavanagh TJ. Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *J Biol Chem* **285**, 16116-16124 (2010).
- Kumar C, Igarria A, D'Autreaux B, Planson AG, Junot C, Godat E, Bachhawat AK, Delaunay-Moisan A & Toledano MB. Glutathione revisited: A vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *Embo J* **30**, 2044-2056 (2011).
- Kurosawa K, Hayashi N, Sato N, Kamada T & Tagawa K. Transport of glutathione across the mitochondrial membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **167**, 367-372 (1990).
- L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Serra PA, Impagnatiello F, Morale MC & Marchetti B. Combining nitric oxide release with anti-inflammatory activity preserves

Bibliografía

nigrostriatal dopaminergic innervation and prevents motor impairment in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **7**, 83 (2010).

Lash LH. Mitochondrial glutathione transport: Physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* **163**, 54-67 (2006).

Le Moan N, Clement G, Le Maout S, Tacnet F & Toledano MB. The *saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: Contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem* **281**, 10420-10430 (2006).

Lee TD, Yang H, Whang J & Lu SC. Cloning and characterization of the human glutathione synthetase 5'-flanking region. *Biochem J* **390**, 521-528 (2005).

Levy OA, Malagelada C & Greene LA. Cell death pathways in parkinson's disease: Proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis* **14**, 478-500 (2009).

Li H, Shen XM & Dryhurst G. Brain mitochondria catalyze the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2h-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (dhbt-1) to intermediates that irreversibly inhibit complex i and scavenge glutathione: Potential relevance to the pathogenesis of parkinson's disease. *J Neurochem* **71**, 2049-2062 (1998a).

Li L, Lee TK, Meier PJ & Ballatori N. Identification of glutathione as a driving force and leukotriene c4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter. *J Biol Chem* **273**, 16184-16191 (1998b).

Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, Carter BZ, Barrios R, Ou CN, Chevez-Barrios P, Wang Y, Habib GM, Goodman JC, Huang SL, Lebovitz RM & Matzuk MM. Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7923-7926 (1996).

Lomaestro BM & Malone M. Glutathione in health and disease: Pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* **29**, 1263-1273 (1995).

Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E & Richter C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4340-4344 (1979).

Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A & Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* **36**, 95-116 (2000).

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* **30**, 42-59 (2009).

Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P & Ballatori N. Human organic anion transporter 1b1 and 1b3 function as bidirectional carriers and do not mediate gsh-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G271-278 (2007).

Maiorino M, Ursini F, Bosello V, Toppo S, Tosatto SC, Mauri P, Becker K, Roveri A, Bulato C, Benazzi L, De Palma A & Flohe L. The thioredoxin specificity of drosophila gpx: A paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *J Mol Biol* **365**, 1033-1046 (2007).

Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C & Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2685-2700 (2009).

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

Martensson J & Meister A. Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 471-475 (1989).

Martin HL & Teismann P. Glutathione--a review on its role and significance in parkinson's disease. *Faseb J* **23**, 3263-3272 (2009).

Mattson MP, Gleichmann M & Chen A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* **60**, 748-766 (2008).

Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* **263**, 17205-17208 (1988).

Meister A & Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**, 711-760 (1983).

Meister A & Tate SS. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* **45**, 559-604 (1976).

Meredith MJ & Reed DJ. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* **257**, 3747-3753 (1982).

Misra I & Griffith OW. Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr Purif* **13**, 268-276 (1998).

Miyazaki I & Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama* **62**, 141-150 (2008).

Munoz AM, Rey P, Soto-Otero R, Guerra MJ & Labandeira-Garcia JL. Systemic administration of n-acetylcysteine protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine-induced degeneration. *J Neurosci Res* **76**, 551-562 (2004).

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1-13 (2009).

Murphy MP & Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 629-656 (2007).

Bibliografía

Muyderman H, Nilsson M & Sims NR. Highly selective and prolonged depletion of mitochondrial glutathione in astrocytes markedly increases sensitivity to peroxynitrite. *J Neurosci* **24**, 8019-8028 (2004).

Neupert W & Brunner M. The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 555-565 (2002).

Newton GL & Javor B. Gamma-glutamylcysteine and thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria. *J Bacteriol* **161**, 438-441 (1985).

Njalsson R. Glutathione synthetase deficiency. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1938-1945 (2005).

