



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Instituto de Biología
Funcional y Genómica

**Regulación de la respuesta
antioxidante en sistema nervioso:
función neuroprotectora de la vía
de señalización NMDAR-CDK5-
NRF2 en astrocitos**

-TESIS DOCTORAL-

DANIEL JIMÉNEZ BLASCO

Salamanca, 2014



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Instituto de Biología
Funcional y Genómica

Regulación de la respuesta antioxidante en sistema nervioso: función neuroprotectora de la vía de señalización NMDAR-CDK5- NRF2 en astrocitos

DANIEL JIMÉNEZ BLASCO

Directores:

Prof. Dr. D. Juan Pedro Bolaños Hernández

Prof^{ca}. Dra. D^a. Ángeles Almeida Parra

Salamanca, 2014

Juan Pedro Bolaños Hernández, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca, y Ángeles Almeida Parra, Investigadora del Hospital Universitario de Salamanca y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Regulación de la respuesta antioxidante en sistema nervioso: función neuroprotectora de la vía de señalización NMDAR-CDK5-NRF2 en astrocitos**”, que ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Biología, Daniel Jiménez Blasco, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y en el Instituto de Biología Funcional y Genómica de la Universidad de Salamanca



Salamanca, a 16 de julio de 2014.

Fdo.: Juan Pedro Bolaños Hernández

Fdo.: Ángeles Almeida Parra

*Yo camino entre triunfos, también entre fracasos.
Y enfrento cada día, tener que continuar.
Aunque a veces son lentos, y cansados mis pasos,
no hay quien me detenga, tratando de alcanzar.*

*Aquello que ambiciono, por difícil que sea,
o por inalcanzable, como suelen decir.
Aquellos que no luchan, contra viento y marea,
Aquellos que no rompen cadenas, por seguir.*

*Aquellos que la vida, la ven como rutina,
Confiado en su destino, o en la suerte tal vez,
Aquellos que prefieren vivir a la deriva,
Porque no tienen metas, ni ganas de vencer.*

*Yo camino y camino, por intrincadas sendas,
Navego por los mares, en plena tempestad,
Dejo volar mi mente, desatando sus vendas,
Y en ese punto logro ¡lo que anhelo alcanzar!*

Aurora García

Agradecimientos

Todas las etapas de la vida tienen su inicio y su final. Hoy me toca cerrar la etapa de mi Tesis Doctoral después de cuatro años maravillosos llenos de experiencias muy gratificantes tanto a nivel laboral como personal. Esta tesis ha sido posible no sólo a mi esfuerzo y dedicación sino a todas aquellas personas que me habéis acompañado y sin las cuales este sueño no se hubiera hecho realidad. No existen palabras para expresar mi más sincero agradecimiento a todos ellos. Por ello, quiero que se sientan identificadas en esta Memoria.

A Juan Pedro Bolaños, por tu profesionalidad y excelencia científica. Admiro tu entrega y dedicación y eres un claro ejemplo a seguir. Gracias por darme la oportunidad de conocer el apasionante mundo de la ciencia y aportarme multitud de ideas que han hecho posible esta tesis.

A Ángeles Almeida, por tu confianza y por la firmeza que transmites. Por cuidar los detalles, por todo lo que me has enseñado y por las geniales ideas que me has dado a lo largo de esta tesis.

Gracias a Emilio Fernández por sus argumentadas charlas, por enseñarme a cómo trabajar en un laboratorio, por su humor y por su apoyo incondicional.

A Antonio González y a su grupo de investigación por la colaboración brindada en esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, a los que se fueron: Rubén, Carol Seila, Patri, y Raquel, gracias por todos los consejos que me habéis dado, por todas las risas y momentos inolvidables que quedarán siempre en mi corazón. Sois excelentes compañeros y magníficos científicos.

A todos los compañeros que dejo: a María por acogerme como a uno más al inicio de esta aventura, por todo lo que me has enseñado, por tu paciencia (jajaja), por ser una excelente profesional que adora su trabajo transmitiéndolo

a los demás y haciendo que me interesase mucho más por la ciencia. Por todos los momentos que hemos pasado y que nunca olvidaré, me llevo una gran amiga. Gracias a Cris, por tener siempre una sonrisa ante las tempestades, por hacerlo todo tan fácil, por tu buen rollo, deberíamos aprender todos un poquito de ti, eres una gran compañera y amiga. Gracias a Vero, por tu sinceridad, transparencia y paciencia, por ayudarme en todos los temas burocráticos, por esas barbacoas, por esos futbolines, por todos los sustos que me has dado, por todos los momentos que hemos compartido A Rebe, por tu claridad, por intentar solucionar los problemas en el momento, por tu cariño, por todos los momentos bonitos que hemos compartido, por esas cenitas, por esas fiestas de disfraces, se nota que eres ¡¡RIOJANA!!.

Gracias a Irene Sire, por tu bondad y serenidad, por no poner nunca una mala cara y por el buen rollo que transmites. Los laboratorios necesitan más gente como tú. Gracias a Jesús, por tu fiel disponibilidad y por querer ayudar siempre a los demás. A Rebeca Vecino, Platanito, Laura, Ana, Juanjo, Carlos, Luis Jorge y Mari que aunque han sido pocos los momentos que hemos compartido, son suficientes como para llevarme un excepcional concepto de vosotros. Gracias a Mónica Carabias, por tu carácter, por tu sinceridad y porque eres la alegría de la huerta.

A mis compis del 2.7: Gracias a Irene López, por tu tesón y dedicación, porque eres una trabajadora nata, por estar siempre que te he necesitado y porque he conectado estupendamente contigo. Eres una maravillosa compañera, una excelente científica y una gran amiga. Gracias a Nico, porque a pesar de que lleves poquito y de que seas italiano (jejeje), te has convertido en un amigo incondicional. Gracias a Mónica Resch, eres la persona más eficiente que conozco, imprescindible en este laboratorio. Gracias por todos los favores que me has hecho, porque siempre estás ahí, por tu inmensa paciencia. No hay líneas para agradecerte todo lo que has hecho por mí. A Carmen, por ser una niña fantástica, simpática y agradecida. A Moussa, por obligarme a practicar el inglés.

Gracias a mi pequeña familia *Lost*, Miguel, Bárbara, Juan y Pablo. Por todos los momentos inolvidables que hemos compartido, por esas cenitas, esos partidos de fútbol, esas fiestas hasta altas horas de la madrugada. Sois

una familia maravillosa y os admiro por la forma que tenéis de sobrellevar las cosas. Habéis sido una parte muy importante para mí en estos cuatro años y nunca os olvidaré.

Gracias a mi family de *Charrolandia*, Álex, Ana y Moon. Habéis sido mi familia en Salamanca, mis amigos, mis confidentes. Os agradezco muchísimo esos dos años maravillosos de convivencia, hemos compartido momentos inolvidables, la boda, el viaje a Costa Rica, el rincón secreto de Álex, jejeje. Sois amigos incondicionales y parte de esta tesis es vuestra.

Gracias a mis grandes amigos, David, Javi y Sergio. Sois una pieza fundamental en mi vida y lo sabéis. Gracias por acogerme de forma ejemplar en mi regreso a Logroño y hacerme sentir especial con vuestra compañía. Sois personas magníficas e incomparables y parte de este trabajo es gracias a vosotros.

Gracias a Andrés, Alberto, Cami porque sois personas íntegras de los pies a la cabeza y por acompañarme en esta etapa de mi vida, Ha sido un verdadero placer compartir con vosotros cada uno de los momentos que hemos estado juntos.

Gracias a Eka, Aio y Nieves por esas risas, por esas cenitas, por esos momentos increíbles juntos, por tener siempre una sonrisa, por apoyarnos en los momentos de agobio y por estar siempre ahí cuando lo hemos necesitado.

Gracias a todas esas personas que he ido dejando en el camino, amigos de la Facultad de Biología y Bioquímica, amigos del Máster de Neurociencias, compañeros de otros laboratorios con los que he compartido una de las etapas más importante de mi vida y con los que he crecido como persona.

Gracias a mi familia, por estar siempre conmigo y apoyarme en todas mis decisiones. Gracias a mis padres por ser los mejores del mundo, por hacerme ser quien soy, por darme los valores necesarios y la fuerza para alcanzar los objetivos que me he ido proponiendo a lo largo de la vida. Gracias por darme todo lo que he necesitado de manera desinteresada, por todo el cariño y

apoyo, por ser ejemplares en todas las facetas de la vida. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible, os quiero demasiado.

Gracias a mi familia “Tica” a la que considero mi segunda familia, por aceptarme como a uno más, por todo vuestro cariño que es manifiesto, a pesar de la distancia que nos separa, por todos los momentos que hemos compartido, por las risas. Porque sois una familia envidiable y porque nos habéis apoyado muchísimo en esta etapa de nuestra vida. Siempre habéis estado allí cuando lo he necesitado, os quiero mucho, sois maravillosos.

Gracias a mi hermano Rodrigo, por ser una de las personas más importantes de mi vida, porque eres un tío muy grande, porque no existe un hermano mejor en el mundo, porque siempre has estado ahí cuando lo he necesitado con una sonrisa de oreja a oreja, por todos los detalles bonitos e inolvidables que has tenido conmigo, por tu cariño y porque eres diferente, especial y original, te quiero feo. Parte de esta tesis es gracias a ti.

Gracias a Cati, mi compañera de viaje, mi amiga, el amor de mi vida. Sólo tú conoces el día a día de esta Tesis. Gracias por apoyarme cuando estaba abatido y por aguantar mi mal humor cuando no salían las cosas. Gracias por consolarme con tu cariño y amor incondicional. Haberte conocido ha sido lo más maravilloso del mundo. Gracias por hacerme sentir único cuando estoy contigo. No tengo palabras para agradecerte todo lo que siento. Todos mis logros son tuyos y lo sabes, te amo demasiado.

Gracias a mis peques Usita, Wapi y Hori, por su fidelidad, porque siempre te reciben con una sonrisa, por su cariño y porque muchas veces me he desahogado con ellos sin pedir nada a cambio.

Por último quería agradecer la financiación recibida por el Instituto de Carlos III de Madrid, sin la cual esta tesis no hubiera sido factible.

SINOPSIS.....	1
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN	9
1. Estrés oxidativo	11
1.1. Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS).....	11
1.2. Sistemas antioxidantes.....	12
2. Glutación	15
2.1. Funciones del GSH.....	17
2.2. Biosíntesis del GSH.....	18
2.3. Regulación de la síntesis del GSH.....	19
2.4. Cooperación entre astrocitos y neuronas en el mantenimiento de la homeostasis del GSH.....	20
3. Papel de NRF2 en la respuesta antioxidante	23
3.1. Estructura y función de NRF2	23
3.2. Regulación de NRF2 por el complejo KEAP1-CUL3.....	26
3.2.1. Estructura, función y regulación de las culinas.....	31
4. Neurotransmisión glutamatérgica	37
4.1. Metabolismo del glutamato.....	37
4.2. Receptores de glutamato	38
4.2.1. Receptores metabotrópicos de glutamato.....	39
4.2.2. Receptores ionotrópicos de glutamato.....	40
4.2.2.1. Receptores AMPA y de kainato.....	40
4.2.2.2. Receptores NMDA.....	40
4.2.2.3. Receptores NMDA en astrocitos.....	43
4.3. Papel de los astrocitos en la neurotransmisión.....	45
4.4. Excitotoxicidad.....	47

4.4.1. <i>La excitotoxicidad provoca sobrecarga de Ca²⁺ y activación de calpaínas</i>	48
4.4.2. <i>CDK5-p25 en excitotoxicidad</i>	48
4.4.3. <i>Disfunción mitocondrial y excitotoxicidad</i>	49
4.4.4. <i>una visión general sobre la relación entre la excitotoxicidad y las enfermedades neurodegenerativas</i>	50
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
1. Hipótesis	55
2. Objetivos	56
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Animales	59
2. Cultivos celulares	60
2.1. Cultivo primario de neuronas corticales	60
2.2. Cultivo primario de astrocitos corticales.....	62
2.3. Cocultivos de neuronas y astrocitos corticales	62
2.4. HEK-293T.....	63
3. Diseño y construcción de vectores de expresión, amplificación y purificación	63
3.1. Transformación de bacterias y purificación de plásmidos	63
3.2. Construcción del plásmido pEGFP-C1-NRF2.....	64
3.3. Construcción del plásmido pGEX-2T-NRF2	66
3.4. Construcción del plásmido pGL4.12 [luc2cp]-ARE	67
3.5. Mutagénesis dirigida	69
4. “Small interfering RNA” (siRNA)	71
5. Transfecciones celulares	72
6. Tratamiento de las células	73

6.1. Estimulación de receptores NMDA	73
6.1.1. Estimulación en presencia de quelantes de calcio.....	73
6.1.2. Estimulación en presencia de inhibidores farmacológicos.....	74
6.2. Inhibición de la vía ubiquitina-proteasoma.....	75
6.3. Inhibición de la transcripción.....	75
6.4. Estimulación de la producción de ROS.....	75
7. Determinación de la producción de ROS	76
7.1. Detección de H ₂ O ₂ por Amplex Red™	76
8. Determinación de la concentración de Ca²⁺ intracelular.....	77
8.1. Detección de Ca ²⁺ intracelular.....	77
9. Obtención y manipulación de proteínas	80
9.1. Extracción de proteínas.....	80
9.1.1. Extracción de proteínas totales	80
9.1.2. Extracción de proteínas citosólicas y nucleares	80
9.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	82
9.3. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	83
9.4. Inmunodetección de proteínas por Western Blot.....	83
9.5. “Stripping” de membranas de nitrocelulosa	86
9.6. Tinción de geles SDS-PAGE con azul de coomassie.....	86
9.7. Inmunoprecipitación de proteínas en condiciones desnaturalizantes	86
9.8. Purificación de proteínas fusionadas a glutatión-s-transferasa (GST)	87
10. Determinación de la apoptosis neuronal	88
10.1. Tinción con Anexina V / 7- Amino - Actinomicina D.....	88
11. Detección de MAP2 y GFAP por citometría de flujo.....	89
12. Determinación del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) como índice de integridad mitocondrial.....	91
13. Inmunocitoquímica y microscopía de epifluorescencia	92

14. Obtención y manipulación del RNA	93
14.1. Extracción de RNA	93
14.2. Retrotranscripción (RT).....	94
14.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa	95
14.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (qPCR)	97
14.5. Electroforesis de DNA en geles horizontales de agarosa.....	99
15. Determinación de la concentración de glutatión	100
16. Determinación de la actividad de las kinasas dependientes de ciclinas	102
16.1. Determinación de la actividad kinásica CDK5	102
16.2. Determinación de la actividad kinásica CDK5 sobre NRF2.....	103
17. Ensayo reportero de la luciferasa	103
18. Cell sorting de astrocitos y neuronas	105
19. Análisis estadístico	106
RESULTADOS	107
1. Expresión diferencial de los componentes de la vía de señalización antioxidante NRF2-KEAP1-CUL3 en neuronas y astrocitos	109
2. Expresión de <i>Cop9s5</i> Y <i>Cand1</i> en neuronas y astrocitos	110
3. Efecto del silenciamiento de <i>Cul3</i> sobre la estabilización de NRF2 en neuronas y astrocitos.....	112
4. Expresión diferencial de dos de los genes diana de NRF2, <i>Gclc</i> y <i>Ho-1</i> , en neuronas y astrocitos	113
5. Regulación post-traducciona l de NRF2 mediada por degradación, en neuronas y astrocitos.....	115
6. Determinación de la existencia de NRF2 en las neuronas.	117

7. Respuesta neuronal a estímulos que mimetizan estrés oxidativo.....	120
8. Efecto de la estimulación de receptores NMDA sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular en neuronas y astrocitos.	123
9. La estimulación de receptores NMDA promueve la activación funcional de NRF2 en neuronas y astrocitos.....	126
10. La estimulación de receptores NMDA afecta a la abundancia y localización subcelular de NRF2 en neuronas y astrocitos. ..	128
11. Fosforilación de NRF2 por CDK5 mediada por activación fisiológica de receptores NMDA en neuronas y astrocitos	129
12. Mecanismo de activación de CDK5 mediado por la estimulación de los receptores NMDA en neuronas y astrocitos.....	133
13. La fosforilación de NRF2 por p35/CDK5 regula su localización subcelular y su actividad transcripcional en astrocitos.....	135
14. Regulación de la actividad p35/CDK5 a través de la vía de señalización PLC-PKC δ en astrocitos	139
15. Importancia del Ca^{2+} en la regulación de la actividad p35/CDK5 en astrocitos	141
16. La vía antioxidante NRF2 mediada por NMDA en astrocitos protege a las neuronas frente a estrés.....	143
DISCUSIÓN	149
1. La insuficiente respuesta antioxidante neuronal se debe a la continua desestabilización de NRF2 y a la baja disponibilidad de precursores de GSH.....	151

2. La estimulación fisiológica y sostenida de NMDAR en los astrocitos incrementa la actividad de p35/CDK5 en el citosol	152
3. El Ca ²⁺ es imprescindible para la activación y mantenimiento de la vía NMDAR-PLC-PKCδ en los astrocitos	153
4. Los diferentes mecanismos de regulación post-traducciona l de NRF2 garantizan una respuesta antioxidante celular más eficiente	153
5. Función de los NMDARs en astrocitos.....	154
6. Posible implicación de la vía de transducción CDK5-NRF2 en cáncer.....	155
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161

SINOPSIS

La neurotransmisión glutamatérgica inevitablemente conlleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que puede desencadenar en daño oxidativo y conducir eventualmente a la neurodegeneración. En este trabajo se describe que la activación fisiológica de los NMDARs, en los astrocitos, desencadena una cascada de eventos de señalización destinados a proporcionar una protección antioxidante a las neuronas. La cascada de señalización se inicia con la entrada de Ca^{2+} mediada por NMDA, aunque se sostiene por la liberación de Ca^{2+} desde retículo endoplásmico desencadenada por la activación de la PLC que conduce a la activación de la PKC δ . Una vez activa, la PKC δ mantiene p35 fosforilada para coactivar CDK5 en el citosol. Finalmente, la activación de esta vía de transducción dependiente de CDK5 resulta en la fosforilación de los residuos Thr395, Ser433 y Thr439 de NRF2, provocando su activación funcional. NRF2 activo en los astrocitos estimula la síntesis de GSH mediante el control de la expresión de la GCL, permitiendo la liberación de los precursores del GSH hacia las neuronas, que los utilizan para la síntesis “de novo” como mecanismo neuroprotector.

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

AMPA: Ácido- α -amino-3-(hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico)

ANOVA: Análisis de la Varianza

APC: Alofococianina

ApN: Aminopeptidasa N

ARE: Elemento de Respuesta a Antioxidantes

ASS: Ácido Sulfosalicílico

ATP: Adenosina trifosfato

BACH1: *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*

BAPTA: Ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetraacético

BCA: Ácido Bicinconínico

BDNF: Factor Neurotrófico derivado del cerebro

BSA: Albúmina sérica bovina

BTB/POZ: *Broad-complex, Tramtrack, Bric-à-brac/poxovirus zinc finger domain*

bZIP: *Basic leucine zipper motive*

CAMKII: Proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} - Calmodulina

CAND1: *Cullin-associated and neddylation-dissociated 1 protein*

CBP: *CREB-binding protein*

CCCP: Carbonil cianuro 3- clorofenilhidrazona

Cdk5: Kinasa 5 dependiente de ciclina

cDNA: DNA codificante

CK2: Caseína Kinasa 2

CNC: *Cap 'n' collar protein*

CREB: *cAMP response element binding protein*

CRLs: *Cullin-ring ligases*

CSN: COP9-signalosoma

Ct: Ciclo umbral

CTR: Región C-terminal

CUL3: Culina-3

CysGly: Cisteinilglicina

CHD6: Cromodominio de la Helicasa 6 de unión al DNA

DA: Dopamina

DAG: Diacilglicerol

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

DEPC: Di-etil-piro-carbonato

DGR: Dominio de repeticiones de doble glicina

DiIC₁: 1,1', 3, 3, 3', 3' - hexametilindodicarbo - yoduro de cianina

Dip: Dipeptidasa

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

dsDNA: DNA de doble cadena

DTNB: 5,5'-ditio-bis-acido 2-nitrobenzoico

DTT: Ditiotreitól

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido Etilenglicoltetraacético

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EpRE: Elemento de Respuesta a Electrófilos

FCS: Suero fetal de ternera

γGC: γ-glutamilcisteína

GCL: Glutamato-cisteína ligasa

GCL_c: Subunidad catalítica o pesada de la GCL

GCL_m: Subunidad moduladora o ligera de la GCL

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GGT: γ-Glutamiltranspeptidasa

GPxs: Glutación Peroxidasas

Grxs: Glutarredoxinas

GSH: Glutación reducido

GSK3β: Glucógeno Sintasa Kinasa 3 β

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

GSTs: Glutación-S-Transferasas

GSx: Glutación total
H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
HECT: *Homologous to E6-AP C-Terminus domain*
HEK293T: Línea celular embrionaria de riñón
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
HO-1: Hemooxigenasa-1
HRP: Peroxidasa de Rábano
IP₂: fosfatidil inositol bisfosfato
IP₃: Inositol-1, 4, 5-trifosfato
IPTG: Isopropil p-D-tioglucopiranosido
IVR: Región de Intervención
JAMM: *Jab1/MPN domain metalloenzyme*
KEAP1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*
K_m: Constante de Michaelis-Menten
LOO[•]: Peróxidos lipídicos
LTP: Potenciación a largo plazo
MAF: *Muscle aponeurotic fibrosarcoma protein*
MAGUKs: *Membrane associated guanylate ciclases proteins*
MAP2: *Microtubule-Associated Protein 2*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MCS: Sitio de clonación múltiple
MPEP: 2-metil-6-(feniletinil)-piridina
MPN: *MPR-PAD1-Nterm domain*
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MRE: Elemento de Respuesta a Metales
mRNA: RNA mensajero
MRP1: *Multidrug resistance - associated protein*
mtDNA: DNA mitocondrial
NAC: N-acetil-cisteína
NAD⁺: Nucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado).
NADH(H⁺): Nucleótido de nicotinamida y adenina (reducido)
NADP⁺: Nucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (oxidado)
NADPH(H⁺): Nucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (reducido)
Nedd8: *Neural precursor cell expressed developmentally downregulated prot-8*
NES: Secuencia de exportación nuclear

- NFκ-B:** Factor de transcripción nuclear kappa-B
- NLS:** Secuencia de localización nuclear
- NMDA:** Ácido N-metil-D-aspartato
- NMDAR:** Receptores de ácido N-metil-D-aspartato
- NO[•]:** Óxido nítrico
- NQO-1:** Quinona oxidoreductasa-1
- NRF1:** *Nuclear factor erythroid-derived 1 - like 1*
- NRF2 o NFE2L2:** *Nuclear factor erythroid-derived 2 - like 2*
- NRF2 Mut:** forma fosfodefensiva de NRF2
- NRF2 P-mim:** forma fosfomimética de NRF2
- NRF2 Wt:** forma silvestre de NRF2
- NTR:** Región N-terminal
- OPA1:** *Optic atrophy type 1 protein*
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PCI:** *Proteasome; COP9-signalosome; elongation initiation factor 3, eIF-3*
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- PEI:** Polietilenimina
- PERK:** *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
- PI3K:** Fosfatidilinositol 3 kinasa
- PKA:** Proteína kinasa A
- PKC:** Proteína Kinasa C
- PLC:** Fosfolipasa C
- Prxs:** Peroxirredoxinas
- PTP:** Poro de transición de permeabilidad
- qPCR:** PCR cuantitativa o PCR a tiempo real
- Rbx:** *RING-box protein*
- RING:** *Really Interesting New Gene domain*
- RNA:** Ácido Ribonucleico
- RNS:** Especies Reactivas de Nitrógeno
- ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno
- RT:** Retrotranscriptasa
- S.E.M.:** Error estándar de la media
- SDS:** Dodecil sulfato sódico
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
- SERCA:** Bombas de Ca²⁺ del Retículo Sarcoplásmico

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

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD1 o Cu/ZnSOD: Superóxido Dismutasa 1 o Cu/Zn-superóxido dismutasa

SOD2 o MnSOD: Superóxido Dismutasa 2 o Mn-superóxido dismutasa

t-BHQ: *Tert*-butilhidroquinona

TGF α : Factor de Crecimiento Transformante alfa

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

TrkB-FL: *Tropomyosin-related kinase B*

Trx: Tiorredoxinas

TrxR: Tiorredoxina Reductasa

Ub: Ubiquitina

UPS: Sistema Ubiquitina-Proteasoma

A microscopic image showing numerous green fluorescent cells, likely neurons or similar biological structures, against a dark background. The cells are illuminated with a bright green light, and several bright spots are visible, possibly representing specific markers or proteins. The overall appearance is that of a complex biological network.