Odin JA, Huebert RC, Casciola-Rosen L, LaRusso NF & Rosen A. Bcl-2-dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-e2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J Clin Invest* **108**, 223-232 (2001).

Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Macip S, Sagara J, Nakayama KI, Aaronson SA & Lee SW. Asc is a bax adaptor and regulates the p53-bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat. Cell Biol.* **6**, 121-128 (2004).

Oja SS, Janaky R, Varga V & Saransaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem Int* **37**, 299-306 (2000).

Olafsdottir K & Reed DJ. Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. *Biochim Biophys Acta* **964**, 377-382 (1988).

Orwar O, Li X, Andine P, Bergstrom CM, Hagberg H, Folestad S & Sandberg M. Increased intra- and extracellular concentrations of gamma-glutamylglutamate and related dipeptides in the ischemic rat striatum: Involvement of glutamyl transpeptidase. *J Neurochem* **63**, 1371-1376 (1994).

Palmieri F. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett* **346**, 48-54 (1994).

Paolicchi A, Dominici S, Pieri L, Maellaro E & Pompella A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol* **64**, 1027-1035 (2002).

Paolicchi A, Sotiropoulou M, Perego P, Daubeuf S, Visvikis A, Lorenzini E, Franzini M, Romiti N, Chieli E, Leone R, Apostoli P, Colangelo D, Zunino F & Pompella A. Gamma-glutamyl transpeptidase catalyses the extracellular detoxification of cisplatin in a human cell line derived from the proximal convoluted tubule of the kidney. *Eur J Cancer* **39**, 996-1003 (2003).

Papadopoulos MC, Koumenis IL, Dugan LL & Giffard RG. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res* **748**, 151-156 (1997).

Paxinos G & Franklin K. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Academic Press (2001).

- Perry TL & Yong VW. Idiopathic parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett* **67**, 269-274 (1986).
- Petersen RC, Thomas RG, Grundman M, Bennett D, Doody R, Ferris S, Galasko D, Jin S, Kaye J, Levey A, Pfeiffer E, Sano M, van Dyck CH & Thal LJ. Vitamin e and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med* **352**, 2379-2388 (2005).
- Polekhina G, Board PG, Gali RR, Rossjohn J & Parker MW. Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event. *Embo J* **18**, 3204-3213 (1999).
- Pompella A, Corti A, Paolicchi A, Giommarelli C & Zunino F. Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 360-366 (2007).
- Poyton RO, Ball KA & Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 332-340 (2009).
- Puka-Sundvall M, Eriksson P, Nilsson M, Sandberg M & Lehmann A. Neurotoxicity of cysteine: Interaction with glutamate. *Brain Res* **705**, 65-70 (1995).
- Rahman I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutat Res* **579**, 58-80 (2005).
- Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW & Athar M. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol* **29**, 543-568 (1999).
- Ravindranath V & Reed DJ. Glutathione depletion and formation of glutathione-protein mixed disulfide following exposure of brain mitochondria to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* **169**, 1075-1079 (1990).
- Rebrin I, Kamzalov S & Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med* **35**, 626-635 (2003).
- Rebrin I & Sohal RS. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 1545-1552 (2008).
- Regan RF & Guo YP. Potentiation of excitotoxic injury by high concentrations of extracellular reduced glutathione. *Neuroscience* **91**, 463-470 (1999).
- Reichelt KL. The isolation of gamma-glutamyl peptides from monkey brain. *J Neurochem* **17**, 19-25 (1970).
- Reynaert NL, Ckless K, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A & Janssen-Heininger YM. In situ detection of s-glutathionylated proteins following glutaredoxin-1 catalyzed cysteine derivatization. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 380-387 (2006).

Bibliografía

- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS & Khvorova A. Rational sirna design for rna interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-330 (2004).
- Richman PG & Meister A. Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* **250**, 1422-1426 (1975).
- Ridet JL, Bensadoun JC, Deglon N, Aebischer P & Zurn AD. Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: Neuroprotection in murine models of parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **21**, 29-34 (2006).
- Ristoff E, Hebert C, Njalsson R, Norgren S, Rooyackers O & Larsson A. Glutathione synthetase deficiency: Is gamma-glutamylcysteine accumulation a way to cope with oxidative stress in cells with insufficient levels of glutathione? *J Inherit Metab Dis* **25**, 577-584 (2002).
- Ristoff E & Larsson A. Patients with genetic defects in the gamma-glutamyl cycle. *Chem Biol Interact* **111-112**, 113-121 (1998).
- Robinson KM, Janes MS & Beckman JS. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc* **3**, 941-947 (2008).
- Rogers LK, Leinweber BL & Smith CV. Detection of reversible protein thiol modifications in tissues. *Anal Biochem* **358**, 171-184 (2006).
- Ross D, Cotgreave I & Moldeus P. The interaction of reduced glutathione with active oxygen species generated by xanthine-oxidase-catalyzed metabolism of xanthine. *Biochim Biophys Acta* **841**, 278-282 (1985).
- Sagara J, Makino N & Bannai S. Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* **66**, 1876-1881 (1996).
- Sagara J, Miura K & Bannai S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* **61**, 1667-1671 (1993).
- Sandberg M, Li X, Folestad S, Weber SG & Orwar O. Liquid chromatographic determination of acidic beta-aspartyl and gamma-glutamyl peptides in extracts of rat brain. *Anal Biochem* **217**, 48-61 (1994).
- Sano I, Kakimoto Y, Kanazawa A, Nakajima T & Shimizu H. [identification of glutamylpeptides in brain]. *J Neurochem* **13**, 711-719 (1966).
- Sato T, Machida T, Takahashi S, Iyama S, Sato Y, Kuribayashi K, Takada K, Oku T, Kawano Y, Okamoto T, Takimoto R, Matsunaga T, Takayama T, Takahashi M, Kato J & Niitsu Y. Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in jurkat cells. *J Immunol* **173**, 285-296 (2004).
- 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* **30**, 1191-1212 (2001).

- Schapira AH. Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain. *J Inherit Metab Dis* **25**, 207-214 (2002).
- Scheiber IF & Dringen R. Copper-treatment increases the cellular gsh content and accelerates gsh export from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* **498**, 42-46 (2011).
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC & Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308**, 1909-1911 (2005).
- Sechi G, Deledda MG, Bua G, Satta WM, Deiana GA, Pes GM & Rosati G. Reduced intravenous glutathione in the treatment of early parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **20**, 1159-1170 (1996).
- Sen CK. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* **36**, 1-30 (2000).
- Shen XM, Li H & Dryhurst G. Oxidative metabolites of 5-s-cysteinyl dopamine inhibit the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: Possible relevance to the pathogenesis of parkinson's disease. *J Neural Transm* **107**, 959-978 (2000).
- Shi ZZ, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala SV, Barrios RJ, Habib GM, Lukin DJ, Danney CM, Matzuk MM & Lieberman MW. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5101-5106 (2000).
- Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P & Murphy TH. Induction of the nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem* **280**, 22925-22936 (2005).
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* **27**, 916-921 (1999).
- Sims NR, Nilsson M & Muyderman H. Mitochondrial glutathione: A modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr*, 329-333 (2004).
- Smith RA & Murphy MP. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant mitoq. *Ann N Y Acad Sci* **1201**, 96-103 (2010).
- Soltaninassab SR, Sekhar KR, Meredith MJ & Freeman ML. Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Cell Physiol* **182**, 163-170 (2000).
- Sugimoto M, Kuhlenkamp J, Ookhtens M, Aw TY, Reeve J, Jr. & Kaplowitz N. Gamma-glutamylcysteine: A substrate for glutathione s-transferases. *Biochem Pharmacol* **34**, 3643-3647 (1985).