Introducción

"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."

Marie Curie

1. ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y DE NITRÓGENO (RNS)

La homeostasis redox se mantiene en los organismos gracias al equilibrio entre los niveles de oxidantes y antioxidantes [Sies, 1997]. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) son producidas en las células, en condiciones fisiológicas, de forma basal (ver **Esquema I**). Así, aunque están generalmente consideradas como potencialmente tóxicas, las ROS y RNS 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 y RNS supera la capacidad de los sistemas antioxidantes de eliminarlas. Esta situación de sobreproducción de ROS y RNS, comúnmente denominada “estrés oxidativo y nitrosativo”, da lugar a la peroxidación de lípidos, oxidación y nitrosilación de ácidos nucleicos [Poyton *et al.*, 2009; Temple *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007] y de *clusters* Fe-S de proteínas (incluyendo algunos complejos de la cadena respiratoria y la aconitasa), que pueden originar alteraciones en la estructura de estas biomoléculas y mutaciones en el DNA mitocondrial ($_{mt}$ DNA) [Fukui and Moraes, 2008; Hekimi *et al.*, 2011].

El estrés oxidativo y nitrosativo 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 y Sohal, 2008], y se la relaciona con la etiología del cáncer o con diversas enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y neurodegenerativas [Bolaños *et al.*, 2009; Halliwell, 2011; Temple *et al.*, 2005].

La cadena transportadora de electrones mitocondrial es la principal fuente de formación de ROS intracelular. El 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 estrictamente regulado por el estado redox y energético celular, lo que sugiere que el $O_2^{\bullet-}$, así formado, ejerce funciones fisiológicas [D'Autreaux & Toledano, 2007; Poyton *et al.*, 2009]. De hecho, la producción $O_2^{\bullet-}$ por el complejo I mitocondrial se incrementa cuando el ratio NADH (H^+) / NAD^+ y el gradiente electroquímico son altos [Murphy, 2009]. Si bien la reactividad del $O_2^{\bullet-}$ es limitada en comparación con otras especies reactivas de oxígeno, tiene la capacidad de promover la reducción de Fe^{3+} en Fe^{2+} (reacción de *Haber-Weiss*), y formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede originar radical hidroxilo (OH^{\bullet}) a partir la reoxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} (reacción de *Fenton*) [Temple *et al.*, 2005]. El $O_2^{\bullet-}$ también se puede formar por otras vías, como la actividad de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa, y la transformación de ácido araquidónico a prostaglandina PGH_2 . La xantina oxidasa y NADPH oxidasa son también fuentes destacadas de producción de $O_2^{\bullet-}$ [Circu & Aw, 2010; Temple *et al.*, 2005].

1.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Para contrarrestar los efectos de las ROS y RNS y mantener la homeostasis redox, las células nerviosas han desarrollado varios sistemas antioxidantes (ver **Esquema I**). Por un lado se encuentran las superóxido dismutasas citosólica (Cu/Zn-SOD o SOD1), mitocondrial (Mn-SOD o SOD2) y extracelular (SOD3), que eliminan $O_2^{\bullet-}$ convirtiéndolo en H_2O_2 . Dadas sus propiedades pro-oxidantes, el H_2O_2 debe ser rápidamente eliminado, para lo cual actúan diversos sistemas enzimáticos que lo reducen a H_2O . Los más importantes son la catalasa presente en el citosol y en los peroxisomas, las peroxirredoxinas (Prxs), que requieren el sistema tiorredoxina (Trx) / tiorredoxina reductasa (TrxR) para ser regeneradas, y las glutatión peroxidasa (GPxs), que requieren glutatión (GSH) y glutatión reductasa (GSR) para regenerarse. Tanto las Prxs como las GPxs tienen diferentes isoformas y están presentes en los compartimentos citosólico y mitocondrial [Hekimi *et al.*, 2011; Mari *et al.*, 2009].

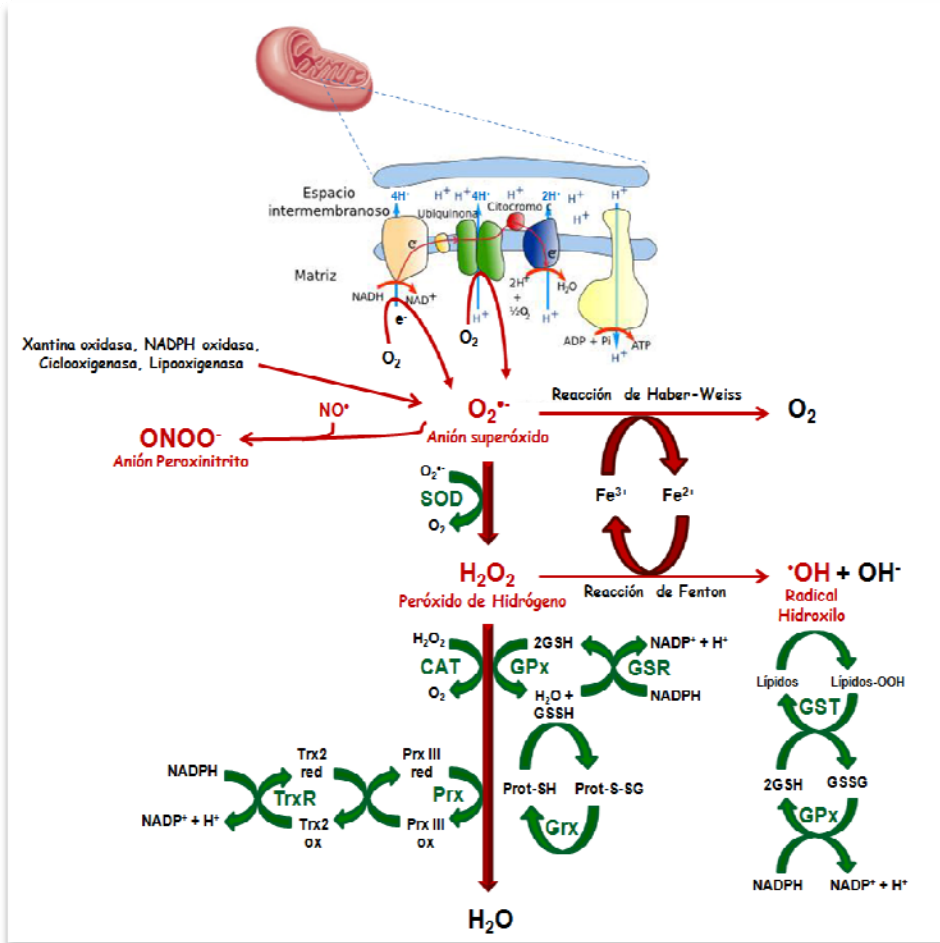
El sistema redox de Trx se trata de un sistema multifuncional, constituido por proteínas que catalizan la reducción reversible de uniones disulfuro de proteínas. La reacción redox se lleva a cabo gracias a la presencia de dos cisteínas en su sitio activo (Cys-XX-Cys), que son regeneradas por la TrxR 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 & Jones, 2008]. El sistema Trx / TrxR contribuye a la reducción de las cisteínas del sitio activo de las Prxs. Éstas constituyen un grupo de peroxidases no específicas para selenotioles, que contribuyen a la eliminación de hidroperóxidos orgánicos y H₂O₂ [Circu & Aw, 2010]. Para ello, constan de un sitio catalítico con cisteínas peroxidáticas, capaces de oxidarse a ácido sulfénico (Cys-SOH) y formar posteriormente puentes disulfuro con otra cisteína en la subunidad C-terminal. Existen seis isoformas, localizadas en citosol (PrxI-II y PrxVI), mitocondrias (PrxIII), mitocondrias y peroxisomas (PrxV), siendo la PrxIV extracelular.

Es un hecho remarcable la dependencia que presentan numerosas enzimas antioxidantes de utilizar el GSH y otros tioles como cofactor. Las GPxs catalizan la reducción de H₂O₂ y otros peróxidos orgánicos usando como cofactores tanto el GSH como la Trx [Maiorino *et al.*, 2007]. Sólo la isoforma GPx1 prefiere el GSH como cofactor [Flohe *et al.*, 1971; Takebe *et al.*, 2002] aunque su actividad también depende del suministro de NADPH [Flohe, 2009; Toppo *et al.*, 2009]. La isoforma GPx4, que está exclusivamente localizada en la mitocondria, tiene un importante papel en la reducción de peróxidos lipídicos [Flohe *et al.*, 1971; Toppo *et al.*, 2009]. Las glutarredoxinas (Grxs) son oxidorreductasas versátiles que glutationilan proteínas de forma reversible [Zeevalk *et al.*, 2008], aunque también tienen actividad dehidroascórbico reductasa [Wells *et al.*, 1990]. Las glutatión S-transferasas (GSTs), que muestran diferentes propiedades cinéticas en función de la isoforma y localización subcelular, citosólica o mitocondrial [Hayes *et al.*, 2005], detoxifica grupos electrófilos usando GSH como cofactor [Douglas, 1987] aunque también pueden usar γ -glutamilcisteína (γ GC) [Sugimoto *et al.*, 1985]. Las γ -glutamyltranspeptidasas (GGT), presentes en la membrana plasmática, detoxifican xenobióticos usando GSH como cofactor y juegan un papel crucial

en la defensa frente al estrés oxidativo [Paolicchi *et al.*, 2002; Paolicchi *et al.*, 2003] pero también regula eventos de S-tionilación [Pompella *et al.*, 2007].

Otro compuestos que presentan actividad antioxidante en el sistema nervioso central (SNC) es el ácido ascórbico y la vitamina E, que no necesariamente requieren la utilización de tioles como cofactor, ya que a través de sus dos grupos hidroxilo ionizables atrapan radicales libres actuando como *scavengers*. Sin embargo, alguno de ellos requiere GSH para su reducción y regeneración, como ocurre con el par ascorbato / dehidroascorbato [Harrison & May, 2009]. El ascorbato es especialmente abundante en las neuronas [Shimizu *et al.*, 1960]. Sin embargo, la vitamina E es más abundante en los astrocitos cuando comparamos con las neuronas y los protege contra el daño oxidativo mitocondrial [Heales *et al.*, 1994].

Cabe destacar la capacidad del H_2O_2 para reaccionar con residuos de cisteína de forma selectiva [Le Moan *et al.*, 2006], ya que no oxida tioles proteicos de manera aleatoria. Ello explica que la cisteína del glutatión sólo actúe como antioxidante mediante la actividad de las GPxs o formando aductos S-glutationilados con ácidos sulfénicos en proteínas [D'Autreaux & Toledano, 2007]. El glutatión es un tiol de bajo peso molecular considerado el más abundante sistema antioxidante (0.5-10 nmol/l) en las células animales [Meister & Anderson, 1983] que juega un papel esencial en la protección frente al estrés oxidativo y nitrosativo, manteniendo el estado redox celular. Por este motivo el glutatión recibe un detallado análisis en sucesivos apartados.



Esquema I. Principales mecanismos de producción y detoxificación de ROS y RNS. Debido a la alta reactividad de las ROS y RNS, es posible la interacción entre las distintas vías, siendo utilizado el producto de una reacción para generar nuevas especies reactivas. Los sistemas de generación de ROS y RNS están indicados en color rojo y los sistemas de detoxificación en color verde.

2. GLUTATIÓN

El tripéptido γ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina (glutatión o GSH) (ver **Figura I**) es considerado como el principal sistema antioxidante tiólico, ya que está ampliamente distribuido en células de animales, plantas y microorganismos, donde se encuentra en una elevada concentración. Así, el glutatión es el tiol presente mayoritariamente en el citosol (85-90%), donde tiene una vida media de 2-3 h. El resto del glutatión se encuentra repartido en diversos orgánulos,

principalmente mitocondria (10-15%) [Lu, 2009; Meredith y Reed, 1982], aunque también en núcleo, retículo endoplasmático y peroxisomas [Lu, 2009; Wu *et al.*, 2004a]. Los niveles más altos de GSH se localizan, por orden decreciente, en hígado, bazo, riñón, cristalino, eritrocitos y leucocitos [Njalsson, 2005].

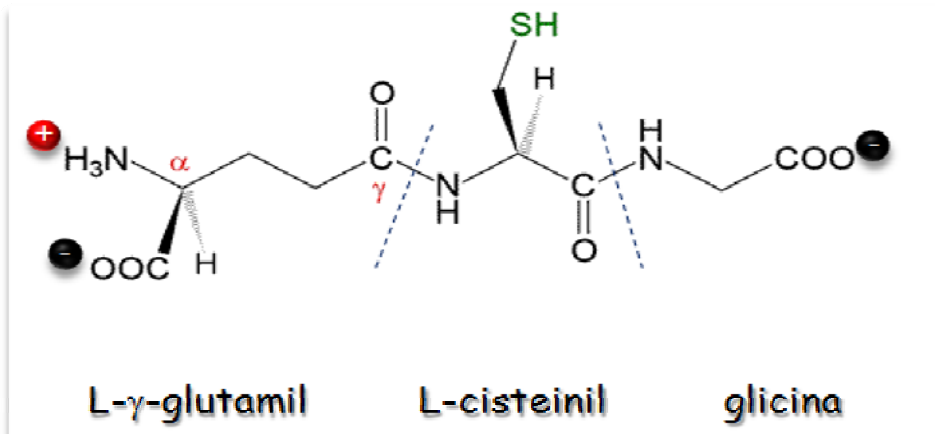


Figura 1. Estructura aminoacídica del GSH. La unión inusual en posición γ -carboxilo del glutamato, le confiere resistencia a la molécula frente a la degradación por enzimas como la γ -glutamiltanspeptidasa (GGT), situada en la cara exterior de la membrana de ciertos tipos celulares como los astrocitos. Adaptado de [Lash, 2006].

La mayoría del glutati6n se encuentra en forma reducida (GSH), pero una proporci6n de 6ste (1-5%) se encuentra oxidado (disulfuro de glutati6n o GSSG) [Lu, 2009]. En el cerebro, el GSH tiene una concentraci6n media de 1-3 mM, [Dringen, 2000], aunque presenta una distribuci6n heterog6nea dependiendo del tipo celular. As6, la concentraci6n de GSH en neuronas es de ~ 2.5 mM, mientras que en astrocitos es > 3.5 mM (~ 8 mM en cultivo) [Dringen, 2000; Zeevalk *et al.*, 2008].

La suma de las formas reducida y oxidada constituyen el GSH total (GSH+GSSG), del cual hasta el 15% puede estar unido a prote6nas [Wu *et al.*, 2004a]. S6lo una proporci6n del 1-5% del GSH se encuentra en su forma oxidada como disulfuro (GSSG), o conjugado como disulfuro con xenobi6ticos (GSSX) o con prote6nas (GSSPr) que contienen peque6os 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, 2002; Schafer y Buettner, 2001]. Esta razón puede verse modificada por procesos oxidativos severos o por otros pares redox, como Trx reducida / Trx oxidada o NADPH (H^+) / $NADP^+$ [Dalton *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004a]. La principal vía de regeneración del GSH a partir del GSSG es la GSR [Rahman *et al.*, 1999] que además también contribuye a la defensa frente al estrés oxidativo [Kelner & Montoya, 2000] y requiere NADPH como cofactor.

2.1. FUNCIONES DEL GSH

La actividad antioxidante ha sido tradicionalmente asumida como la función primordial del GSH, siendo así considerado como uno de los principales responsables 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 esporádicamente con moléculas como el $O_2^{\cdot-}$ [Ross *et al.*, 1985; Wefers & Sies, 1983; Winterbourn & Metodiewa, 1994], el OH^{\cdot} , el NO^{\cdot} , el singlete de oxígeno (1O_2), el H_2O_2 , el $ONOO^-$ o peróxidos lipídicos (LOO^{\cdot}), a través de GPx o Prx [Franco & Cidlowski, 2009]. GSH también reacciona directamente con radicales de proteínas y DNA, donando electrones y oxidándose (GS^{\cdot}), dando lugar a la forma oxidada, GSSG [Franco & Cidlowski, 2009]. Sin embargo, las 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 destoxificación de xenobióticos a través de la formación de conjugados de forma espontánea, o enzimáticamente, en reacciones catalizadas por la GST [Meister, 1988].

Principales Funciones del GSH
- Defensa Antioxidante (Dringen <i>et al.</i> , 2013; Winterbourn <i>et al.</i> 1994; Franco & Cidlowski, 2009)
- Detoxificación de electrófilos y xenobióticos (Lu, 2009; Meister, 1988)
- Modulación intracelular de tioles (Kumare <i>et al.</i> , 2011; Lu, 2009)
- Modificaciones postraduccionales en proteínas (Ballatori <i>et al.</i> , 2009; Franco & Cidlowski, 2009; Reynaert <i>et al.</i> , 2006; Wu <i>et al.</i> , 2004)
- Reservorio de cisteína (Lu, 2009; Meister, 1988)
- Neurotransmisión y neuromodulación. Señalización neurohormonal (Janaky <i>et al.</i> , 2000)
- Regulación del crecimiento celular (Holmgren, 1981; Lu, 2009)
- Regulación de la muerte celular (Cazanave <i>et al.</i> , 2007; Díaz-Hernández <i>et al.</i> , 2005; Franco & Cidlowski, 2009; Franklin <i>et al.</i> , 2002; García-Ruiz and Fernández-Checa, 2006, 2007; Lash, 2006; Lu, 2009; Sato <i>et al.</i> , 2004)
- Funcionalidad e integridad mitocondrial (Wu <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 1. Funciones del GSH. Las principales funciones moduladas directa o indirectamente por el GSH vienen recogidas en esta tabla.

2.2. BIOSÍNTESIS DEL GSH

La síntesis de GSH tiene lugar en dos reacciones dependientes de ATP, donde la primera está catalizada por la glutamato cisteína ligasa (GCL, GSS, Gsh1 o GshA), formando el dipéptido 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 procariotas 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].

La GCL es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad catalítica de 73 KDa [Huang *et al.*, 1993a] y una moduladora de 27.7 KDa [Makar *et al.*, 1994], abreviadas como GCLc y GCLm respectivamente. Los

residuos del sitio activo de la enzima se encuentran en la GCLc mientras que la GCLm incrementa la afinidad de la GCLc por el glutamato [Huang *et al.*, 1993b], disminuye la sensibilidad a la retroinhibición ejercida por el GSH y disminuye la constante de Michaelis-Menten (K_m) por el ATP [Chen *et al.*, 2005] y el glutamato.

2.3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL GSH

La síntesis *de novo* del GSH 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 [Wu *et al.*, 2004b] y c) la retroinhibición de GCL por GSH [Griffith, 1999; Wu *et al.*, 2004a]. A estos factores se le pueden añadir otros moduladores secundarios, tales como los eventos de fosforilación y nitrosación de la GCL, que regulan la síntesis de GSH.

Los niveles de GCL son regulados de forma transcripcional y post-transcripcional. El estrés oxidativo y nitrosativo promueven la transcripción de GCL a través de la activación del elemento de respuesta antioxidante (ARE), localizado en las regiones promotoras de los genes antioxidantes [Lu, 2000; Wu *et al.*, 2004a; Kang *et al.*, 2005]. En esta respuesta juega un papel esencial NRF2, un factor de transcripción de la familia bZIP (*basic leucine zipper*) que promueve la transcripción de ambas subunidades de la GCL (ver **Sección 3**).

El promotor de la GCL también contiene elementos de respuesta a electrófilos (EpRE) [Wild *et al.*, 1999] donde se une la proteína activadora AP-1 junto con los factores de transcripción Jun y Fos [Rahman, 2005]. Además el promotor del GSH también contiene dos secuencias *E-box* donde los protooncogenes c-Myc o n-Myc pueden unirse en respuesta a H_2O_2 [Benassi *et al.*, 2006; Veas-Pérez de Tudela *et al.*, 2010]. El sitio de unión para el factor de transcripción nuclear kappa-B ($NF\kappa-B$) está solo presente en el promotor de la GCLc e incrementa su expresión en respuesta al factor de necrosis tumoral α ($TNF\alpha$) o estrés oxidativo [Rahman, 2005]. Otros activadores transcripcionales

de la GCL son Sp-1, AP-2 o el elemento de respuesta a metales (MRE) [Lu, 2009].

El promotor de la GSS contiene sitios de unión para el activador AP-1 o el inhibidor NF-1 [Yang *et al.*, 2002]. En humanos, NRF1 y NRF2 inducen la activación del promotor de la GSS, siendo NRF2 esencial para mantener la concentración basal de la enzima [Lee *et al.*, 2005]. NRF2 también activa el promotor de la GGT [Pompella *et al.*, 2007].

La regulación post-transcripcional de la GCL está basada principalmente en la estabilización de su mRNA y en modificaciones post-traduccionales. La actividad de la GCLc disminuye por fosforilación de proteína kinasa A (PKA), proteína kinasa C (PKC) o proteína kinasa II dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina (CaMKII) [Lu, 2009; Soltaninassab *et al.*, 2000]. La GCL también puede ser inhibida por NO mediante nitrosilación o por compuestos nitrosilantes [Griffith, 1999]. La caspasa 3 puede escindir la GCLc de la holoenzima GCL [Franklin *et al.*, 2002] promoviendo apoptosis por el descenso en la concentración de GSH.

2.4. COOPERACIÓN ENTRE ASTROCITOS Y NEURONAS EN EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS DEL GSH

En el sistema nervioso los astrocitos son lo que asumen mayoritariamente la función de sintetizar GSH a través de la activación de NRF2, ya que la actividad de la GCL es muy superior en comparación con la de neuronas [Dringen *et al.*, 1999a; Gegg *et al.*, 2003; Makar *et al.*, 1994]. Esto contribuye, muy posiblemente, a la elevada resistencia de los astrocitos frente al estrés oxidativo en comparación con las neuronas. Estas células gliales exportan GSH a una velocidad de 2.1 nmol/h · mg proteína, siendo capaces en 1 h de liberar el 10% de su contenido en el tripéptido [Dringen *et al.*, 1997b], 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 aportación a las neuronas. Un fenómeno similar ocurre para los precursores de GSH, que las neuronas utilizan para sintetizarlo *de novo* [Sagara *et al.*, 1996]. La

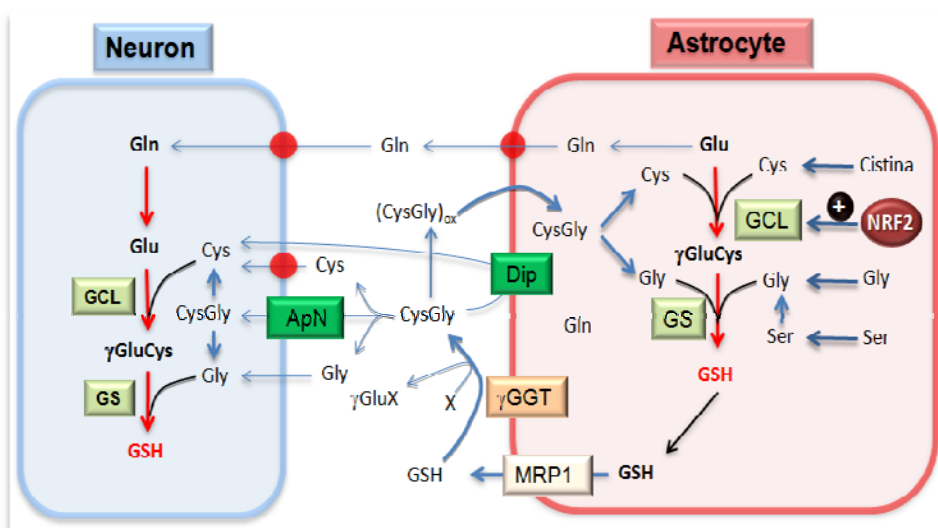
administración exógena de GSH es poco efectiva para incrementar su propia concentración celular ya que no se importa a las células y es rápidamente degradado [Griffith, 1999]. Los astrocitos parecen ser las únicas células en el cerebro que liberan cantidades significativas de GSH o GSSG en condiciones de estrés oxidativo, siendo *Multidrug resistance - associated protein* (MRP1) el principal mecanismo de exportación de ambas moléculas [Dringen & Hirrlinger, 2003; Hirrlinger *et al.*, 2001]. De hecho, la inhibición de MRP1 reduce al 70% la exportación de GSH, menguando el suplemento de los precursores del GSH para la síntesis *de novo* del mismo por parte de las neuronas [Scheiber y Dringen, 2011].

El GSH liberado de los astrocitos puede sufrir una posterior transpeptidación a cisteinilglicina (CysGly) y γ -glutamil-aminoácido, catalizada por la GGT (ver **Esquema II**). La transpeptidación por GGT es el primer paso en la captación de GSH por las neuronas [Sagara *et al.*, 1993; Zeevalk *et al.*, 2008]. Las neuronas pueden captar directamente la CysGly a través de la aminopeptidasa N (ApN) e incorporarlo a la biosíntesis de GSH [Dringen *et al.*, 2001].

Las neuronas utilizan ávidamente CysGly, N-acetil-cisteína (NAC) o γ GC como precursores de GSH, siendo más apropiada su escisión previa mediante dipeptidasas (Dip) [Dringen, 2000; Martin & Teismann, 2009]. En el caso de γ GC, ésta puede formarse por la transpeptidación del grupo γ -glutamilo de 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].

Por tanto, los astrocitos suministran a las neuronas los precursores necesarios para la síntesis del GSH [Bolaños & Heales, 2010; Dringen 2000; Dringen *et al.*, 1999a] a través de un mecanismo complejo que constituye una estrategia antioxidante esencial. Nuestro grupo previamente demostró que la modulación genética de la biosíntesis del GSH sobreexpresando o silenciando la GCLc, afectaba a la vulnerabilidad de los cultivos primarios de neuronas

frente al exceso de NO^{*} y excitotoxicidad [Díaz-Hernández *et al.*, 2005]. La presencia de astrocitos en cocultivos no fue suficiente para evitar la muerte neuronal por apoptosis causada por la pérdida de GCL, lo que confirma que las neuronas requieren de una maquinaria biosintética intacta para sintetizar GSH a partir de los precursores suministrados por los astrocitos. Por lo tanto, la limitación del suministro de cualquiera de los precursores del GSH como de la capacidad de las neuronas para usarlos provoca estrés oxidativo y neurodegeneración dando lugar a enfermedades como Parkinson o trastornos mentales [Jenner *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 1982].



Esquema II. Biosíntesis de GSH en el sistema nervioso. La mayoría de la síntesis de GSH en el sistema nervioso es llevada a cabo por los astrocitos y regulada por el factor de transcripción nuclear NRF2, que controla la expresión de la GCL, γ GGT y MRP1. La expresión coordinada de estas enzimas contribuye al incremento de la síntesis del GSH, su liberación y su escisión extracelular en Cys-Gly (CysGly) por la ApN. Las neuronas importan la Cys y la Gly mediante transportadores específicos y también incorporan la glutamina (Gln) suplementada por los astrocitos, que es convertida a glutamato. Por tanto, la síntesis “de novo” neuronal del GSH depende del suministro de los precursores del GSH desde los astrocitos. Las abreviaturas están enumeradas en la correspondiente sección. Adaptado de [Fernández-Fernández *et al.*, 2012].

3. PAPEL DE NRF2 EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE

3.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE NRF2

El estrés oxidativo está íntimamente asociado con la iniciación y/o la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer o la epilepsia [Halliwell, 2006; Matsuoka et al., 1998; SantaCruz et al., 2004]. Por tanto, la capacidad de adaptación al estrés es un requisito indispensable para la supervivencia celular y de los organismos a cualquier nivel. Ello hace imperativo que se desarrollen ajustes para contender contra las moléculas oxidantes y las células lo logran desplegando un complejo sistema antioxidante para mantener la homeostasis redox. Uno de los mecanismos de adaptación a estrés más versátil y efectivo implica a NRF2 o NFE2L2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2 - like 2*), un factor de transcripción que pertenece a una familia de proteínas básicas con 6 dominios altamente conservados, llamados Neh1-6 (ver **Figura II**) basados en regiones de homología compartidas entre las proteínas NRF2 de mamíferos y el ortólogo de pollo, llamado ECH [Itoh et al., 1995; Venugopal & Jaiswal, 1996].

El dominio C-terminal Neh1 contiene un muy conservado y característico motivo de cremallera de leucina (bZip) fusionado a una región homóloga a la proteína *cap 'n' collar* de *Drosophila* (CNC), que es el responsable de la dimerización con proteínas MAF pequeñas (*muscle aponeurotic fibrosarcoma*) y de la unión al DNA formando un heterodímero. Este dominio también está presente en NRF1 y NRF3 [Motohashi et al., 2002]. El dominio N-terminal Neh2 es el responsable de la unión al represor citosólico de NRF2, llamado KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) [Itoh et al., 1999]. El dominio C-terminal Neh3 interactúa con el cromodominio de la helicasa 6 de unión al DNA (CHD6) y podría actuar como un dominio de transactivación por asociarse con la maquinaria de la transcripción [Nioi et al., 2005]. Los dominios Neh4 y Neh5 son considerados dominios de transactivación que interactúan con proteínas de unión a CREB (CBP) [Kato et al., 2001]. El dominio central Neh6 contribuye al control negativo de NRF2 independiente del estado redox [McMahon et al., 2004].

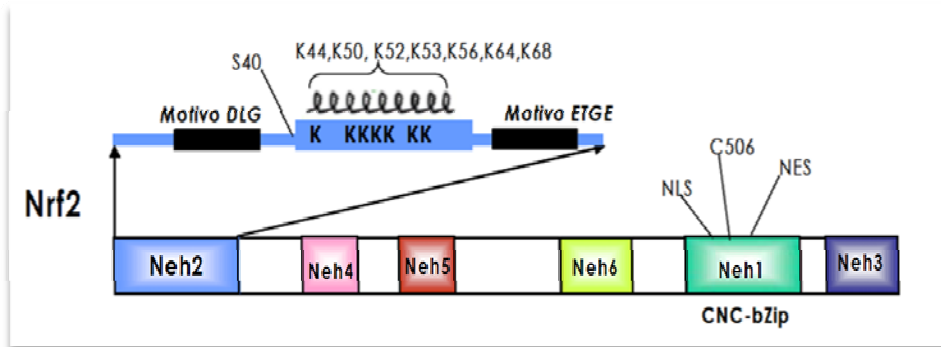


Figura II. Estructura de NRF2. NRF2 está constituido por unos 605 aminoácidos distribuidos en 6 dominios altamente conservados llamados Neh1-6. Cabe destacar los dos motivos estructurales que constituyen el dominio Neh2: el motivo DLG (aminoácidos 27-32) o de baja afinidad, y el motivo ETGE (aminoácidos 77-82) o de alta afinidad. Ambos motivos interactúan con el represor citosólico de NRF2 llamado KEAP1. En el dominio Neh2 y entre los motivos DLG y ETGE se encuentran 7 residuos de lisina (K) imprescindibles para su ubiquitinación y degradación. Adaptado de [Königsberg 2007].

NRF2 incrementa su actividad en respuesta a ROS y a otros agentes electrofílicos que tienen la capacidad de modificar tioles intracelulares como el GSH. Tras la presencia de ROS y otros xenobióticos, los niveles de NRF2 se incrementan rápidamente, translocándose al núcleo de las células afectadas donde activa una batería de genes citoprotectores, conteniendo cada uno al menos un ARE (TGACnnnGCA) en sus promotores al cual se une NRF2 [Rushmore *et al.*, 1991; Nioi *et al.*, 2003].

Los genes diana de NRF2 incluyen a los que codifican para proteínas antioxidantes (GCLc, GCLm, GGT, GSR) [McMahon *et al.*, 2001; Thimmulappa *et al.*, 2002], enzimas citoprotectoras (hemo oxigenasa-1, HO-1) [Hu *et al.*, 2006], enzimas que participan en la regeneración del NADPH [Osburn & Kensler, 2008], enzimas metabolizadoras de fármacos como la NADPH: quinona oxidoreductasa-1 (NQO-1) [McMahon *et al.*, 2001; Kwak *et al.*, 2002], bombas de eflujo de drogas [Cho *et al.*, 2005; Okawa *et al.*, 2006], proteínas de choque térmico [Kwak *et al.*, 2003], enzimas que participan en la degradación de proteínas (subunidades α y β del proteasoma 26S) [Rangasamy *et al.*, 2004; Kwak *et al.*, 2003], factores de crecimiento (TGF α)

[Reddy *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2005] y varios factores de transcripción entre los que se encuentra el propio NRF2 [Kwak *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006].

Quizás el aspecto más importante en el contexto de la respuesta antioxidante mediada por NRF2, es que regula directamente la biosíntesis *de novo* del GSH a través de su capacidad para controlar la expresión de la GCL, tanto de la GCLc como de la GCLm. NRF2 también regula la expresión de otros sistemas antioxidantes importantes, como el sistema de las Trx y las Prx [Kang *et al.*, 2005] y, por lo tanto, tiene la capacidad de restaurar los tioles intracelulares oxidados. Además también controla la expresión de la ferritina que bloquea la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton [Halliwell & Gutteridge, 1986].

NRF2 tiene un papel dual en su implicación en la enfermedad del cáncer. Por un lado, tiene una función protectora reduciendo la incidencia de la formación de tumores, debido a que NRF2 es capaz de mediar la expresión de enzimas que inactivan electrófilos genotóxicos. Por ello, muchos de los compuestos que activan a este factor de transcripción también son capaces de inhibir la carcinogénesis química [Hayes *et al.*, 2000; Nioi & Hayes, 2004]. Estos compuestos se denominan agentes quimioprotectores del cáncer e incluyen butilhidroxianisol, cumarina, circumina, sulfuro de dialilo, etoxiquina e isotiocianatos [Ramos-Gómez *et al.*, 2001; Iida *et al.*, 2004]. Por otro lado, NRF2 tiene una función oncogénica ya que su prolongada activación o acumulación aberrante protege a las células cancerígenas frente a agentes quimio y radioterapéuticos, favoreciendo la progresión del cáncer [Singh *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010]. Esta elevada expresión de NRF2 en muchos tipos de tumores es un indicador de un pronóstico más pobre de la enfermedad [Shibata *et al.* 2008; Sasaki *et al.* 2012].

3.2. REGULACIÓN DE NRF2 POR EL COMPLEJO KEAP1-CUL3

La detección de moléculas oxidantes proporciona el estímulo para la translocación de NRF2 desde el citosol al núcleo y para la unión de NRF2 a ARE. La reubicación de NRF2 desde el citosol al núcleo es un evento que está reprimido. La proteína responsable de detectar las ROS y de la represión de la actividad de NRF2 en condiciones basales se llama KEAP1.

KEAP1 tiene una función dual en la regulación de la respuesta antioxidante mediada por NRF2. Por un lado, actúa como sensor a estrés oxidativo y, por otro lado, funciona como un adaptador de sustratos permitiendo la interacción de NRF2 a la E3 ubiquitina ligasa llamada culina 3 (CUL3) y que participa en la poliubiquitinación de NRF2 para su posterior degradación en el proteasoma [Cullinan *et al.*, 2004; Furukawa *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2004]. KEAP1 es una metaloproteína de 624 aminoácidos comprendidos en 5 dominios estructurales (ver **Figura III**), de los cuales dos se consideran canónicos. El primero de ellos es el dominio BTB / POZ (*Broad-complex, Tramtrack, Bric-à-brac / poxovirus zinc finger*) que es imprescindible para la homodimerización de KEAP1 y unión a CUL3, y comprende los aminoácidos 61-179. El segundo dominio conservado se conoce como Kelch o DGR (dominio de repeticiones de doble glicina), se encuentra repetido 6 veces y comprende los aminoácidos 315-598. La repetición de motivos es la que da lugar a la estructura en hélice- β y es a través de este dominio que se une al dominio Neh2 de NRF2 secuestrándolo en el citoplasma [Itoh *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004; Velichkova *et al.*, 2002]. Los otros tres dominios de KEAP1 son: la región N-terminal (NTR) que comprende los aminoácidos 1-60, la región de intervención (IVR) que contiene los aminoácidos 180-314 y es muy rica en residuos de cisteína que son capaces de reaccionar con las ROS [Snyder *et al.*, 1981], y la región C-terminal (CTR) que abarca los aminoácidos 599-624 y que también participa en la unión de KEAP1 a NRF2 [Dinkova-Kostova *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2006].

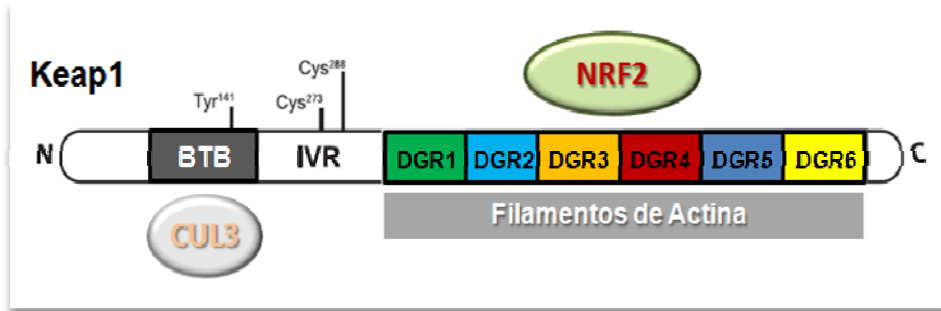
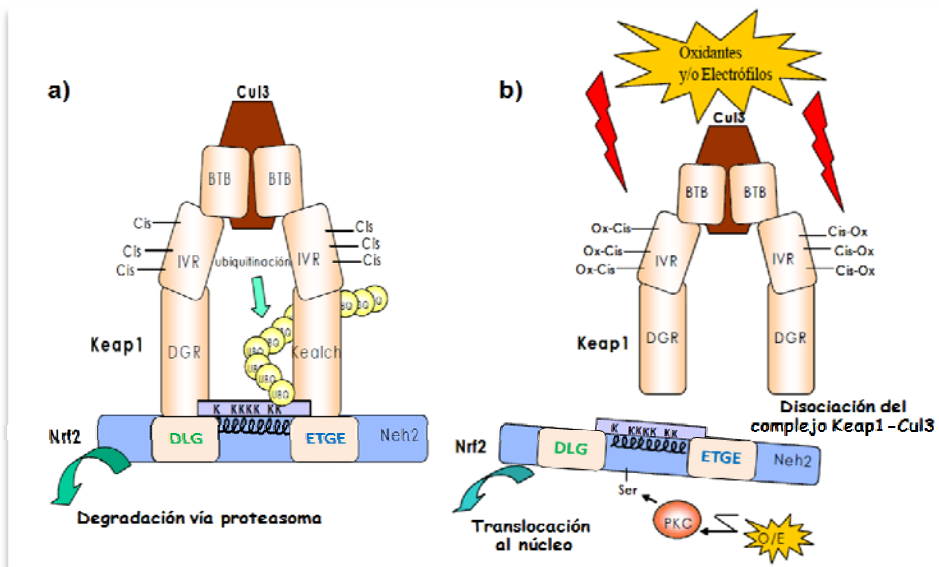


Figura III. Estructura de KEAP1. Se observan los 5 dominios estructurales de KEAP1. Cabe destacar el dominio BTB, que participa en la homodimerización de KEAP1 y en la unión a CUL3, la región IVR, con sus múltiples residuos de cisteína capaces de oxidarse y registrar el estado oxidativo de la célula y el dominio Kelch o DGR, repetido 6 veces y que participa en la unión al dominio Neh2 de NRF2 y a componentes del citoesqueleto para anclar a NRF2 constitutivamente al citoplasma para su posterior degradación. Adaptado de [Clark & Simon, 2009].

KEAP1 se encuentra como homodímero y de esta manera se une a NRF2, a través de su dominio DGR, mediante dos sitios de reconocimiento con diferente afinidad en el dominio Neh2 de NRF2 (los motivos DLG, baja afinidad, y ETGE, alta afinidad, conocidos como enlace tipo pestillo y bisagra, respectivamente). El reconocimiento por los dos sitios es secuencial y tiene una gran importancia fisiológica ya que favorece la aproximación de los residuos de Lys al complejo CUL3-Rbx (*RING-box protein*) y su adecuada orientación para facilitar la ubiquitinación [McMahon *et al.*, 2006; Tong, 2007].

En condiciones basales, KEAP1 funciona como parte del complejo E3 ubiquitina ligasa CUL3-BTB^{KEAP1} secuestrando a NRF2 en el citoplasma para promover la ubiquitinación de los residuos de Lys en el dominio Neh2 de NRF2 (ver **Esquema IIIa**) para su posterior degradación en el proteasoma. Por tanto, reprime la actividad transcripcional de NRF2 acelerando su *turnover* por el sistema ubiquitina-proteasoma [Itoh *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2006]. Bajo condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo, los residuos de Cys reactivas de la región IVR de KEAP1 son diferencialmente oxidados y modificados [Dinkova-Kostova *et al.*, 2002], resultando en un cambio conformacional en el complejo KEAP1-CUL3 que evita la interacción de NRF2 con CUL3 y bloquea la ubiquitinación de NRF2 [Kobayashi *et al.*,

2004; Tong *et al.*, 2006]. Este cambio conformacional junto con modificaciones post-traduccionales producidas tanto en KEAP1 (fosforilación Tyr141) [Jain *et al.*, 2008] como en NRF2 (fosforilación Ser40 por la proteína kinasa C delta) [Niture *et al.*, 2009; Bloom *et al.*, 2003], culminan con la disociación de NRF2 del complejo KEAP1-CUL3 y con su posterior translocación nuclear para activar la respuesta antioxidante tras su unión a ARE (ver **Esquema IIIb**). NRF2 también se fosforila por la vía de las MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), por la vía del fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) / AKT [Huang *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002] y por PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) que media su importe nuclear [Cullinan *et al.*, 2003]. Todas estas modificaciones regulan la estabilidad y la localización subcelular de NRF2. Por otro lado, la activación transcripcional de NRF2 también se regula por fosforilación de los dominios Neh4 y Neh5 por la caseína kinasa 2 (CK2) [Apopa *et al.*, 2008].



Esquema III. Modelo de activación de NRF2 en respuesta a estrés oxidativo. a) En condiciones basales, la homodimerización de KEAP1 facilita la interacción de NRF2 a CUL3, la cual permite la ubiquitinación de los residuos de Lys (K) de NRF2 y su posterior degradación por el proteasoma. b) En presencia de ROS y agentes xenobióticos se produce la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las Cys en la región IVR de KEAP1 (Cys151, Cys273, and Cys288), promoviendo un cambio conformacional que conlleva a que NRF2 se disocie del complejo KEAP1-CUL3. Las ROS también inducen la fosforilación del residuo de Ser40 de NRF2. Todos estos eventos culminan con la translocación de NRF2 al núcleo para activar la expresión de una amplia batería de genes antioxidantes. Adaptado de [Kobayashi *et al.*, 2006].

KEAP1 también puede intercambiarse entre los compartimentos citosólico y nuclear [Sun *et al.*, 2007; Velichkova & Hasson, 2005]. Aunque la mayor parte de la proteína se encuentre en el citosol, un 10-15% de la proteína se localiza en el núcleo [Niture & Jaiswal, 2009]. KEAP1 contiene una secuencia de exportación nuclear (NES) en el dominio IVR (³⁰¹LVQIFQELTL³¹⁰) [Karapetian *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007]. En condiciones basales la proteína nuclear protimosina α , media la importación nuclear del complejo KEAP1-CUL3-Rbx [Niture & Jaiswal, 2009]. Este complejo dentro del núcleo intercambia la protimosina α por NRF2, provocando su ubiquitinación y posterior degradación, e impidiendo su unión a ARE. Este mecanismo se lleva a cabo, presumiblemente, para regular el *pool* nuclear de NRF2 y desactivar rápidamente la expresión de genes antioxidantes una vez alcanzada la homeostasis redox. Por otro lado, frente a situaciones de estrés, la protimosina α se une al dominio Kelch de KEAP1, liberando NRF2 para que promueva la respuesta antioxidante [Karapetian *et al.*, 2005].

La abundancia nuclear de NRF2 está fuertemente restringida gracias también al transporte que existe de NRF2 entre el citoplasma y el núcleo, que es dependiente del estado redox celular. Este proceso se controla gracias a la presencia de una sola secuencia de localización nuclear (NLS) y dos motivos de exportación nuclear (NES) en la secuencia de este factor de transcripción. Específicamente, NRF2 contiene una NLS en la región básica dentro del dominio Neh1 junto con una NES en el dominio Neh5 y otra en el motivo bZIP dentro del dominio Neh1. La NES, contenida en Neh5 (¹⁷⁵LLSIPELQCLNI¹⁸⁶), contiene una Cys incorporada que al oxidarse en presencia de radicales libres se previene el reconocimiento de este motivo por la exportina-1, lo que conduce a su acumulación nuclear de NRF2 [Lee *et al.*, 2006]. La NES en el dominio bZIP (⁵⁴⁵LKRRLSTLYL⁵⁵⁴), permanece cerca de la Tyr568, que se fosforila constitutivamente por Fyn, que es una tirosina kinasa. Si este residuo no se fosforila en condiciones de estrés, no se produce la exportación nuclear de NRF2 mediada por exportina-1.