Bibliografía

- Sundquist AR & Fahey RC. The function of gamma-glutamylcysteine and bis-gamma-glutamylcysteine reductase in halobacterium halobium. *J Biol Chem* **264**, 719-725 (1989).
- Suzuki H & Sugiyama Y. Excretion of gssg and glutathione conjugates mediated by mrp1 and cmoat/mrp2. *Semin Liver Dis* **18**, 359-376 (1998).
- Suzuki M & Kurata M. Effects of atp level on glutathione regeneration in rabbit and guinea-pig erythrocytes. *Comp Biochem Physiol B* **103**, 859-862 (1992).
- Sztul ES, Hendrick JP, Kraus JP, Wall D, Kalousek F & Rosenberg LE. Import of rat ornithine transcarbamylase precursor into mitochondria: Two-step processing of the leader peptide. *J Cell Biol* **105**, 2631-2639 (1987).
- Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S & Takahashi K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein p. *J Biol Chem* **277**, 41254-41258 (2002).
- Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin TK, Hirst J & Murphy MP. Reversible glutathionylation of complex i increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem* **278**, 19603-19610 (2003).
- Temple MD, Perrone GG & Dawes IW. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**, 319-326 (2005).
- Teshigawara M, Matsumoto S, Tsuboi S & Ohmori S. Changes in levels of glutathione and related compounds and activities of glutathione-related enzymes during rat liver regeneration. *Res Exp Med (Berl)* **195**, 55-60 (1995).
- Tietze F. Enzyme method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522 (1969).
- Toppo S, Flohe L, Ursini F, Vanin S & Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1486-1500 (2009).
- Townsend DM, Tew KD & Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* **57**, 145-155 (2003).
- Tsuchiya K, Mulcahy RT, Reid LL, Disteché CM & Kavanagh TJ. Mapping of the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene (glclc) to human chromosome 6p12 and mouse chromosome 9d-e and of the regulatory subunit gene (glclr) to human chromosome 1p21-p22 and mouse chromosome 3h1-3. *Genomics* **30**, 630-632 (1995).
- Tu Z & Anders MW. Expression and characterization of human glutamate-cysteine ligase. *Arch Biochem Biophys* **354**, 247-254 (1998).

Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R & Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective sirna sequences for mammalian and chick rna interference. *Nucleic Acids Res* **32**, 936-948 (2004).

Veas-Perez de Tudela M, Delgado-Esteban M, Cuende J, Bolanos JP & Almeida A. Human neuroblastoma cells with mycn amplification are selectively resistant to oxidative stress by transcriptionally up-regulating glutamate cysteine ligase. *J Neurochem* **113**, 819-825 (2010).

Veeravalli K, Boyd D, Iverson BL, Beckwith J & Georgiou G. Laboratory evolution of glutathione biosynthesis reveals natural compensatory pathways. *Nat Chem Biol* **7**, 101-105 (2010).

Wadey AL, Muyderman H, Kwek PT & Sims NR. Mitochondrial glutathione uptake: Characterization in isolated brain mitochondria and astrocytes in culture. *J Neurochem* **109 Suppl 1**, 101-108 (2009).

Weber CA & Ernst ME. Antioxidants, supplements, and parkinson's disease. *Ann Pharmacother* **40**, 935-938 (2006).

Wefers H & Sies H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem* **137**, 29-36 (1983).

Wells WW, Xu DP, Yang YF & Rocque PA. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* **265**, 15361-15364 (1990).

Whitworth AJ, Theodore DA, Greene JC, Benes H, Wes PD & Pallanck LJ. Increased glutathione s-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a drosophila model of parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8024-8029 (2005).

Wild AC, Moinova HR & Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor nrf2. *J Biol Chem* **274**, 33627-33636 (1999).

Will Y, Fischer KA, Horton RA, Kaetzel RS, Brown MK, Hedstrom O, Lieberman MW & Reed DJ. Gamma-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial function, and cellular function. *Hepatology* **32**, 740-749 (2000).

Winterbourn CC & Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* **314**, 284-290 (1994).

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR & Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* **134**, 489-492 (2004).

Yan N & Meister A. Amino acid sequence of rat kidney g-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **265**, 1588-1593 (1990).

Bibliografía

Yang H, Zeng Y, Lee TD, Yang Y, Ou X, Chen L, Haque M, Rippe R & Lu SC. Role of ap-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone. *J Biol Chem* **277**, 35232-35239 (2002a).

Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW & Dalton TP. Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *J Biol Chem* **277**, 49446-49452 (2002b).

Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A & Prolla TA. The selenoprotein gpx4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med* **34**, 496-502 (2003).

Zeevalk GD, Razmpour R & Bernard LP. Glutathione and parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother* **62**, 236-249 (2008).

Zhang Y, Handy DE & Loscalzo J. Adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress. *Circ Res* **96**, 831-837 (2005).

Zielonka J & Kalyanaraman B. Hydroethidine- and mitosox-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med* **48**, 983-1001 (2010).