Otros mediadores que regulan a NRF2 es BACH1 (*BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*) que actúa como represor de la transcripción [Igarashi *et al.*, 1998]. En ausencia de estrés celular BACH1

heterodimeriza con las proteínas MAFs que se unen a ARE, reprimiendo la expresión de genes antioxidantes. En presencia de estrés, BACH1 se libera de ARE y es reemplazada por NRF2. BACH1 compite con NRF2 por la unión a ARE [Dhakshinamoorthy *et al.*, 2005]. El transporte de NRF2 al núcleo, desde el momento de la exposición a radicales libres hasta su estabilización, tarda aproximadamente 2 horas [Jain *et al.*, 2005]. Este evento va seguido por la activación de un mecanismo retardado involucrando a la enzima glucógeno sintasa kinasa 3 β (GSK3 β) que controla el apagado de la expresión de genes diana de NRF2. GSK3 β es una serina / treonina kinasa multifuncional que juega un papel importante en diferentes vías de señalización [Kannoji *et al.*, 2008]. GSK3 β fosforila a Fyn, permitiendo su translocación nuclear [Jain *et al.*, 2007]. Fyn fosforila a NRF2 en la tirosina 568 (Tyr568), provocando su exportación nuclear, que acaba interactuando con KEAP1 para su posterior degradación en el proteasoma [Jain *et al.*, 2006]. Por otro lado, GSK3 β es capaz también de fosforilar directamente a NRF2 (Ser344, Ser347) en la secuencia DSGISL del dominio Neh6, favoreciendo su interacción con el adaptador de sustratos β -TrCP para su posterior ubiquitinación y degradación en el proteasoma [Rada *et al.*, 2012]. La regulación negativa de NRF2 por BACH1 y GSK3 β / Fyn son importantes en la represión de los genes diana de NRF2 que son inducidos en respuesta a estrés oxidativo.

Dentro de la vía de señalización de NRF2 existe también un bucle autorregulador [Lee *et al.*, 2007] ya que existe un ARE en la región promotora de KEAP1 donde se une NRF2. Por tanto, NRF2 regula la transcripción de su represor KEAP1, y KEAP1 regula a NRF2 actuando como adaptador para su degradación. El estricto control de NRF2 es vital para la protección de las células contra el daño de los radicales libres y la prevención de la apoptosis [Jaiswal *et al.*, 2004; Copple *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2006]. La disfunción de NRF2 puede contribuir a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, vinculada a mutaciones en DJ-1 (PARK7), que estabiliza NRF2 evitando su interacción con el complejo CUL3-BTB^{KEAP1} [Clements *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 2010]. Existen evidencias de que la dopamina (DA) puede activar el programa antioxidante mediado por NRF2, especialmente las células no neuronales del sistema nervioso como los astrocitos [Kraft *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2007]. Otra prueba que confirma que

los niveles de actividad de NRF2 están implicados en la enfermedad del Parkinson y que su regulación positiva puede ser una eficaz estrategia de tratamiento [Thomas & Beal, 2007], es que los nuevos medicamentos recetados para tratar los síntomas de esta enfermedad pueden afectar a la actividad de NRF2, como es el caso de la apomorfina (agonista de receptores D₁/D₂ de dopamina) [Gassen *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 2006].

3.2.1. Estructura, función y regulación de las culinas

Como ya se ha mencionado anteriormente, NRF2 está regulado por el complejo formado por KEAP1 y la E3 - ubiquitina ligasa CUL3 que está acoplado al sistema ubiquitina-proteasoma (UPS: *ubiquitin proteasome system*) para mantener bajos niveles basales de NRF2. CUL3 permite el andamiaje de proteínas, uniéndose, por un lado, a Rbx y, por otro, al dominio BTB de KEAP1 que actúa como proteína adaptadora de sustratos, permitiendo la interacción de NRF2 al complejo (ver **Figura IV**). Bajo condiciones de estrés, la capacidad de la E3 - ligasa para ubiquitinar a NRF2 queda inhibida, lo que permite a NRF2 translocarse al núcleo y activar la respuesta antioxidante [Motohashi & Yamamoto, 2004; Kobayashi & Yamamoto, 2006; Zhang, 2006].

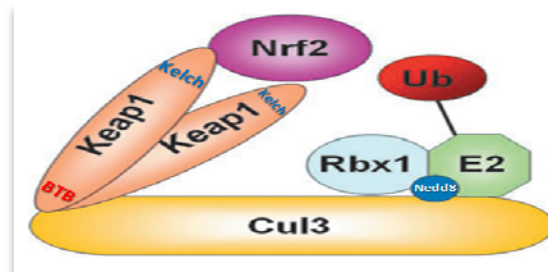
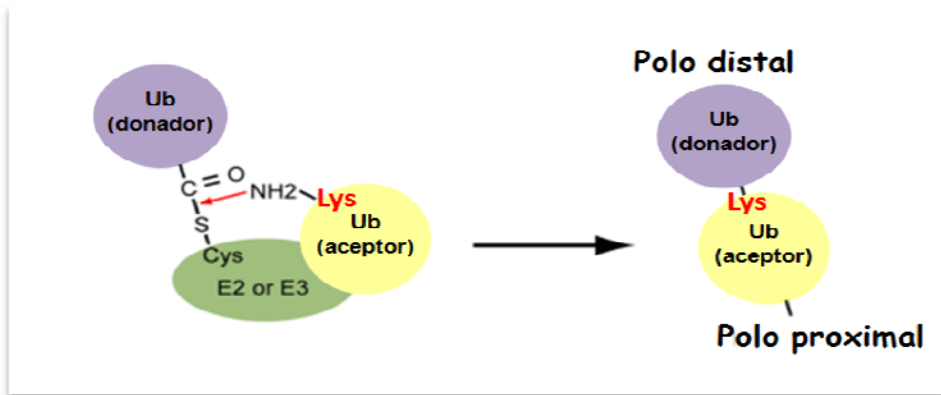


Figura IV. Estructura del complejo KEAP1-CUL3-Rbx E3-ubiquitina ligasa. CUL3 forma un complejo multiproteico uniéndose a la enzima E2 conjugada con la ubiquitina (Ub), a Rbx y a KEAP1. Tras la conjugación de Nedd8 (círculo azul), que facilita la transferencia de Ub de la E2 al sustrato, un homodímero de KEAP1 actúa como un adaptador de sustratos, reclutando NRF2 al complejo para su ubiquitinación. Adaptado de [Villeneuve *et al.*, 2010].

Hay dos tipos principales de E3 ubiquitina ligasas, aquellas que contienen un dominio HECT (Homologous to E6-AP C-Terminus) y las que incluyen un dominio RING (Really Interesting New Gene). CUL3 se engloba en el segundo grupo (CRLs: *Cullin-ring ligases*), compuesto por diferentes culinas y proteínas adaptadoras de sustrato. Su función principal es regular la estabilidad de sus sustratos de manera dependiente del proteasoma 26S.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, CUL3 regula la estabilidad de su sustrato NRF2 mediante ubiquitinación. La ubiquitina es una proteína pequeña (76 aminoácidos) que está altamente conservada entre las diferentes especies. Ésta es capaz de modificar proteínas covalentemente a través de un enlace isopeptídico entre la glicina C-terminal de la Ub y un residuo de Lys en el sustrato (ver **Esquema IV**). A través de una serie de reacciones de tioesterificación, la Ub se activa, en presencia de ATP, y finalmente es transferida por la E3 ligasa al residuo de Lys en la proteína sustrato. La adición de una molécula de Ub al sustrato se llama mono-ubiquitinación. Cadenas de poli-ubiquitina (poli-Ub) también se pueden incorporar repitiendo este proceso en el que participan tres enzimas (E1, E2 y E3) de manera secuencial [Hochstrasser, 1996]. La Ub contiene 7 residuos de Lys, incluyendo Lys48 y Lys63, capaces de aceptar más moléculas de Ub para formar cadena de poli-Ub.

Aquellas proteínas conjugadas con una cadena de poli-Ub vinculada a Lys48 son mayoritariamente dirigidas al proteasoma 26S para su degradación. Sin embargo, aquellas conjugadas con una cadena poli-Ub vinculada a Lys63, regulan la transducción de señales y la reparación del DNA [Li & Ye, 2008].



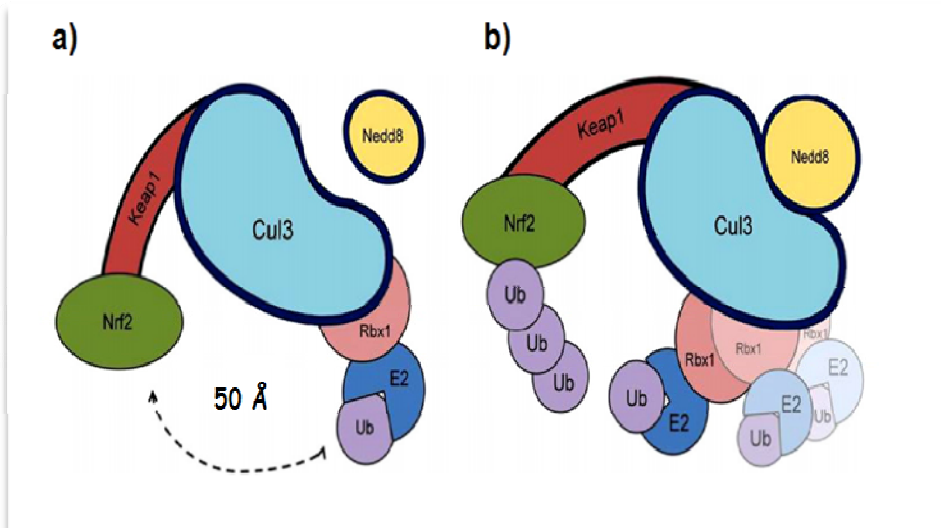
Esquema IV. Modificación covalente de proteínas mediante ubiquitinación. Se observa la interacción que se produce entre el residuo de glicina C-terminal de la ubiquitina (Ub) y un residuo de lisina (Lys) del sustrato (aceptor de Ub). Este residuo de Lys es imprescindible que se encuentre en estrecha proximidad a la Ub y en adecuada orientación. Para ello, juega un papel decisivo el complejo E3-ubiquitina ligasa actuando de andamiaje multiproteico. La flecha roja indica el ataque del grupo N-terminal de la cadena lateral de la Lys del aceptor, por el enlace tioéster establecido entre la Ub y el complejo E3. Finalmente, se produce la ubiquitinación del sustrato a través de un enlace isopeptídico. Adaptado de [Li & Ye, 2008].

La capacidad de las CRLs para modificar covalentemente proteínas y, por lo tanto, alterar su abundancia y función, les hace considerarse complejos intracelulares muy importantes. Estos complejos son capaces de controlar diversos procesos celulares tales como la transcripción, la señalización celular y la progresión del ciclo celular. Además, regulan procesos biológicos que incluyen la inmunidad, el desarrollo, la detección de glucosa y los ritmos circadianos [Petroski & Deshaies, 2005].

A pesar de la variación entre las CRLs, todas ellas están reguladas por mecanismos similares. La neddilación es el proceso por el que Nedd8 (*neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8*), una pequeña proteína semejante a la Ub, se conjuga con un conservado residuo de Lys de las proteínas. Nedd8 y Ub tienen una elevada similitud de secuencia (57% idéntica y 76% similar) y son muy similares estructuralmente. Nedd8 se conjuga al extremo C-terminal de las culinas (humano: Lys720-Cul1, Lys689-Cul2, Lys712-CUL3, Lys605-Cul4A, Lys859-Cul4B) [Wada *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000; Lo & Hannink, 2006].

La neddilación ocurre en un proceso similar al de ubiquitinación, implicando a una enzima E1 heterodimérica (ULA1 / UBA3), una enzima E2 (UBC12) y una E3 ligasa (DCN1 o SCCRO) [Merlet *et al.*, 2009]. Este mecanismo activa la función de las CRLs, incrementando la actividad ligasa de la CUL3-E3-ubiquitina ligasa y conduciendo a una mayor ubiquitinación de NRF2 [Ohh *et al.*, 2002; Lo & Hannink, 2006].

El papel que tiene la neddilación en el UPS es complejo ya que promueve un cambio conformacional en la culina que facilita el reclutamiento de la enzima E2 activada y libera la auto-inhibición ejercida por el extremo C-terminal de la culina. Esta alteración estructural permite a Rbx moverse libremente, con lo que la enzima E2 activada con la Ub queda más próxima al residuo de Lys del sustrato (ver **Esquema V**). Por tanto, Nedd8 no solo estimula la transferencia de la Ub desde la E2 al sustrato sino que también facilita la elongación de la cadena de poli-Ub [Merlet *et al.*, 2009].



Esquema V. Cambio conformacional en CUL3 por neddilación. a) En ausencia de neddilación el extremo C-terminal de CUL3 ejerce un efecto inhibitorio sobre la ubiquitinación de NRF2 ya que la distancia entre la E2 activada con la Ub y el sustrato NRF2 es muy grande (50 Å). b) La neddilación de CUL3 induce un cambio conformacional en el complejo E3-ligasa que aproxima la Ub a los residuos de Lys del dominio Neh2 de NRF2, gracias al movimiento libre de Rbx. Adaptado de [Andérica-Romero *et al.*, 2013].

El proceso de neddilación es reversible. La deneddilación es llevada a cabo por un complejo multiproteico similar al proteasoma llamado COP9-signalosoma (CSN). El CSN es un complejo muy conservado evolutivamente de 8 subunidades (CSN1-8) responsable de la eliminación de Nedd8 de las culinas. Las subunidades CSN5 y CSN6 contienen un dominio MPN (*MPR-PAD1-Nterm*) y el resto de subunidades contienen un dominio PCI (*Proteasome; COP9-signalosome; elongation initiation factor 3, eIF-3*). Cada una de estas subunidades tiene su análoga en el proteasoma [Kapelari *et al.*, 2000]. CSN5 es considerada la subunidad catalítica del complejo debido a su actividad metaloproteasa de su motivo JAMM (*Jab1/MPN domain metalloenzyme*) [Dubiel, 2009].

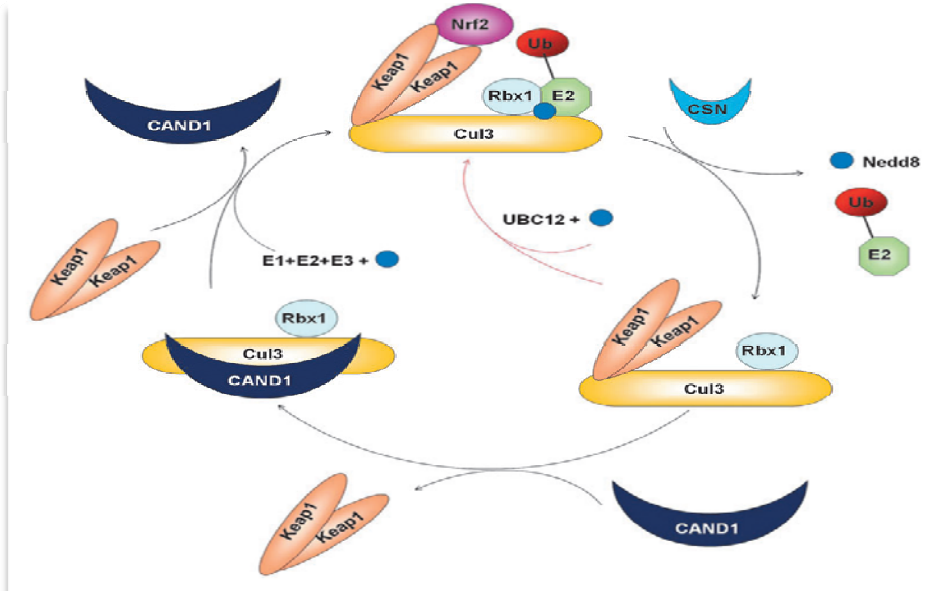
El CSN es reclutado en el complejo E3-ligasa e interactúa directamente con la culina y con Rbx provocando la deneddilación [Lyapina *et al.*, 2001; Pintard *et al.*, 2003]. CSN no solo es necesario para la deneddilación de culinas sino que también es importante en la estabilización de Rbx, que juega un papel crucial en la actividad de las CRLs [Peth *et al.*, 2007].

Tanto la neddilación como la deneddilación son requeridas para la actividad de CRL *in vivo* [Cope & Deshaies, 2003]. La función de la neddilación es reclutar la enzima E2 conjugada con la Ub a la culina y promover la ubiquitinación del sustrato y la elongación de la cadena de poli-Ub. Sin embargo, la deneddilación promueve la liberación de la E2 vacía (sin Ub), seguido de otra ronda de neddilación. El ciclo de neddilación / deneddilación puede ser obstaculizado por dos mecanismos: i) alteración de la neddilación y reclutamiento de la E2-Ub o ii) inhibición de la deneddilación por mutación del CSN, bloqueando la E2-vacía en el complejo E3-ligasa. Ambos mecanismos inhiben la actividad del complejo E3-ligasa y eluden la ubiquitinación del sustrato [Pintard *et al.*, 2003].

Por otro lado, este ciclo de neddilación / deneddilación es esencial para estabilizar los niveles de culina, previniendo la auto-ubiquitinación de los adaptadores de sustrato y mantener la funcionalidad del complejo E3-ligasa, gracias a la asociación del complejo CSN con una deubiquitinasa Ubp12/USP15 [Zhou *et al.*, 2003].

Las CRLs no solo se regulan por ciclos de neddilación / deneddilación sino también por ciclos de ensamblaje / desensamblaje que es dependiente del estado de neddilación de la culina. El ciclo de neddilación / deneddilación incrementa la actividad del complejo E3-ligasa, como ya se ha mencionado. Por el contrario, la actividad de la E3-ligasa es inhibida por un proceso de dos etapas que implica el desensamblaje del complejo. El primer paso consiste en la extracción de Nedd8 de la culina y el segundo paso implica la asociación de la proteína CAND1 (*cullin-associated and neddylation-dissociated 1*) al complejo E3-ligasa deneddilado. CAND1 se une preferiblemente a los complejos culina / Rbx deneddilados, impidiendo su ensamblaje en nuevos complejos E3-ligasa. CAND1 se une directamente a ambos extremos de la Culina (ver **Esquema VI**), bloqueando la unión de las proteínas adaptadoras de sustratos (extremo N-terminal) y la incorporación de Nedd8 a los residuos de Lys (extremo C-terminal) [Zheng *et al.*, 2002].

Este mecanismo de regulación de las CRLs mediado por CAND1 es manifiesto en el caso de CUL3-KEAP1-NRF2 [Lo & Hannink, 2006]. CAND1 no se une a todas las culinas y no se une a la misma culina en todos los tipos celulares, lo que indica que el papel de CAND1 podría solo ser esencial bajo determinadas condiciones fisiológicas y sería dependiente del tipo celular [Merlet *et al.*, 2009].



Esquema VI: Mecanismos de regulación del complejo CUL3-Rbx-KEAP1 E3-ligasa. Este complejo es activo cuando se encuentra en estado neddulado, que facilita el acoplamiento de un homodímero de KEAP1 a NRF2 en el complejo, resultando en la ubiquitinación y degradación de NRF2. El complejo es inactivado en situaciones de estrés oxidativo por deneddilación. El complejo CSN retira Nedd8 de CUL3 realzando la interacción de CUL3 y CAND1, que desencadena la disociación de KEAP1-NRF2 del complejo CUL3-E3-ligasa. Finalmente, se reactiva el complejo E3-ligasa mediante otra ronda de neddilación. Tras la deneddilación el complejo E3-ligasa, puede ser de nuevo reactivado sin necesidad de ser desensamblado, gracias a la enzima E2-UBC12 que conjuga de nuevo Nedd8 a CUL3 sin la disociación de KEAP1-NRF2 (flecha roja). Adaptado de [Villeneuve et al., 2010].

4. NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

4.1. METABOLISMO DEL GLUTAMATO

El glutamato es el mayor neurotransmisor en el cerebro de mamíferos y está implicado en el procesamiento de la información y en la plasticidad sináptica. Comparado con otros neurotransmisores, los niveles de glutamato son extremadamente altos en el SNC de mamíferos, siendo aproximadamente de 5-10 mmol/kg [Butcher & Hamberger, 1987]. Estos niveles son ~1000 veces más elevados que los de muchos otros importantes neurotransmisores, tales

como la dopamina, norepinefrina y serotonina. Su concentración en la hendidura sináptica en condiciones de reposo permanece baja ($\sim 0.6 \mu\text{M}$). Sin embargo, durante la transmisión sináptica, el glutamato es liberado desde la neurona pre-sináptica en un corto periodo de tiempo (1-2 ms), alcanzando concentraciones de $100 \mu\text{M}$. Estos niveles son restablecidos a los niveles basales gracias a los transportadores de glutamato de alta afinidad localizados tanto en las neuronas pre-sinápticas y post-sinápticas, como en las células gliales adyacentes, y que protegen al SNC de la neurotoxicidad inducida por glutamato [Kanai & Hediger, 1992].

No hay evidencia de un metabolismo extracelular del glutamato. Como se acaba de mencionar, este aminoácido excitador es retirado del espacio extracelular por una familia de transportadores Na^+ - dependientes y de alta afinidad. Éstos se denominan GLAST (EAAT1), GLT I (EAAT2), EAAC (EAAT3), EAAT4 y EAAT5 [Kanai & Hediger, 1992; Kanai *et al.*, 2013]. EAAC y EAAT5 se encuentran exclusivamente en neuronas, mientras que GLAST y GLT1, los mayores contribuidores en el consumo de glutamato, son específicos de la glía, colocando a los astrocitos como responsables de la mayor parte de la captación de glutamato y de su metabolismo en el cerebro [Rothstein *et al.*, 1996]. Este glutamato captado por los astrocitos es utilizado para la síntesis *de novo* de GSH (ver **Sección 2.2**).

4.2. RECEPTORES DE GLUTAMATO

Los efectos del glutamato se ejercen a través de tres tipos mayoritarios de receptores ionotrópicos (AMPA, KAINATO y NMDA) y varias clases de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G [Dong *et al.*, 2009].

4.2.1. Receptores metabotrópicos de glutamato

Los receptores metabotrópicos de glutamato son receptores acoplados a proteínas G. Están clasificados en 8 subtipos (mGLU1 a mGLU8) que están divididos, a su vez, en tres grupos en función de la proteína G acoplada, de la estructura molecular, de la homología en la secuencia aminoacídica o del perfil farmacológico.

El grupo I incluye mGlu1 y mGlu5; éstos están acoplados a fosfolipasa C [Tanabe *et al.*, 1992; Joly *et al.*, 1995]. La activación de estos receptores genera inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ libera Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático y junto con el DAG activa la proteína PKC, respectivamente. Por lo general, los receptores mGlu1 y mGlu5 incrementan la excitabilidad neuronal y por ello han sido estudiados como dianas terapéuticas para prevenir la neurodegeneración mediada por concentraciones excitotóxicas de glutamato. El compuesto (+)-2-metil-4-carboxifenilglicina (LY367385), un potente y selectivo antagonista de receptores mGlu1, es considerado neuroprotector en modelos de excitotoxicidad [Bruno *et al.*, 1999]. Otro compuesto, el 2-metil-6-(feniletinil)-piridina (MPEP), inhibidor de receptores mGlu5, también previene la neurodegeneración en un modelo en rata de la enfermedad de Parkinson inducido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), facilitando la activación de receptores ionotrópicos de NMDA [Hsieh *et al.*, 2012]

El grupo II y grupo III están preferiblemente localizados en la región terminal de los axones y están negativamente acoplados a la adenilato ciclasa. El grupo II incluye mGlu2 y mGlu3 [Emile *et al.*, 1996]. Su activación atenúa la liberación de glutamato [Mateo & Porter, 2007; Grueter & Winder, 2005]. El grupo III incluye mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8 y también funcionan conteniendo la liberación de glutamato o GABA desde los terminales axónicos, evitando la sobre-activación de receptores post-sinápticos de NMDA [Vera & Tapia, 2012]. Actualmente se sabe que el glutamato endógeno activa estos receptores y protege frente a la excitotoxicidad [Vera & Tapia, 2012]. Además se ha demostrado que un agonista de los receptores mGlu8, el (S)-3,4-DCPG,

es capaz de revertir los déficits motores en modelos prolongados de Parkinson [Johnson *et al.*, 2013].

4.2.2. Receptores ionotrópicos de glutamato

Los receptores ionotrópicos activados por glutamato son los receptores de ácido *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), los receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de kainato.

4.2.2.1. Receptores AMPA y de kainato

Los receptores AMPA (AMPA) y los receptores de kainato son canales tetraméricos catiónicos permeables al Na^+ y al Ca^{2+} . Los AMPARs están compuestos por 4 subunidades (GluA1-A4) que median una rápida transmisión sináptica excitadora en el SNC de los mamíferos [Heine *et al.*, 2008]. Los receptores de kainato están compuestos por 5 subunidades diferentes (GLUK1, GLUK2, GLUK5, GLUK6 y GLUK7), localizadas pre-sinápticamente, donde modulan la liberación de glutamato [Chittajallu *et al.*, 1996] o post-sinápticamente, donde pueden regular la neurotransmisión excitadora [Vignes & Collingridge, 1997].

4.2.2.2. Receptores NMDA

Los receptores NMDA (NMDARs) son canales catiónicos permeables al Na^+ , K^+ y al Ca^{2+} , que median muchas funciones neuronales incluyendo la plasticidad, la consolidación sináptica durante la diferenciación neuronal, la potenciación a largo plazo (LTP: *long term potentiation*), la regeneración y la supervivencia [McDonald & Johnston, 1990; Castellano *et al.*, 2001; Cheng & Ip, 2003]. Los NMDARs necesitan dos diferentes agonistas unidos simultáneamente para abrir el poro del canal: glutamato y glicina [Paoletti & Neyton, 2007]. El poro del canal de los NMDARs es bloqueado por Mg^{2+} de manera voltaje-dependiente.

Los NMDARs funcionan como un heterotetrámero que contienen dos subunidades NR1 (también denominadas GluN1), que son esenciales para la funcionalidad del receptor y contienen el sitio de unión a la glicina, y dos subunidades NR2 (NR2A, NR2B, NR2C ó NR2D), también denominadas GluN2A-D, que contienen el sitio de unión al glutamato, (ver **Figura V**) [Forrest et al. 1994; Hollmann & Heinemann, 1994]. Además, se encuentran las subunidades NR3A [Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995] y NR3B [Nishi *et al.*, 2001; Chatterton *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2002], también llamadas GluN3A-B, recientemente identificadas, que pueden sustituir a las subunidades NR2 en los receptores, disminuyendo la conductancia del canal y la permeabilidad al Ca^{2+} [Pérez-Otano *et al.*, 2001; Matsuda *et al.*, 2003].

En las sinapsis, NMDAR se une a complejos multiproteicos en el extremo C-terminal de las subunidades NR1 y NR2 [Collins *et al.*, 2006]. Este complejo facilita la localización del receptor en áreas específicas, tales como la membrana post-sináptica, permitiendo la interacción con una amplia variedad de moléculas citosólicas de transducción de señales [Waxman & Lynch, 2005]. El extremo C-terminal de la subunidad NR2 se une a las proteínas MAGUKs (*membrane associated guanylate ciclases*), tales como PSD-95, SAP-102 y PSD-93.

Estas proteínas actúan de andamiaje (*scaffold*) multiproteico permitiendo que otras proteínas, como es el caso de la nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*), se localicen más cerca de los receptores, de tal manera que puedan ser activadas más eficientemente por Ca^{2+} [Aarts *et al.*, 2002].

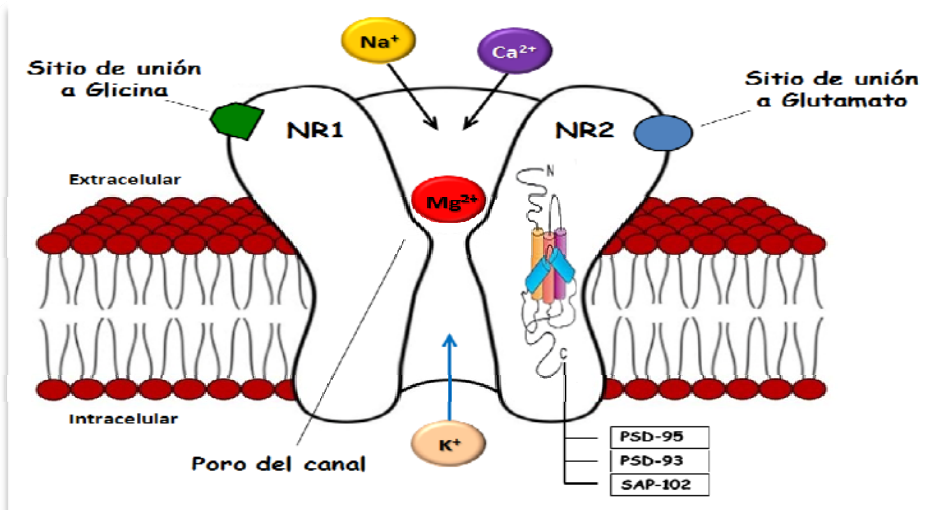


Figura V. Representación esquemática de la estructura de NMDAR. Se observan los dos tipos de subunidades, NR1 y NR2, así como las proteínas MAGUKs (PSD-95, PSD-93 y SAP-102), que se unen al dominio intracelular de la subunidad NR2 para anclar al receptor en áreas específicas. Estos receptores presentan un sitio específico de unión a glicina en la subunidad NR1 y un sitio específico de unión a glutamato en la subunidad NR2. El poro del canal es bloqueado por Mg²⁺.

Hay un gran número de evidencias que respaldan la hipótesis de que los NMDARs sinápticos activan vías neuroprotectoras, mientras que los extrasinápticos son responsables de la excitotoxicidad [Hardingham et al., 2002; Hardingham & Bading, 2010; Kaufman et al., 2012; Puddifoot et al., 2012]. La activación de NMDARs sinápticos induce la actividad de CREB (*cAMP response element binding protein*) y BDNF (*brain derived neurotrphic factor*), desencadenando señales anti-apoptóticas, mientras que la activación de los extrasinápticos tiene efectos contrapuestos [Hardingham et al., 2002]. Sin embargo, recientes publicaciones han cuestionado este hecho demostrando que la activación prolongada de NMDARs sinápticos también puede originar muerte celular excitotóxica [Wroge et al., 2012].

Independientemente de su localización, hay muchas evidencias de que existe una función diferencial de los NMDARs dependiendo de la composición de sus subunidades, ya que tienen diferentes efectos sobre la acumulación del calcio citosólico, la morfología mitocondrial y la señalización mediada por

MAPK, y donde la subunidad NR2B podría activar preferencialmente señales de muerte neuronal [Paul & Connor, 2010; Choo et al., 2012].

4.2.2.3. Receptores NMDA en astrocitos

Los NMDARs están involucrados en muchos procesos cognitivos como el aprendizaje, comportamiento y la plasticidad sináptica. Durante mucho tiempo se ha creído que los astrocitos no respondían a NMDA [Backus *et al.*, 1989; McNaughton & Hunt, 1992] y que estos receptores eran exclusivos de neuronas. Sin embargo, las investigaciones de estas dos últimas décadas han demostrado un papel activo de estos receptores en las células gliales.

Se sabe que los astrocitos envuelven las hendiduras sinápticas y son capaces de modular la plasticidad sináptica [Verkhratsky *et al.*, 2007]. Estas células gliales utilizan los AMPARs y NMDARs como sensores en este proceso, ya que difieren en su sensibilidad a glutamato y en su tasa de de-sensibilización, proporcionándoles información acerca de la duración y de la concentración de glutamato en la hendidura sináptica.

Estudios recientes han confirmado mediante PCR e inmunorreactividad que los astrocitos presentan, en condiciones fisiológicas, todas las conocidas subunidades constitutivas de los NMDARs: NR1 [Aoki *et al.*, 1994; Schipke *et al.*, 2001], NR2A [Conti *et al.*, 1996], NR2B [Luque *et al.*, 1995; Conti *et al.*, 1996], NR2C [Akazawa *et al.*, 1994; Schipke *et al.*, 2001], NR2D [Palygin *et al.*, 2010], NR3A [Cahoy *et al.*, 2008] y NR3B [Palygin *et al.*, 2010]. Los astrocitos presentan una composición diferencial de los NMDARs que está asociada con el área cerebral que ocupan [Gottlieb & Matute, 1997] como se indica en la **Figura VI**. El co-ensamblaje de estas subunidades dentro de los NMDARs gliales altera marcadamente sus propiedades. Gracias a los estudios funcionales, se ha podido demostrar que los NMDARs de astrocitos presentan algunas características que los diferencian de los de neuronas, como por ejemplo, el poro del canal, que no es bloqueado por Mg^{2+} , presentan una menor permeabilidad al Ca^{2+} [Palygin *et al.*, 2011] y que la remodelación de la señalización ionotrópica es dependiente de la edad [Lalo *et al.*, 2011]. Estas

propiedades específicas de estos receptores sugieren la presencia de la subunidad NR3. Por lo tanto, la composición más probable de los NMDARs en astrocitos corticales, según estudios farmacológicos, parece ser triheteromérica, conteniendo las subunidades NR1, NR2C/D y NR3 [Palygin *et al.*, 2011] (ver **Figura VI**). Este hecho hace que los NMDARs puedan ser potencialmente activos en el potencial de membrana en reposo a diferencia de los de las neuronas [Dzamba *et al.*, 2013].

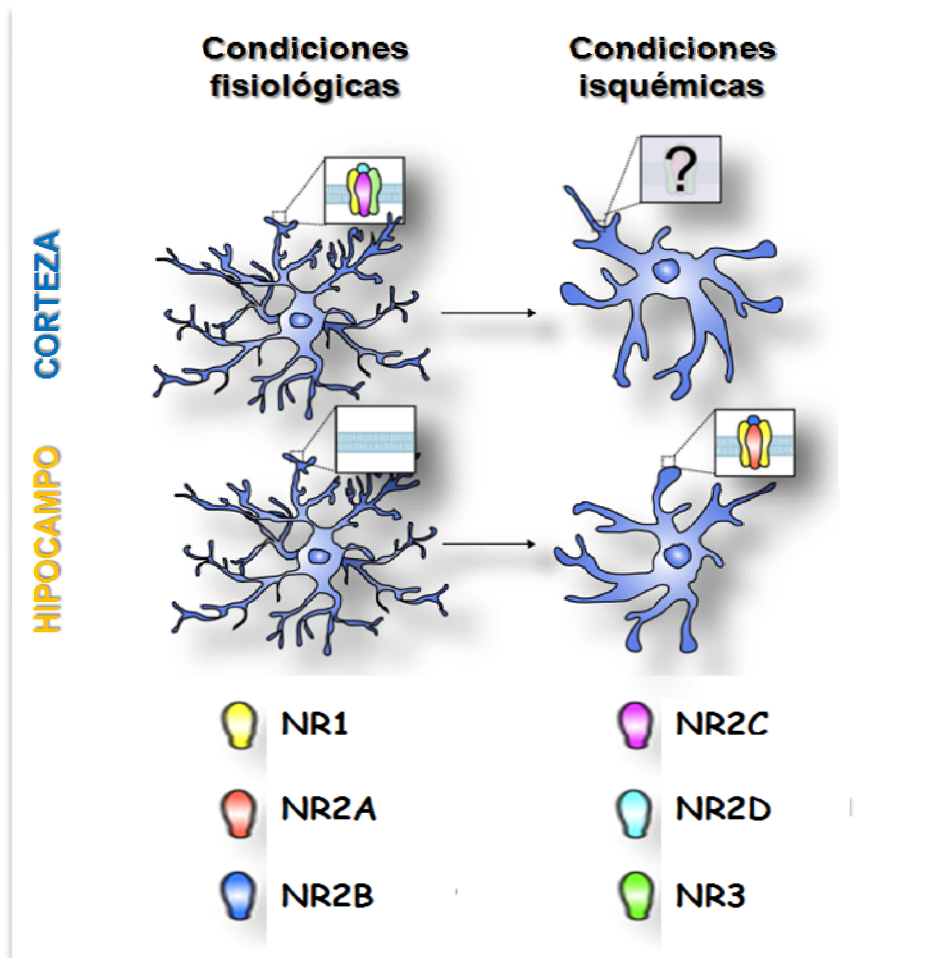


Figura VI. Composición más probable de los NMDARs en los astrocitos localizados en corteza e hipocampo, en condiciones fisiológicas e isquémicas. En este esquema se muestra la composición más frecuente de los NMDARs en dos regiones particulares del SNC (corteza e hipocampo) bajo condiciones fisiológicas y patológicas, basada en datos publicados predominantemente de estudios funcionales. El signo de pregunta significa que la composición de los NMDARs es desconocida. Es un dato a tener en cuenta, la presunta ausencia de NMDARs funcionales en los astrocitos hipocampales. Adaptada de [Dzamba *et al.*, 2013].

Por otro lado, la sobre-estimulación de los NMDARs que ocurre en determinadas situaciones patológicas como la isquemia, es perjudicial no solo para las neuronas sino también para las células gliales. En estas condiciones de isquemia transitoria, los astrocitos son capaces de incrementar la expresión de determinadas subunidades de los NMDARs (NR1 y NR2A-B), promoviendo tanto la muerte neuronal como la muerte de las propias células gliales [Gottlieb & Matute, 1997; Krebs *et al.*, 2003]. Este efecto es debido a una entrada excesiva de Ca^{2+} a través de los NMDARs que es captado por la mitocondria, provocando su despolarización. Esta sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria provoca la formación de ROS y la muerte celular por necrosis. Cuando el daño dependiente de NMDAR es menos intenso, la despolarización mitocondrial es incompleta y los niveles de ATP son suficientes para soportar el proceso activo asociado con la apoptosis [Hardingham & Bading, 2003].

4.3. PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA NEUROTRANSMISIÓN

Durante varias décadas se le ha otorgado a los astrocitos un papel pasivo en la fisiología del sistema nervioso. Sin embargo, en los últimos años se han evidenciado aspectos importantes de la biología celular de los astrocitos, como su capacidad de modular la transmisión sináptica [Araque & Perea, 2004; Serrano *et al.*, 2006]. Los astrocitos muestran una forma de excitabilidad basada en los incrementos de Ca^{2+} intracelular. Estudios de cultivos celulares han demostrado que estímulos que evocan incrementos de Ca^{2+} intracelular en un único astrocito, se pueden propagar a astrocitos adyacentes, formando ondas de Ca^{2+} que pueden extenderse por cientos de micrómetros [Cornell-Bell *et al.*, 1990; Smith, 1994].

Además de los receptores glutamatérgicos, hay evidencia de que los astrocitos expresan una amplia variedad de otros receptores, tales como GABAérgicos, adrenérgicos, muscarínicos, purinérgicos, serotoninérgicos y peptidérgicos. Tras su activación por aplicación exógena de sus correspondientes neurotransmisores, promueven un incremento en la concentración de Ca^{2+} , *in vitro* e *in vivo*, no solo en los propios astrocitos [Porter & McCarthy, 1996] sino también en las neuronas adyacentes

[Nedergaard, 1994]. Éstos y otros estudios posteriores, confirmaron la capacidad de los astrocitos de liberar el neurotransmisor excitador glutamato [Parpura *et al.*, 1994; Bezzi *et al.*, 1998], que es el principal responsable de coordinar la señalización paracrina entre astrocitos y neuronas [Araque *et al.*, 2001; Haydon, 2001]. Todos estos trabajos colocan a los astrocitos como integrantes fundamentales de las sinapsis centrales y periféricas. Además del glutamato, la D-Serina, agonista endógeno del sitio de unión a glicina de los NMDARs, es sintetizado y liberado por los astrocitos (ver **Figura VII**). Es uno de los “gliotransmisores” mejor estudiados, y se sabe que es también capaz de modular la neurotransmisión [Miller, 2004] y la plasticidad sináptica [Yang *et al.*, 2003]. La activación de receptores metabotrópicos de glutamato desencadena, eficientemente, la liberación de D-serina de manera Ca^{2+} dependiente [Mothelet *et al.*, 2005].

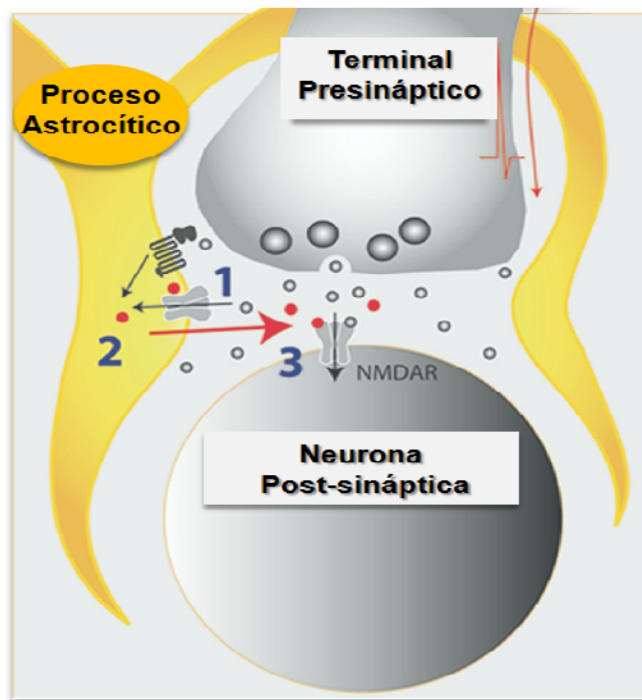


Figura VII: Regulación de NMDARs por D-serina astrocítica. El glutamato liberado sinápticamente desde el terminal pre-sináptico se une a receptores específicos localizados en la superficie de los procesos astrocíticos que envuelven el botón sináptico.(1) Esto estimula vías intracelulares dependientes de Ca^{2+} (2), conduciendo a la liberación de D-serina hacia la hendidura sináptica, que posteriormente se une a NMDARs en la neurona post-sináptica (3). Modificado de [Oliet & Mothelet, 2009]

Los astrocitos también son capaces de liberar otros gliotransmisores como el ATP, que tiene un efecto señalizador, propagando las ondas de Ca^{2+} hacia las neuronas adyacentes y modulando la transmisión sináptica [Koizumi *et al.*, 2003].

4.4. EXCITOTOXICIDAD

La excitotoxicidad es un proceso patológico que conduce a la muerte celular y ocurre cuando los NMDAR son hiperactivados. Se la relaciona con la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como Huntington, Alzheimer, Parkinson o Esclerosis Lateral Amiotrófica. Los mecanismos moleculares aguas abajo (*downstream*) a la hiperactivación de los NMDAR son múltiples y complejos y, a pesar de que han sido ampliamente investigados, no se conocen ni se entienden completamente.

4.4.1. La excitotoxicidad provoca sobrecarga de Ca^{2+} y activación de calpaínas

La sobrecarga de Ca^{2+} que tiene lugar después de la estimulación de NMDAR juega un papel crítico en los procesos de excitotoxicidad. La fuente de Ca^{2+} puede provenir del medio extracelular o intracelular (retículo endoplásmico). Alterando el ambiente iónico extracelular de neuronas corticales en cultivo primario y exponiéndolas a glutamato, se describió que existía una dependencia de Ca^{2+} en la neuroexcitotoxicidad y que a bajas exposiciones a glutamato, el Ca^{2+} juega un papel crucial en la muerte neuronal [Choi, 1987]. Además se determinó la influencia de la hiperactivación de NMDAR en este proceso [Choi, 1987].

Aparte del incremento inicial en la concentración de Ca^{2+} citosólico tras la estimulación de NMDAR, se produce la llamada desregulación retardada del calcio (*delayed calcium deregulation*) o incremento intracelular tardío de Ca^{2+} , que persiste después de la retirada del glutamato y que provoca otros efectos como la activación de calpaínas, una familia cisteína-proteasas dependientes

de Ca^{2+} [Brustovetsky *et al.*, 2010]. Las calpaínas procesan la isoforma completa de la TrkB-FL (*tropomyosin-related kinase B*), un receptor de neurotrofinas similar al BDNF. Esto conlleva a la formación de una proteína truncada que carece del dominio tirosina kinasa (TrkB-T1) [Vidaurre *et al.*, 2012]. Este desequilibrio TrkB-FL / TrkB-T1 está asociado con un modelo en rata de isquemia cerebral focal, que presenta elevados niveles de TrkB-T1 y reducción en los niveles de TrkB-FL tras sobreestimulación de NMDAR [Vidaurre *et al.*, 2012]. Las calpaínas también desencadenan la escisión proteolítica del intercambiador de Na^+ / Ca^{2+} (NCX), el mayor sistema de extrusión de Ca^{2+} en la membrana plasmática, afectando a la homeostasis del calcio y promoviendo muerte neuronal [Bano *et al.*, 2005; Brustovetsky *et al.*, 2010]. Este efecto puede ser realizado por una alteración del NCX, que tiene lugar durante la estimulación de AMPARs, y que conlleva un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la activación de calpaínas [Araujo *et al.*, 2007].

4.4.2 CDK5-p25 en excitotoxicidad

Durante el fenómeno de excitotoxicidad las calpaínas también transforman p35 en p25 provocando la hiperactivación de la kinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) [Lee *et al.*, 2000; Kusakawa *et al.* 2000; Nath *et al.*, 2000]. CDK5 es una serina / treonina kinasa que es activada por la unión a la subunidad reguladora p35. La actividad de CDK5 está determinada por la concentración disponible de p35 [Lee *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2005], que está, a su vez, controlada por el balance entre su síntesis y su degradación, y por fosforilación [Zhao *et al.*, 2009; Hisanaga & Endo *et al.*, 2010]. CDK5-p35 se encuentra asociada a membrana por miristoilación de p35 y se la relaciona con supervivencia neuronal, mientras que la hiperactivación de CDK5 por p25 tras la sobreestimulación de NMDARs, promueve muerte neuronal por apoptosis, mediada por la fosforilación e inactivación del complejo APC/C-Cdh1 [Jaquenoud *et al.*, 2002; Maestre *et al.*, 2008]. La inactivación del complejo APC/C-Cdh1 conduce a la acumulación de ciclina B1, desencadenando muerte apoptótica neuronal [Maestre *et al.*, 2008]. Esta acumulación de ciclina B1 se ha observado en áreas degeneradas del cerebro en la enfermedad de

Alzheimer e isquemia, condición patológica que ha sido ampliamente asociada con la muerte neuronal excitotóxica [Vincent *et al.*, 1997; Wen *et al.*, 2004].

4.4.3 *Disfunción mitocondrial y excitotoxicidad*

La mitocondria contribuye a prevenir los excesivos niveles de Ca^{2+} intracelular importando Ca^{2+} citosólico a través de un sistema uniporte localizado en su membrana interna [Gunter & Gunter, 1994; White & Reynolds, 1997, Gunter & Gunter, 2001]. Sin embargo, durante el proceso excitotóxico se produce una sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} que desata la activación del poro de transición de permeabilidad (PTP), causando la despolarización de la membrana mitocondrial interna y la inhibición de la síntesis de ATP [Wang *et al.*, 1994; Khodorov *et al.*, 1996]. La inhibición de la fosforilación oxidativa y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial finalmente conllevan al incremento de ROS y a la liberación del citocromo c, jugando un papel importante en la excitotoxicidad glutamatérgica [Urushitani *et al.*, 2001; Luetjens *et al.*, 2000].

Recientemente se ha descrito que el citocromo c liberado por la mitocondria es capaz de interactuar con las bombas SERCA (*sarco / endoplasmic Ca²⁺ pumps*) del tipo $\text{IP}_3\text{R1}$ (activado por la vía de la fosfolipasa C / IP_3) en el retículo endoplasmático, provocando la salida de Ca^{2+} desde el retículo y promoviendo apoptosis [Boehning *et al.*, 2003; Beresewicz *et al.*, 2006].

La excitotoxicidad y el estrés oxidativo también alteran los procesos de fisión y fusión mitocondrial, generando mitocondrias fragmentadas, un hecho que se ha observado en muchas enfermedades neurodegenerativas [Knott *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2011]. Además, las mutaciones generadas en OPA1 (*optic atrophy type 1*), una GTPasa relacionada con dinamina, que es esencial para la fusión mitocondrial, también desencadenan la sobre-regulación de NMDAR, conduciendo al proceso excitotóxico [Nguyen *et al.*, 2011].

4.4.4 Una visión general sobre la relación entre la excitotoxicidad y las enfermedades neurodegenerativas

Muchas evidencias en modelos animales y en humanos sugieren la implicación de la excitotoxicidad en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Se han descrito alteraciones tempranas en el sistema glutamatérgico en la enfermedad de Huntington, incluyendo la caída en la captación de glutamato por los astrocitos debido a la disminución en los niveles de los transportadores GLAST y GLTI [Lievens *et al.*, 2001; Estrada-Sánchez *et al.*, 2009], el incremento de las respuestas a NMDA y la disminución de la sensibilidad al Mg^{2+} [Starling *et al.*, 2005], así como cambios en la composición de las subunidades de los NMDARs.

El hecho de que las neuronas dopaminérgicas que degeneran en la enfermedad del Parkinson sean también vulnerables a la excitotoxicidad, ha permitido testar en modelos de ratones, diferentes agonistas del grupo III de receptores glutamatérgicos metabotrópicos para mejorar la aquinesia característica de esta enfermedad [Broadstock *et al.*, 2012].

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza por la degeneración de motoneuronas. Múltiples datos de pacientes con ELA y de ratones mutantes para la Cu/Zn-SOD, modelos bien conocidos y establecidos de la enfermedad, han permitido relacionar el desarrollo de esta enfermedad con la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial [Kruman *et al.*, 1999]. Conjuntamente, estos modelos han conseguido vincular a esta enfermedad con defectos en el transporte de glutamato como consecuencia de la pérdida del transportador GLTI [Rothstein *et al.*, 1995; Howland *et al.*, 2002].

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de depósitos de β -amiloide que pueden inducir excitotoxicidad mediada por NMDA, por alteración en los transportadores de glutamato y en la regulación de Ca^{2+} [Mattson *et al.*, 1992]. Existen varios estudios que indican que las dianas utilizadas para solventar diferentes aspectos relacionados con la excitotoxicidad podrían también ser efectivas para el tratamiento de la

enfermedad del Alzheimer, como por ejemplo, los agentes bloqueantes de la entrada de Ca^{2+} [Weiss *et al.*, 1994; Le *et al.*, 1995] o los antagonistas de determinados receptores glutamatérgicos. Actualmente la memantina junto con el donepezil (inhibidor de la colinesterasa) son las únicas drogas que se han demostrado hasta el momento, que son efectivas para el tratamiento de los síntomas de grado moderado a severo del Alzheimer. La memantina bloquea preferentemente los canales abiertos asociados con receptores ionotrópicos extrasinápticos de glutamato, y su tasa de disociación es rápida por lo que no se acumula ni interfiere con la transmisión normal glutamatérgica [Lipton, 2004; Glodzik *et al.*, 2008].



Hipótesis y Objetivos

"El objetivo de la ciencia es buscar explicaciones sencillas para hechos complejos".

Alfred North Whitehead

1. HIPÓTESIS

Es un hecho bien conocido que las neuronas son células altamente susceptibles a las especies reactivas de oxígeno (ROS). Por el contrario, sus vecinos los astrocitos son células altamente resistentes al estrés oxidativo. El mayor contenido de antioxidantes, particularmente glutatión, en los astrocitos en comparación con las neuronas, justifica esta susceptibilidad diferencial. Sin embargo, el mecanismo molecular determinante que explica esta diferencia en la respuesta antioxidante de ambos tipos celulares se desconoce. En vista de estos antecedentes, nosotros proponemos la posibilidad de que las neuronas y los astrocitos regulen diferencialmente la vía antioxidante de NRF2.

Por otro lado, se conoce que la neurotransmisión glutamatérgica inevitablemente induce la formación de ROS que pueden desencadenar daño oxidativo, conduciendo eventualmente a la neurodegeneración. Aunque las neuronas están equipadas con una discreta e intrínseca defensa antioxidante, ésta es insuficiente para proporcionarles la supervivencia durante el estrés oxidativo. Nosotros proponemos la hipótesis de que la propia neurotransmisión desencadena las señales necesarias para el mantenimiento del estado redox en las neuronas.

2. OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes e hipótesis, nos planteamos conseguir los siguientes objetivos:

1. Caracterizar y estudiar el mecanismo de regulación de la vía de señalización antioxidante NRF2-KEAP1-CUL3 en neuronas y astrocitos corticales de rata.
2. Determinar si la estimulación fisiológica de NMDAR en astrocitos activa la respuesta antioxidante mediada por NRF2.
3. Investigar, en su caso, la vía de señalización responsable de la activación de NRF2 en astrocitos.
4. Dilucidar si la vía de transducción mediada por NRF2 en astrocitos satisface los requerimientos antioxidantes neuronales.

The background of the entire page is a microscopic image of cells. The cells are stained with a green fluorescent dye, making them appear as bright green structures against a solid black background. The cells vary in shape, some showing distinct nuclei and others appearing more elongated or branched. The overall effect is a dense field of glowing green points and structures.

Material y Métodos

Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento".

Louis Pasteur

1. ANIMALES

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. Las condiciones ambientales del animalario se mantuvieron con una humedad relativa entre el 45% y el 65% y una temperatura entre 20°C y 25°C. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta sólida estándar (17% de proteínas, 3% de lípidos, 58.7% de componente glucídico, 4.3% de celulosa, 5% de minerales y 12% de humedad) y han tenido acceso libre al agua durante todo el tiempo.

La etapa gestacional se ha controlado limitando la cohabitación de las ratas vírgenes con machos a una única noche. A las 9:00 horas del día siguiente, se aislaron las ratas que tuvieron presencia de espermatozoides en el frotis vaginal acompañados de células epiteliales de la vagina (que son características de un día fértil del estro). Bajo estas condiciones, el periodo gestacional de la rata se asumió de 21.7 días.

Todas las manipulaciones y los procedimientos con animales están de acuerdo con la normativa vigente de la Comisión Europea 18.06.2007 (2007/526/CE) y de la Legislación Española (RD 1201/2005) en relación a la acomodación y al cuidado de animales de experimentación. Todos los protocolos realizados en esta Tesis se han aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES

Los cultivos primarios de neuronas corticales se realizaron a partir de embriones de ratas de 16 días de gestación (E16) [Almeida *et al.*, 2004]. Las ratas gestantes se sacrificaron por dislocación cervical tras anestesarlas en una atmósfera de CO₂, los embriones se extrajeron por histerectomía y se trasladaron a una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, McLean, Virginia, USA). Los hemisferios cerebrales se extrajeron usando tijeras, pinzas y pañuelos impregnados en etanol al 70%. Se colocaron en una placa de poliestireno de 20 cm² (Nunc; Roskilde, Dinamarca) que contenía la solución de disgregación (EBSS: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, NaH₂PO₄ 1.01 mM, MgSO₄ 1.5 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/ml, albúmina 0.3% (p/v) y DNAsa tipo I 20 µg/ml, pH 7.2) y se cortaron suavemente con un bisturí. Posteriormente, el tejido parcialmente disgregado se pasó a un tubo de 50 ml (BD, Falcon, Bedford, Massachusetts, USA) y se decantó durante 4 minutos. El *pellet* se resuspendió 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 en un baño termostático agitando suavemente cada 3 ó 4 minutos para facilitar el proceso. La tripsinización se detuvo añadiendo 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 *pellet* resultante se resuspendió en 12 ml de la solución de disgregación, haciéndolo pasar 9 veces a través de una pipeta Pasteur, previamente siliconada para favorecer el proceso y evitar la rotura celular. El sobrenadante que contenía las células disociadas, se recogió en un tubo de 50 ml. 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, primero, en 1 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich Chemical Co., Barcelona, España) cuidadosamente seguido por otros 19 ml de DMEM. De esta suspensión, se

recogió una alícuota de 10 μL , se añadieron 40 μL de azul de tripano (Sigma-Aldrich) al 0.4% (v/v) y 30 μl de DMEM para el recuento celular con una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y bajo un microscopio de contraste de fases (modelo CK30, Olympus, Japón).

La suspensión celular se diluyó en medio de cultivo (DMEM suplementado con 10% v/v de FCS) y se sembró a una densidad de $2.5 \cdot 10^5$ células/ cm^2 o a $1,8 - 2,0 \cdot 10^5$ células/ cm^2 (para ensayos de inmunocitoquímica) en placas de poliestireno, previamente recubiertas con poli-D-lisina a 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich). 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 CO_2 . Transcurridos 2 días de cultivo, el medio se cambió por DMEM suplementado con suero de caballo (Sigma-Aldrich) al 5% (v/v) y glucosa 20 mM (Sigma-Aldrich). Al tercer día de cultivo, se añadió arabinósido de citosina 10 μM (Sigma-Aldrich) para impedir la proliferación de células no neuronales. Las células se utilizaron a los 6 días *in vitro* (6 DIV). Bajo estas condiciones, los cultivos de neuronas mostraron una pureza del 96 % (ver **Figura I**), determinada mediante inmunorreacción con el marcador específico neuronal MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*) y el marcador específico de glia GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*).

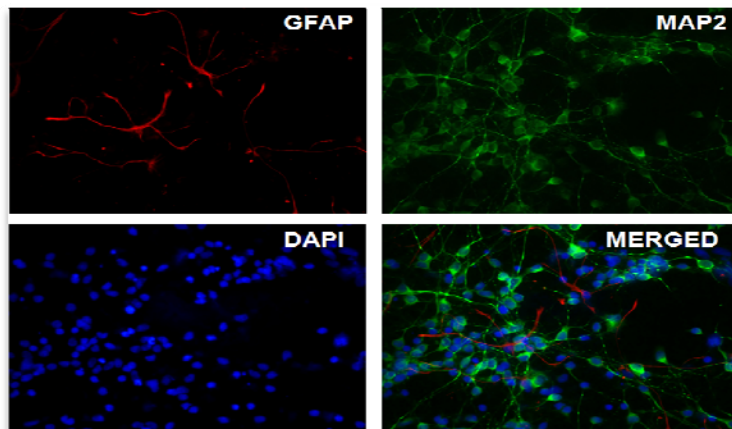


Figura I. Neuronas corticales en cultivo primario. Microfotografías de neuronas corticales en cultivo primario donde se muestra la pureza del cultivo (96%) determinada por inmunorreacción con los marcadores neuronal (MAP2) y glial (GFAP).

Todos los medios de cultivo se suplementaron con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg/ml, de Sigma-Aldrich).

2.2. CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS CORTICALES

Los cultivos primarios de astrocitos corticales se obtuvieron de neonatos de ratas de 0 a 24 horas de edad [Almeida *et al.*, 1998]. Los animales se limpiaron con etanol al 70%, se decapitaron y el cerebro entero se trasladó a una cabina de flujo laminar. El cerebelo y el bulbo olfatorio se eliminaron usando pinzas y los hemisferios cerebrales se limpiaron quitándoles las meninges y los vasos sanguíneos pasándolos por papel Whatman. El tejido se colocó en una placa de poliestireno con la solución de disgregación. La suspensión celular se obtuvo como previamente se describió para el cultivo primario de neuronas.

La suspensión celular se sembró en DMEM suplementado con FCS al 10% v/v en frascos de cultivo de 175 cm² (BD, Falcon), a razón de 3-4 cerebros por frasco. Las células se mantuvieron en un incubador termostatzado a 37°C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO₂. El medio de cultivo fue sustituido dos veces por semana. A la semana de cultivo se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital dentro del incubador termostatzado, para eliminar la microglía y se resembraron en placas de poliestireno de diferentes tamaños según el experimento. Después de 2 semanas (15 DIV), el cultivo tuvo una pureza aproximada del 92-95% determinada por inmunorreacción con el anticuerpo frente a GFAP (Sigma-Aldrich).

2.3. COCULTIVOS DE NEURONAS Y ASTROCITOS CORTICALES

Para la obtención de cocultivos de neuronas y astrocitos corticales se realizaron ambos cultivos por separado como se describió previamente, con la única excepción de que los astrocitos se sembraron en insertos de 10 cm² con una membrana semipermeable de tamaño de poro 0,4 µm (Merck Millipore,

Darmstadt, Alemania), que permite el intercambio de sustancias entre ambos tipos celulares. Se dejaron 24 horas para permitir la adhesión celular.

A los 6 DIV (neuronas) ó 15 DIV (astrocitos), los insertos se sumergieron dos veces en tampón fosfato salino (PBS) para eliminar los restos de FCS y se colocaron sobre la monocapa de neuronas, sembradas en placas multipocillo de 10cm² (Nunc). Se sustituyó el medio por DMEM sin FCS y se distribuyó equitativamente en la parte superior e inferior de los insertos para que ambos tipos celulares estuviesen en contacto con el medio. Se incubó el cocultivo durante el tiempo que duró el tratamiento correspondiente y finalmente se retiraron los insertos y realizamos los experimentos pertinentes con las neuronas.

2.4. HEK-293T

La línea celular procedente de riñón embrionario humano (HEK293T) se mantuvo en crecimiento en DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v). Un día antes de los experimentos, las células se resembraron en placas de poliestireno recubiertas con poli-D-lisina, a una densidad de 10⁵ células/cm².

3. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN, AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN

3.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Todas las amplificaciones de plásmidos se realizaron en células competentes de *E. coli* (cepa DH-5 α) preparadas en nuestro laboratorio a partir de un stock del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG). Los medios de cultivo de bacterias (LB, LB-agar y 2xYT) se prepararon con bactotripton (digerido pancreático de caseína), extracto de autolisado de levadura y agar

granulado (DIFCO Laboratories, Michigan, EE.UU.), tal y como se indica en la **Tabla I**.

	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	-

Tabla I. Composición de los medios de cultivo bacterianos. En esta tabla se muestra la concentración exacta de los diferentes componentes que presentan los medios de cultivo bacteriano líquidos (LB, 2xYT) y sólidos (LB-agar).

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). Para aislar y purificar el DNA de geles de agarosa (Sigma-Aldrich), se empleó un kit comercial de extracción (GenElute, Sigma-Aldrich). Para evitar la exposición a la luz UV de las bandas del gel, cada muestra fue cargada por duplicado y solo una de las bandas fue expuesta a la luz UV para detectarla, mientras que el DNA se purificó de la otra banda.

3.2. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pEGFP-C1-NRF2

El cDNA completo de *Nrf2* humano (1817 pb, número de acceso NM_006164.3; plásmido pT-REx-DEST30) se adquirió de Source Bioscience (Nottingham, Reino Unido) y se subclonó en el vector pEGFP-C1 (Invitrogen) en fase con el cDNA que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo 5' de *Nrf2*, usando los oligonucleótidos correspondientes (Thermo Fischer Scientific, Londres, R.U.) flanqueados en los extremos 5' y 3' por las secuencias de restricción de *BamHI*, tal y como se muestra en la **Tabla II**.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5' → 3'	Tm
Forward + BamHI	5'-cgggatccgcatgatggactggagctgccgcccgcca-3'	90.4°C
Reverse + BamHI	5'-cgggatccgctagttttcctaacaatctggctcttact-3'	73.6°C

Tabla II. Oligonucleótidos empleados en la PCR para obtener el cDNA de Nrf2. Una secuencia de restricción adicional para BamHI se añadió a los extremos 5' y 3' de los oligonucleótidos (azul).

Las condiciones de la PCR fueron 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 2 minutos a 72°C. La extensión final se llevó a cabo durante 10 minutos a 72°C.

El producto de la PCR y el plásmido pEGFP-C1 (4.7 kb, Clontech), se digirieron durante 1 hora con *BamHI* para generar extremos cohesivos que facilitasen la posterior ligación e inserción. Los productos digeridos se incubaron finalmente con la T4 DNA ligasa durante 45 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose el vector de expresión llamado pEGFP-C1-NRF2 (ver **Figura IIA**).

La comprobación de la ligación se realizó mediante análisis de restricción utilizando diferentes enzimas (*PstI*, *HindIII* y *AseI*) con doble sitio de corte (ver **Figura IIB**): uno en el interior del cDNA de *Nrf2* y otro en el vector pEGFP-C1. Además, mediante Western Blot se comprobó la expresión del cDNA y el correcto peso molecular de la proteína de fusión NRF2-GFP que fue aproximadamente de 130 KDa (ver **Figura IIC**).

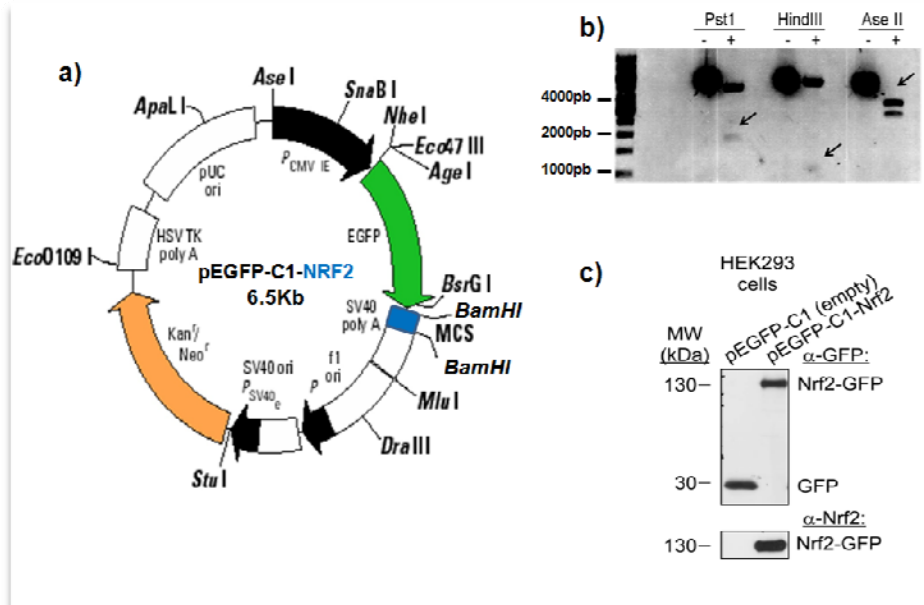


Figura II. Construcción del vector de expresión pEGFP-C1-NRF2. a) Vector pEGFP-C1 con el cDNA de Nrf2 humano (azul) insertado entre sitios BamHI, en el sitio de clonación múltiple (MCS). b) Análisis de restricción llevado a cabo por tres enzimas con doble sitio de corte para comprobar la correcta ligación y direccionalidad del cDNA de Nrf2. c) Western Blot llevado a cabo en HEK293T para corroborar la expresión del plásmido y el adecuado peso molecular de la proteína de fusión GFP-NRF2.

El vector pEGFP-C1-NRF2 expresa GFP fusionada a NRF2 en el extremo C-terminal. Esta construcción nos sirvió para determinar la localización subcelular de NRF2 por microscopía de fluorescencia.

3.3. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pGEX-2T-NRF2

Para la construcción de este plásmido se utilizó el mismo cDNA de Nrf2 humano que para la construcción del pEGFP-C1-NRF2 descrito anteriormente, usando los mismos oligonucleótidos (ver **Tabla II**).

Las condiciones de PCR, digestión y ligación son semejantes a las mencionadas previamente para el vector pEGFP-C1-NRF2. La comprobación de la ligación se realizó únicamente por análisis de restricción utilizando dos

enzimas (*Bam*H1 y *Pst*I), ya que este vector sólo se expresa bajo el promotor bacteriano *P**tac* (ver **Figura III**).

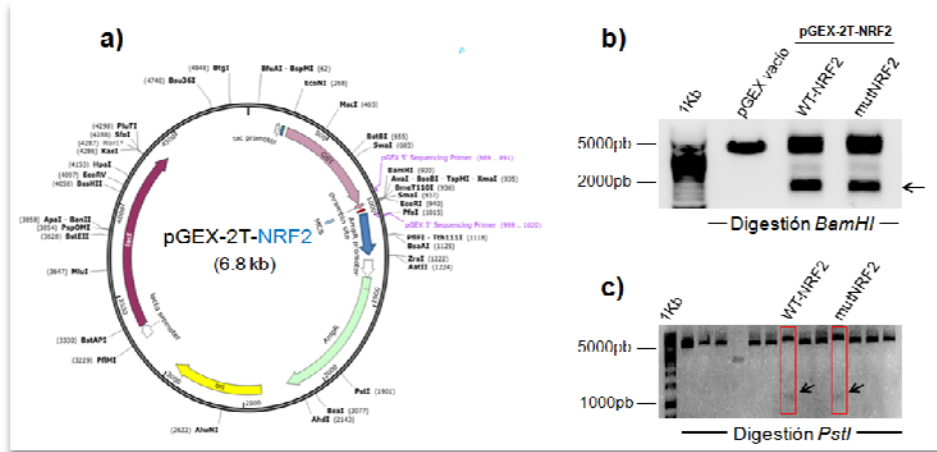


Figura III. Construcción del vector de expresión pGEX-2T-NRF2 y su forma mutada. a) Vector pGEX-2T con el cDNA de Nrf2 humano (azul) insertado entre sitios BamHI, en el sitio de clonación múltiple (MCS). b) Análisis de restricción llevado a cabo por BamHI donde se observa un fragmento correspondiente a Nrf2 (1817pb). c) Análisis de restricción llevado a cabo por PstI que nos permite determinar la correcta direccionalidad del inserto, ya que tiene dos puntos de corte, uno dentro del cDNA de Nrf2 y otro fuera, en el plásmido pGEX-2T.

El vector pGEX-2T (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) expresa el cDNA de la glutatión S-transferasa (GST), que cataliza la conjugación de la forma reducida del glutatión a sustratos xenobióticos para su detoxificación. La obtención del plásmido pGEX-2T-NRF2 nos permitió purificar NRF2 con glutatión-sefarosa y expresarla en bacterias para utilizarla en los experimentos de fosforilación *in vitro*.

3.4. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pGL4.12 [Luc2CP]-ARE

Para la construcción de este plásmido se utilizó la secuencia consenso GTGACnnnGC [Rushmore *et al.*, 1991; Wasserman & Fahl, 1997a, 1997b] del *Elemento de Respuesta Antioxidante* (ARE) repetida en tándem 8 veces y flanqueada en los extremos 5' y 3' por los sitios de restricción *Xho*I y *Bgl*II,

Las condiciones de digestión y de ligación fueron idénticas a las mencionadas para los plásmidos pEGFP-C1-NRF2 y pGEX-2T-NRF2. La comprobación de la ligación se realizó por análisis de restricción utilizando combinaciones de dos enzimas *XhoI/BglII* y *XhoI/PvuII* (ver **Figura IV**).

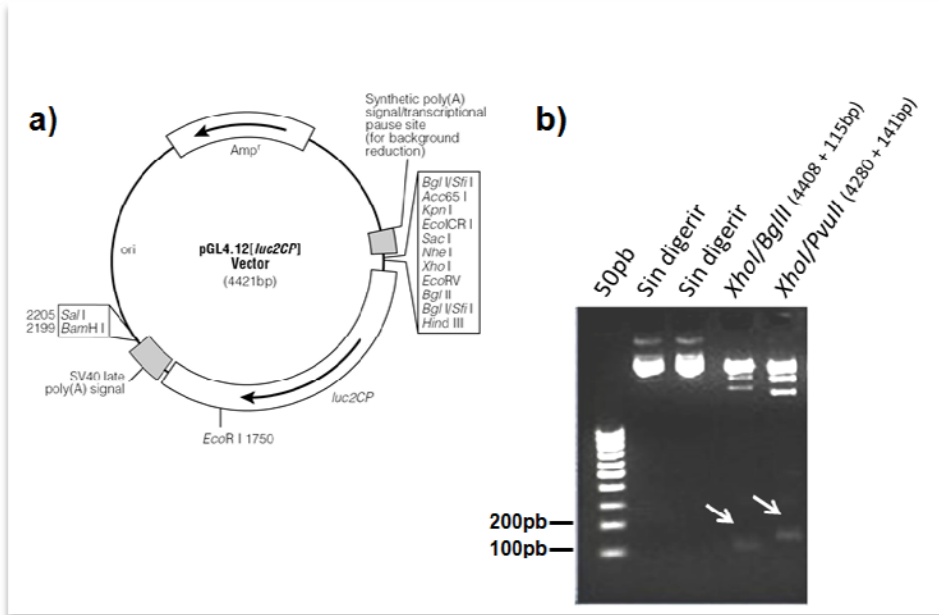


Figura IV. Construcción del vector de expresión pGL4.12 [luc2CP]-ARE. a) Vector pGL4.12 [luc2CP] que contiene el cDNA del gen de la luciferasa que utilizaremos como gen reportero para analizar la actividad del promotor ARE, insertado en el extremo 5' del cDNA de la luciferasa. b) Análisis de restricción realizado con dos combinaciones de enzimas para comprobar la correcta ligación del promotor ARE al vector y su correcta direccionalidad.

3.5. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para la mutagénesis dirigida se usó el kit *QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene. La Jolla.CA, EEUU), utilizando los oligonucleótidos mutados como se indica en la **Tabla IV**. El resultado de la PCR se digirió con *DpnI*.

AMINOÁCIDO	SECUENCIA 5' → 3'	PCR
T395A	F 5'-aacagaatggtcctaaa g caccagtacattctctg-3' R 5'-cagaagaatgtactgg ct tttaggaccattctgt-3'	1 min a 95°C
S433A/T439A	F 5'-attgctgta g ctcctggcatcggaaa g ccccattcac-3' R 5'-gtgaatggg ct ttccgatgaccagga g ctacaggcaat-3'	50s a 95°C
T395D	F 5'-acagaatggtcclaaa gat ccagfacattctctgg-3' R 5'-ccagaagaatgtactgg at cttttaggaccattctgt-3'	50s a 60°C 7 min a 68°C
S433D	F 5'-gagaaagaatfgcctgta gat ctctggcatcggaaa ccc -3' R 5'-gggtttccgatgaccagga ct ctacaggcaattctctc-3'	x 18 ciclos 7 min a 68°C
T439D	F 5'-atcctggcatcggaaa g accattcacaaga-3' R 5'-tctttgtgaatgg ct ttccgatgaccaggat-3'	

Tabla IV. Oligonucleótidos empleados y mutaciones generadas en la proteína NRF2. En la parte superior de la tabla se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida para crear la forma fosfodefensiva de NRF2 y en la parte inferior se detallan las secuencias empleadas para obtener la forma fosfomimética de NRF2. Se encuentran marcadas en rojo las bases nucleicas implicadas en cada mutación.

Se mutaron los residuos de Thr-395, Ser-433 y Thr-439 del cDNA de GFP-*Nrf2* o GST-*Nrf2*, que se reemplazaron por residuos de Ala (A) o Asp (D) para obtener las formas fosfodefensiva (NRF2 mut) y fosfomimética (NRF2 P-mim), respectivamente.

La eficacia de las mutaciones se confirmó mediante secuenciación (Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca) y comparación con la secuencia original de *Nrf2*.

4. “SMALL INTERFERING RNA” (siRNA)

Para los experimentos de siRNA, se utilizaron secuencias 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 (ver **Tabla V**).

PROTEÍNA	NÚMERO ACCESO	SECUENCIA	POSICIÓN
NRF2	NM_031789 (rata)	5'-CTGTTGATGACTTCAATGA-3'	1473-1492
CUL3	NM_001106823 (rata)	5'-TGACAGAAAACACGAGATA-3'	2031-2050
CDK5	NM_080885 (rata)	5'-AAGCCGTACCCGATGTATC-3' (*)	859 - 877
Luciferasa		5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'	

Tabla V. Secuencias de siRNA. Mediante diseño racional se obtuvieron las secuencias de siRNA indicadas. En esta tabla sólo se muestran los oligonucleótidos de la hebra sentido. (*) Secuencia publicada por Zheng *et al.* [Zheng *et al.*, 2007].

La especificidad de las secuencias se confirmó por Alineamiento de Secuencia Básico (BLAST) frente al genoma completo de *Rattus norvegicus*. Como control negativo se empleó el siRNA dirigido contra la luciferasa de la luciérnaga [Ohtsuka *et al.*, 2004], no presente en el genoma de mamíferos.

Los siRNAs se utilizaron a una concentración final de 66 nM o 100 nM, y las células se transfectaron 3 días antes del experimento. Estas condiciones fueron seleccionadas en base a su eficacia y especificidad.

5. TRANSFECCIONES CELULARES

La transfección de siRNA se realizó mediante el reactivo catiónico *Lipofectamine RNAiMAX™* (Invitrogen. Madrid. España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la transfección de plásmidos, se empleó el reactivo catiónico *Lipofectamine LTX* con *Plus Reagent™* (Invitrogen). Las transfecciones neuronales con siRNA se realizaron a los 3 DIV, y las plasmídicas a los 5 DIV, aunque los experimentos se realizaron a los 6 DIV. A estos efectos, los plásmidos se utilizaron a una concentración de 1.6 µg/ml.

Para la transfección de plásmidos en HEK-293T se utilizó la polietilenimina (PEI., Sigma) [Boussif *et al.*, 1995], con pequeñas variaciones. Así, tras la incubación del DNA con PEI 1 µM durante 10 min a temperatura 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 por microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). La eficiencia resultó ser de aproximadamente un 9-12% en neuronas, un 20-50% en astrocitos y un 80-95% en HEK-293T. La correcta traducción de los DNA plasmídicos en sus correspondientes proteínas se comprobó mediante transferencia de Western. Esta técnica también se empleó para determinar la eficacia de los silenciamientos realizados con los distintos siRNA.

6. TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS

6.1. ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES NMDA

Para activar los NMDARs, las neuronas a los 6 DIV y los astrocitos a los 15 DIV, se incubaron con diferentes concentraciones de N-metil-D-aspartato (NMDA: 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μM ; Sigma) durante 8 y 24 horas en DMEM sin FCS. Para inducir un daño excitotóxico, las células se incubaron con glutamato (100 μM ; Sigma) en tampón Hank's (NaCl 134.2 mM, KCl 5.26 mM, KH_2PO_4 0.43 mM, NaHCO_3 4.09 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.33 mM, D-glucosa 5.5 mM, HEPES 20 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mM; pH 7.4, esterilizado por filtración), junto con glicina (10 μM ; Sigma) a 37°C. Tras un periodo de 15 minutos de estimulación, se reemplazó el medio y las células se incubaron durante 1-4 horas en DMEM sin FCS [Delgado-Esteban *et al.* 2000; Almeida & Bolaños, 2001].

6.1.1. Estimulación en presencia de quelantes de calcio

Las incubaciones con NMDA en ausencia de calcio se realizaron en tampón Hank's sin CaCl_2 y en presencia de los quelantes extracelulares de Ca^{2+} : el ácido etilenglicoltetraacético (EGTA, 100 μM ; Sigma) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 100 μM ; Sigma) o el quelante intracelular, ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N, N, N',N'-tetraacético (BAPTA, 10 μM ; Calbiochem) [Diaz-Hernandez *et al.* 2007]. En ambos casos, las neuronas y los astrocitos se preincubaron a 37°C en este tampón en presencia de los quelantes de Ca^{2+} durante 30 minutos. Transcurrido este periodo, se incubaron las células con NMDA durante 8 horas, en DMEM sin CaCl_2 y sin FCS en presencia de los quelantes del catión.

6.1.2. Estimulación en presencia de inhibidores farmacológicos

En la **Tabla VI** se resumen los inhibidores farmacológicos y las condiciones experimentales utilizados en el presente trabajo.

INHIBIDOR	DIANA	PROCEDENCIA	CONCENTRACIÓN	INCUBACIÓN
MK-801	NMDAR (sinápticos)	Sigma	10 μ M	5 min pre-estimulación
Roscovitina	CDK5	Sigma	10 μ M	30 min pre-estimulación hasta recogida de muestras
MDL-28170	Calpaína	Calbiochem	100 μ M	
Tapsigargina	SERCA	Molecular Probes	1 μ M	Tras la estimulación con NMDA o durante todo el tiempo de estimulación
Rottlerina	PKC δ	Santa Cruz	25 μ M	5 min pre-estimulación hasta la recogida de muestras
U-73122	PLC	Millipore	10 nM	
U-73343 ^(*)	PLC	Millipore	10 nM	
Acivicin	GGT	Santa Cruz	100 μ M	

Tabla VI. Inhibidores farmacológicos empleados en la estimulación de NMDARs. El MK-801 es un inhibidor selectivo y no-competitivo de los NMDARs. La roscovitina es un análogo de purinas y fuerte inhibidor de kinasas dependientes de ciclina, principalmente CDK2 y CDK5. El MDL es un selectivo inhibidor de μ -calpaína (calpaína I) y m-calpaína (calpaína II). La tapsigargina es un inhibidor de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA). La rottlerina es un compuesto de *Mallotus philippinensis* que inhibe específicamente la proteína kinasa C delta. El U-73122 es un inhibidor de la fosfolipasa C (PLC) que impide la hidrólisis del fosfatidil inositol bisfosfato (IP₂) en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). (*) Es el análogo inactivo del U-73122 y se utiliza como control negativo. La acivicina es un inhibidor específico de la GGT.

Las células se incubaron en medio Hank's que contenía los inhibidores, tal y como se indica en la **Tabla VI**. A continuación, se incubaron con glutamato o con NMDA, como se describió anteriormente. Tras la incubación, se sustituyó el medio por DMEM sin FCS suplementado con el inhibidor correspondiente.

6.2. INHIBICIÓN DE LA VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA

Para inhibir la vía ubiquitina-proteasoma responsable de la degradación de múltiples proteínas, como es el caso de NRF2, se utilizó el inhibidor farmacológico MG-132 (Calbiochem). Este compuesto se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma) a la concentración de 10 mM y se usó a una concentración final de 10 μ M durante 2 horas. Los controles recibieron el mismo volumen de vehículo (DMSO).

6.3. INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Para inhibir la transcripción se utilizó el antibiótico polipeptídico actinomicina D (Sigma), aislado de bacterias del suelo del género *Streptomyces*, que se disolvió en DMSO. Se utilizó a una concentración final de 100 ng/ml. Este compuesto se une al DNA en el complejo de iniciación evitando así la elongación por la RNA polimerasa.

6.4. ESTIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS

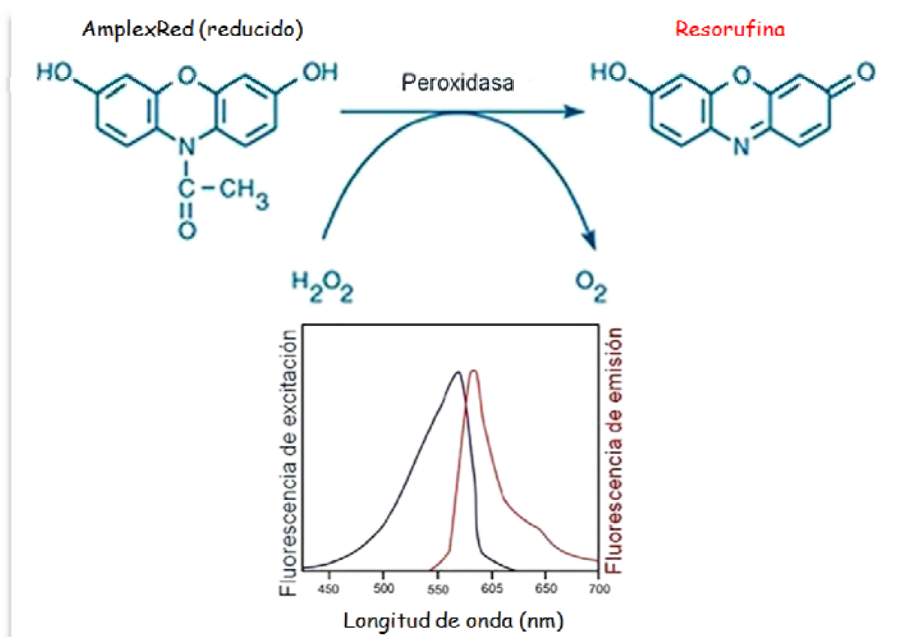
La producción de ROS por la mitocondria en célula entera se indujo mediante la incubación de las neuronas con el neurotransmisor excitador glutamato a la concentración excitotóxica de 100 μ M en tampón Hank's durante 15 minutos, como se describió anteriormente. Por otro lado, en los experimentos de apoptosis se incubaron las neuronas, de forma aguda, con el H₂O₂ (400 μ M) durante 1 hora en DMEM sin FCS.

Finalmente, para mimetizar una situación de estrés oxidativo en las neuronas, éstas se incubaron con el agente oxidante *tert*-butilhidroquinona (t-BHQ, 20 μ M; Sigma) durante 4 horas en DMEM sin FCS. Este compuesto oxida los residuos de Cys-151, Cys-273 y Cys-288 de KEAP1 lo que desestabiliza su interacción con el factor de transcripción NRF2.

7. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS

7.1. DETECCIÓN DE H₂O₂ POR AMPLEX RED™

La producción de H₂O₂ en células intactas se detectó con la sonda luminiscente *AmplexRed*[™] (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), como se indica en el **Esquema II**.



Esquema II. Detección de H₂O₂ por AmplexRed. La sonda *AmplexRed* se oxida por H₂O₂ en presencia de peroxidasa de rábano, detectándose la fluorescencia del derivado oxidado al que da lugar (resorufina).

Para la determinación de H₂O₂ las neuronas se incubaron con *AmplexRed*[™] 50 μ M en tampón Krebs-Ringer fosfato (NaCl 145 mM, Na₂PO₄ 5.7 mM, KCl 4.86 mM, CaCl₂ 0.54 mM, MgSO₄ 1.22 mM y glucosa 5.5 mM, pH 7.4) en presencia de 0.1 U/ml de peroxidasa de rábano. La luminiscencia se registró

durante 2 horas a intervalos de 30 minutos, utilizando un espectrofluorímetro *Variokan Flash* (Thermo Fischer, Vantaa, Finlandia), con una longitud de onda de excitación de 538 nm y de emisión de 604 nm. Se utilizaron para estos experimentos placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc) y se realizaron octuplicados por cada condición. Para los cálculos se utilizaron las pendientes derivadas de la fluorescencia emitida por la sonda.

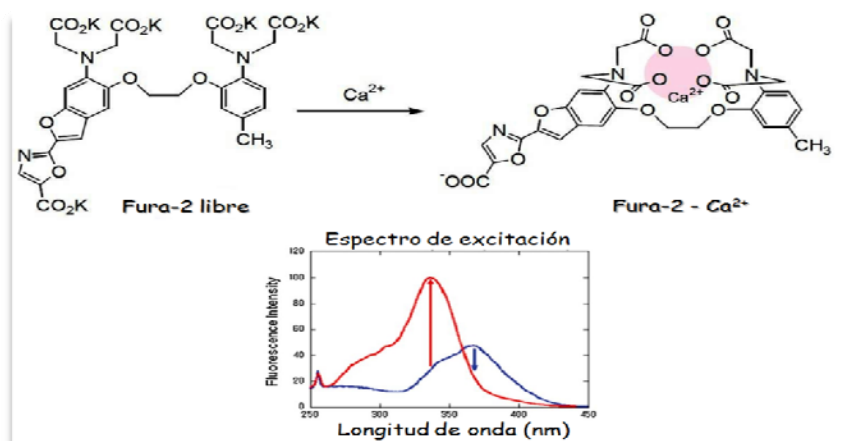
8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR

8.1. DETECCIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR

Para estimar los cambios en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) en cultivo primario de neuronas, se empleó la sonda fluorescente *Fura-2/AM* (éster de Fura-2-acetoximetil; Life Technologies, Eugene, OR, USA), un indicador fluorescente permeable a la membrana plasmática. Tras la unión del Ca^{2+} con *Fura-2*, el máximo de excitación de fluorescencia fluctúa de 380 nm (libre de Ca^{2+}) a 340 nm (saturado de Ca^{2+}), mientras que el máximo de emisión de fluorescencia se mantiene inalterado a ~ 505 nm (**Esquema III**).

Las neuronas de 6 DIV se sembraron en placas de 96 pocillos (Nunc) y se incubaron con *Fura-2* (2 mM; disuelto en DMSO) durante 40 minutos en DMEM a 37°C. Posteriormente, se lavaron y se incubaron con *Standard Buffer* (NaCl 140 mM, KCl 2.5 mM, Tris-HCl 15 mM, D-glucosa 5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, MgSO_4 1 mM y CaCl_2 1 mM, pH 7.4) durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, el *Standard Buffer* se retiró y se reemplazó por *Experimental Buffer* (NaCl 140 mM, KCl 2.5 mM, Tris-HCl 15 mM, D-glucosa 5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y CaCl_2 2 mM, pH 7.4), en presencia o en ausencia de MK-801 (10 μM).

Las emisiones de fluorescencia a 505 nm, después de las excitaciones a 340 y 380 nm, respectivamente, se registraron a intervalos de 1 segundo en un espectrofluorímetro *Variokan Flash* (Thermo Fischer, Vantaa, Finlandia) a 32°C. Después de 10 segundos aproximadamente, se añadió NMDA (agonista de receptores glutamatérgicos de NMDA) a diferentes concentraciones (10 y 20 μM) junto con glicina 10 μM . Las emisiones se registraron durante 50 segundos más. Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular se estimaron calculando el ratio de la fluorescencia emitida a 505 nm, obtenida después de la excitación a 340 nm, dividida por la obtenida después de la excitación a 380 nm (F_{340} / F_{380}). El ruido de fondo se determinó a partir de los valores obtenidos en las células carentes de *Fura-2* (sólo en presencia del vehículo DMSO). En experimentos preliminares, la especificidad al Ca^{2+} de las medidas se testó en *Experimental Buffer* libre de Ca^{2+} con EDTA 1 mM, que previno completamente los cambios de fluorescencia emitida a 505 nm.



Esquema III. Detección de Ca^{2+} intracelular con la sonda Fura-2. La unión de Ca^{2+} a la sonda produce cambios en la fluorescencia de excitación de la misma: de 380 nm, cuando la sonda está libre de Ca^{2+} (azul), a 340 nm cuando la sonda está unida a Ca^{2+} (rojo).

La monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en células individuales se realizó en el laboratorio del Dr. Antonio González (Universidad de Extremadura, Cáceres). Para ello, los astrocitos se sembraron en cubreobjetos y se incubaron en presencia de la sonda *Fura-2/AM* (4 μM) a temperatura ambiente (23-25 °C) durante 40 minutos en un tampón Na-Hepes (NaCl 140 nM, KCl 4,7 nM, CaCl_2

1,3 nM, $MgCl_2$ 2 nM, Hepes 10 nM, glucosa 10 nM, BSA al 0,2%, pH 7.4), [Salazar *et al.*, 2008]. Después, el medio extracelular se desechó y se reemplazó con tampón Na-HEPES fresco sin Fura-2/AM. Los astrocitos se utilizaron inmediatamente tras la incubación con la sonda fluorescente.

Para la detección de los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$, se montaron los cubreobjetos, que contenían las células cultivadas, en una cámara experimental de perfusión, y se colocaron en un microscopio de epifluorescencia invertida (Nikon Diaphot T200, Melville, NY, EE.UU.). Las células se perfundieron continuamente con tampón Na-HEPES sin albúmina y la fluorescencia emitida por el *Fura-2* se detectó empleando un sistema de adquisición de imagen y de análisis de vídeo (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón). Las células se excitaron alternativamente a 340/380 nm con luz procedente de una lámpara de arco de xenón pasando por un monocromador de alta velocidad (Policromo IV, Photonics, Hamamatsu, Japón).

La emisión de fluorescencia a 505 nm se controló usando una cámara digital CCD refrigerada (CCD Hisca C-6790, Hamamatsu, Japón) y se registró mediante un software cualificado (AQUACOSMOS 2,5, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón). Bajo estas condiciones, la fluorescencia emitida por *Fura-2* reflejó los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ [Grynkiewicz *et al.*, 1985].

Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron a partir de áreas determinadas consideradas células individuales. Los estímulos se disolvieron en tampón Na-Hepes extracelular y se aplicaron directamente a las células en la cámara de perfusión. En los experimentos en los que se empleó un medio libre de Ca^{2+} se utilizó un medio extracelular sin Ca^{2+} con EGTA 500 μ M. Los resultados se expresaron como el ratio de la fluorescencia emitida tras la excitación con ambas longitudes de onda (F340 / F380), previamente normalizados con la fluorescencia de reposo.

9. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

9.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

9.1.1. Extracción de proteínas totales

Para obtener extractos celulares de proteínas totales, las células se lavaron con PBS y se lisaron en tampón RIPA (dodecilsulfato sódico 1%, EDTA 10 mM, Triton Tx-100 1% v/v, NaCl 150 mM, Na₂PO₄ 10 mM, pH 7.0), suplementado con inhibidores de fosfatasa (Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50 mM) y proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 μM, aprotinina 50 μg/ml, leupeptina 50 μg/ml, pepstatina 50 μg/ml, anti-papaína 50 μg/ml, amastatina 50 μg/ml, bestatina 50 μg/ml, y el inhibidor de tripsina soybean) y se hirvieron durante 5 minutos. Los extractos se centrifugaron a 13,000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo.

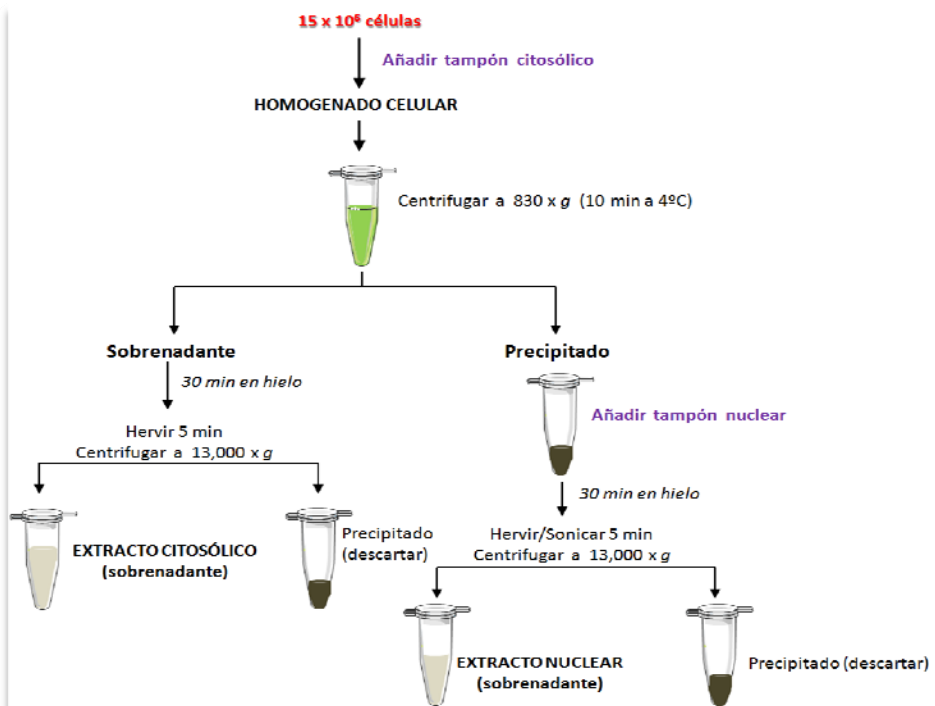
9.1.2. Extracción de proteínas citosólicas y nucleares

La extracción se llevó a cabo mediante una técnica de fraccionamiento subcelular adaptada de otros autores [Zancai *et al.* 2005]. Se basa en el uso de una solución de lisis poco agresiva (tampón citosólico), que fragmenta las membranas celulares en una primera fase, pero mantiene los núcleos intactos, que son lisados en una segunda fase con una solución más agresiva (tampón nuclear) con el fin de obtener exclusivamente las proteínas nucleares (ver **Esquema IV**).

Para ello, las células se sembraron en placas de 60 cm² y se lavaron con PBS suplementado con MgCl₂ frío. Posteriormente, se añadió el tampón citosólico (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 300 mM y NP-40 0,1% v/v, pH 7.9) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas. A continuación, se rasparon las células y se hicieron pasar 15 veces a través de una micropipeta. Tras 30 minutos en hielo, se centrifugaron los extractos a 830 x g durante 10 minutos a 4°C para separar las dos fracciones. Por un lado, se retiraron los sobrenadantes (citoplasma) y

se colocaron en un tubo nuevo. Finalmente, se hirvieron durante 5 minutos y se congelaron a -80°C .

Por otro lado, los *pellets* (núcleos) se resuspendieron en tampón nuclear, (HEPES 50 mM, MgCl_2 1.5 mM, KCl 10 mM, NaCl 0.5 mM, EDTA 1mM y NP-40 1% v/v, pH 7.9) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas. Seguidamente, se hicieron pasar 15 veces a través de una micropipeta y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Se agitaron en vórtex 10 segundos, se hirvieron 5 minutos, se sonicaron 5 minutos y se centrifugaron a $13,000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Finalmente se congelaron los núcleos purificados a -80°C .

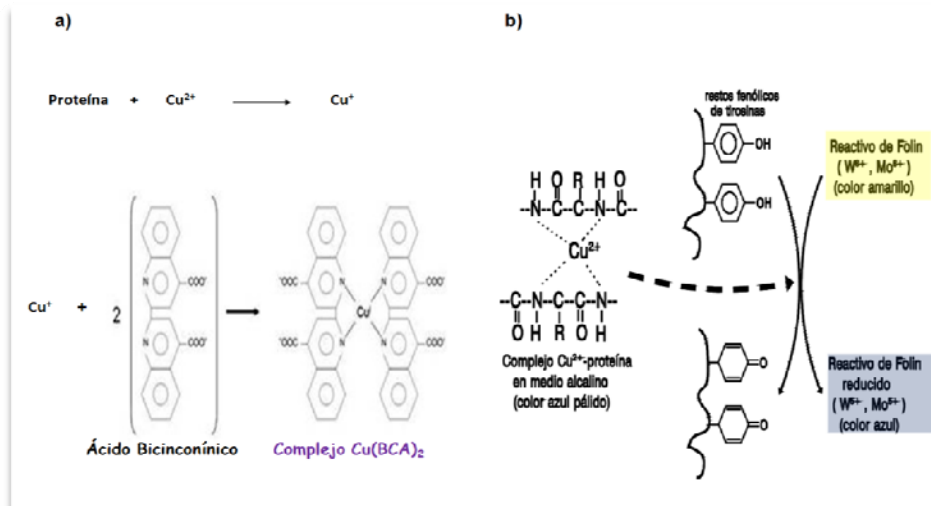


Esquema IV. Fraccionamiento subcelular. La obtención de las fracciones citosólica y nuclear de neuronas y astrocitos corticales se realizó por un procedimiento de centrifugación diferencial. Para ello, primero se lisaron las células con una solución de lisis poco agresiva (tampón citosólico) que sólo rompe membranas celulares. Tras centrifugar ese homogenado a $830 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , se separó el sobrenadante (extracto citosólico) del precipitado (extracto nuclear) que se resuspendió con una solución de lisis más agresiva para romper los núcleos. Finalmente ambos extractos se hirvieron y se centrifugaron a $13,000 \times g$ para purificarlos.

9.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas de las muestras se midió mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA; Pierce, Thermo Fisher Scientific, Illinois, EE.UU.). Este método se basa en la reducción del Cu^{2+} (azul) a Cu^+ por parte de las proteínas de la muestra, el cual es capaz de reaccionar con el BCA originando una solución morada que se midió espectrofotométricamente en el lector de placas *Multiskan Ascent* (Thermo Electron Corp, Basingstoke, Reino Unido) a 562 nm (ver **Esquema V**).

También se utilizó el método de *Lowry* y colaboradores [Lowry *et al.*, 1951], que básicamente consiste en la formación de un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico. En una segunda reacción, se utiliza el reactivo *Folin-Ciocalteu* (ácido fosfomolibdotúngstico), que se reduce por medio de los grupos fenol de los aminoácidos aromáticos presentes en la proteína (Tyr, Trp y Phe), a un complejo de color azul oscuro (**Esquema V**), el cual se mide espectrofotométricamente a 750 nm (*Uvikon*, Microbeam S.A., Barcelona, España). Con ambos métodos se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.



Esquema V. Métodos de determinación de la concentración de proteínas. a) Método del ácido bicinonínico (BCA). b) Método de Lowry que usa el reactivo de Folin-Ciocalteu.

9.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

La obtención de extractos proteicos totales se realizó después de lavar las células con PBS y lisarlas con tampón RIPA suplementado con los inhibidores de fosfatasa y proteasas (ver **Sección 9.1.1.**). 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 método colorimétrico del BCA (Pierce, Rockford IL, EEUU).

Las proteínas (10-100 µg) de los extractos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (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 un marcador de peso molecular (*Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific) 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.) y tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% p/v, pH 8.3).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (ver composición en la **Sección 9.6**), o bien se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección mediante la técnica de Western Blot.

9.4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Biosciences, Nueva Jersey, EE.UU.) utilizando el sistema *Mini-Transblot* (BioRad) y tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% v/v, pH 8.3). A continuación, se bloquearon las membranas durante 1 h con leche (Sveltesse, Nestle) al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0.1% v/v; pH 7.5) a temperatura ambiente. 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 VII**). Como control de carga, se utilizaron para extractos totales y citosólicos, anti-GAPDH (Ambion, Austin, Texas, EEUU), anti- β -actina (Sigma-Aldrich) o anti- β III-Tubulina (Abcam; Cambridge, Reino Unido) y para extractos nucleares, anti-Nup98 (Cell Signaling; Danvers, EE.UU.) y anti Lamin β (Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Alemania). Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP), en TTBS con leche al 2% durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar las membranas 3 veces con TTBS, y una con TBS (TTBS sin Tween-20), las membranas se incubaron, según la proteína a detectar, con los reactivos de quimioluminiscencia *Super Signal West Dura* (Pierce), *Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology) e *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate* (Merck Millipore; Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Finalmente, las membranas se expusieron a una película de auto-radiografía (*BioMax XAR film*, Kodak) para detectar la señal.

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Anticuerpo	Especie	Dilución (aplicación)	Clon (Referencia)	Casa Comercial
Gliceraldehído – 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Ratón (monoclonal)	1/40,000 (WB)	Clon 8C5 (AM1300)	Ambion
β – Actina	Ratón (monoclonal)	1/30,000 (WB)	Clon AC-15 (A3854)	Sigma
β III - Tubulina	Conejo (policlonal)	1/1,000 (WB)	ab18207	Abcam
Nucleoporina 98 (NUP98)	Conejo (policlonal)	1/1,000 (WB)	Clon P671 (2292)	Cell Signaling
Lamina B	Ratón (monoclonal)	1/100 (WB)	Clon H 10 (sc374015)	Santa Cruz
Microtubule – Associated Protein 2 (MAP2)	Ratón (monoclonal)	1/1,000 (WB, ICQ)	Clon AP 20 (M2320)	Sigma
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Conejo (policlonal)	1/500 (WB, ICQ)	G9269	Sigma
Nuclear Factor Erythroid 2 – related factor 2 (NRF2)	Cabra (policlonal)	1/500 (WB)	Clon T-19 (sc30015)	Santa Cruz
Kelch - like ECH-associated protein 1 (KEAP1)	Ratón (monoclonal)	1/1,000 (WB)	Clon BC002930 (60027 1 Ig)	Proteintech
Cullina 3 (CUL3)	Conejo (monoclonal)	1/20,000 (WB)	Clon EHR3196Y (ab75851)	Abcam
Cyclin – Dependent Kinase 5 (CDK5)	Conejo (policlonal)	1/250 (WB)	Clon C-8 (sc-173)	Santa Cruz
Fosfoserina (pSer)	Conejo (policlonal)	1/1,000 (WB)	Clon Poly / PS1 (61-0100)	Invitrogen
p35	Conejo (policlonal)	1/200 (WB)	Clon C-19 (sc 820)	Santa Cruz
Green Fluorescent Protein (GFP)	Conejo (policlonal)	1/1,000 (WB)	ab6686	Abcam
Integrina β 5	Ratón (monoclonal)	1/200 (CF)	Clon KN52 (16 049 / 82)	Affymetrix
ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Anti – IgG (H+ L) de conejo conjugado con HRP	Cabra (policlonal)	1/10,000 (WB)	sc-2004	Santa Cruz
Anti – IgG (H+L) de conejo conjugado con Cy3 IgG	Cabra (policlonal)	1/500 (ICQ)	111 185 003	Jackson Immuno
Anti – IgG (H+L) de ratón conjugado con HRP	Cabra (policlonal)	1/10,000 (WB)	sc-2302	Santa Cruz
Anti – IgG (Fc γ) de ratón conjugado con Cy2 IgG	Cabra (policlonal)	1/500 (ICQ)	115-226-008	Jackson Immuno
Anti – IgG (H+L) de ratón conjugado con Alexa 488	Durro (policlonal)	1/500 (CF)	ab150105	Abcam
Anti – IgG (H+L) de cabra conjugado con HRP	Conejo (policlonal)	1/10,000 (WB)	sc-2788	Santa Cruz

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

9.5. “STRIPPING” DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

En ocasiones, las membranas de nitrocelulosa de los Western Blot se reutilizaron y se incubaron de nuevo con un anticuerpo primario distinto al inicial. Para ello, fue necesario realizar *stripping* de las mismas, que consiste en incubar las membranas en un tampón compuesto por Tris-HCl 62.5 mM pH 6.7, SDS al 2% (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TTBS a temperatura ambiente y se volvió a bloquear la membrana con leche al 5% (p/v). A partir de este momento, la incubación de los anticuerpos y el revelado se realizó de igual manera a la mencionada en la sección anterior.

9.6. TINCIÓN DE GELES SDS-PAGE CON AZUL DE COOMASSIE

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie al 0.1% p/v, metanol al 50% v/v y ácido acético al 10% v/v) durante 15 minutos en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se destiñeron en una solución que contenía metanol al 20% v/v y ácido acético al 10% v/v en agitación, cambiando periódicamente dicha solución.

Esta técnica se realizó para comprobar el porcentaje de proteínas que se habían quedado en el gel y, por tanto, no se habían transferido a la membrana de nitrocelulosa.

9.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Los extractos proteicos (100 - 200 μ g) obtenidos en tampón RIPA (ver **Sección 9.1.1.**) se incubaron con 2 μ g del anticuerpo anti-CDK5, 1 μ g de anti-NRF2 o 1 μ g de p35 a 4°C con agitación orbital, durante toda la noche. A continuación, se añadieron 30 μ l de proteína A-sefarosa (0.12 g/ml; GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suecia) a cada muestra y se incubó durante 2 horas a 4°C. Las bolas de sefarosa, unidas a los inmunocomplejos,

se centrifugaron durante 1 minuto a 4000 rpm y se lavaron 5 veces con 1 ml de tampón RIPA. Finalmente, los inmunoprecipitados se detectaron por análisis de Western Blot.

9.8. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST)

La producción de las proteínas de fusión GST-NRF2 silvestre (NRF2-Wt) y GST-NRF2 mutado o forma fosfodefactiva (NRF2-Mut) se realizó en 10 ml de medio de cultivo de enterobacterias de *Escherichia coli* BL21. Para inducir la expresión de la proteína, se añadió isopropil p-D-tioglucopiranosido (IPTG, 500 μ M; Sigma) al medio. Tras 4 horas de incubación a 37°C, las células se recogieron por centrifugación (10.000 x g, 10 minutos) y se resuspendieron en tampón de lisis (PBS, Tritón X-100 al 1% v/v, lisozima 0.2 μ g/ml, DTT 2 mM y los inhibidores de proteasas PMSF 1 mM, aprotinina 10 μ g/ml y leupeptina 10 μ g/ml). Tras la incubación de la suspensión celular a 4°C durante 30 minutos, ésta se sonicó (*Misonic XL2010*), y se centrifugó a 30.000 x g a 4°C durante 30 minutos.

Las proteínas se purificaron de los sobrenadantes con 200 μ l de glutatión-sesafarosa (GE Healthcare Life Sciences) a 4°C durante 2 horas. A continuación, se lavaron 5 veces con PBS (suplementado con inhibidores de proteasas). Finalmente, la pureza de la proteína y el rendimiento del proceso se comprobaron mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie (ver **Figura V**).

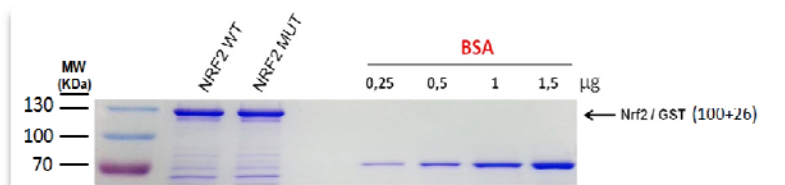


Figura V. Representación de un gel teñido con azul de Coomassie. Esta tinción nos permitió comprobar, utilizando un patrón de BSA, la pureza y la concentración de la proteína purificada.

10. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS NEURONAL

10.1. TINCIÓN CON ANEXINA V / 7- AMINO - ACTINOMICINA D

La muerte celular por apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, tras incubar las células con anexina V, conjugada con el fluorocromo APC (alofocianina). El método consiste en la detección, mediante anexina V, de fosfatidilserina que en las células apoptóticas se transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina en la cara externa de la superficie celular.

Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática (consideradas como necróticas). Por ello, junto con la anexina V se utilizó el colorante impermeable a la membrana plasmática 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences, Nueva Jersey, EE.UU.), que se une específicamente al DNA de las células necróticas y que nos permitió identificar exclusivamente las células apoptóticas. Así, sólo aquellas células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas (ver **Figura VI**).

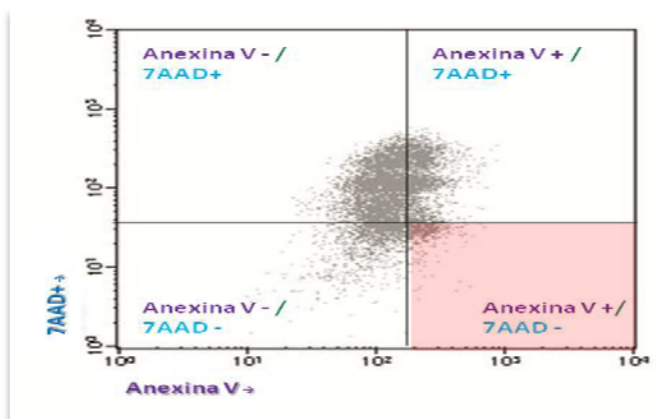


Figura VI. Determinación de la muerte celular por apoptosis. Se analizó la tinción con Anexina V-APC y 7-AAD, considerándose apoptóticas las Anexina V-APC⁺ y 7-AAD⁻ (cuadro rojo).

Las neuronas se tripsinizaron suavemente con EDTA tetrasódico 1 mM en PBS (pH 7.4), y se incubaron con anexina V-APC y 7-AAD en tampón de conjugación (HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, las señales de la anexina V-APC y del 7-AAD se analizaron en los canales 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 a los dobletes o tripletes formados por uniones intercelulares. Para el análisis citométrico, se seleccionaron 10⁵ células en triplicado y por condición.

11. DETECCIÓN DE MAP2 Y GFAP POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para caracterizar los cultivos primarios de neuronas y determinar la contaminación por otros tipos celulares como los astrocitos, se determinó por citometría de flujo el porcentaje de neuronas (células MAP2⁺) y de astrocitos (células GFAP⁺).

A los 6 DIV las neuronas se tripsinizaron suavemente con EDTA tetrasódico 1 mM en PBS (pH 7.4) y se resuspendieron en un tampón de fijación y permeabilización (BD *Cytofix / Cytoperm Buffer*) para favorecer la penetración de los anticuerpos en el interior celular. Posteriormente, se incubaron las células durante 30 minutos en hielo. Finalmente, se lavaron una vez con BD *Wash / Perm Buffer* (solución de lavado) y se centrifugaron a 700 x g 3 minutos. Los *pellets* de células se resuspendieron en 500 µl de PBS con la dilución correspondiente de los anticuerpos MAP2 y GFAP (ver **Tabla VII**) y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación orbital. Al día siguiente, se lavaron las células una vez para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con Cy2 y Cy3

(Jackson Inmuno) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación orbital y en oscuridad.

Mediante los dos tipos de fluoróforos conjugados fuimos capaces de distinguir el marcaje de los dos tipos celulares, neuronas y astrocitos (ver **Figura VII**). La fluorescencia de Cy2 (células MAP2⁺) se analizó en el canal FL1 y la de Cy3 (células GFAP⁺) en el canal FL3 del citómetro de flujo. Los resultados se expresaron como porcentaje de células inmunorreactivas para MAP2 y para GFAP.

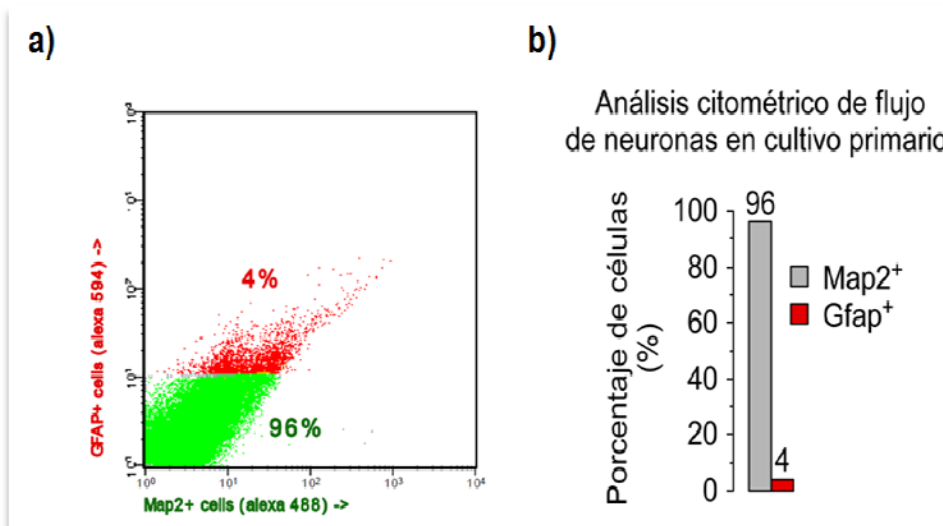


Figura VII. Detección y cuantificación del marcaje de MAP2 y GFAP por citometría de flujo. (a) En este registro se puede observar el marcaje de MAP2-Cy2 (marcador neuronal en verde) y de GFAP-Cy3 (marcador astrocítico en rojo). (b) Se observa la cuantificación en porcentaje de células de las dos subpoblaciones diferenciadas. Esta técnica nos permitió caracterizar de forma fina los cultivos primarios de neuronas corticales.

12. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ($\Delta\psi_m$) COMO ÍNDICE DE INTEGRIDAD MITOCONDRIAL.

La evaluación del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) se realizó por citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del sistema comercial *MitoProbe™ DiIC₁ Assay Kit for Flow Cytometry* (Life Technologies).

Las neuronas se incubaron con la sonda DiIC₁ (1,1', 3, 3', 3', 3' - hexametilindodicarbo-yoduro de cianina) a una concentración de 10 μ M a 37°C durante 15 minutos. Esta sonda, dado su carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias polarizadas, por lo que su pérdida es un índice de despolarización mitocondrial (ver **Figura VIII**).

Tras la incubación con la sonda, se centrifugaron a 700 x *g* durante 3 minutos y los *pellets* se resuspendieron en 500 μ l de PBS. Los valores de $\Delta\psi_m$ se expresaron en unidades arbitrarias (u.a.) usando el desacoplador mitocondrial carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona (CCCP, 50 μ M) durante 15 minutos para definir el valor 0 de $\Delta\psi_m$. En el análisis citométrico se utilizaron 10⁶ células por triplicado y por condición, y la señal de fluorescencia se analizó en el canal FL4 del citómetro de flujo *FACScalibur*.

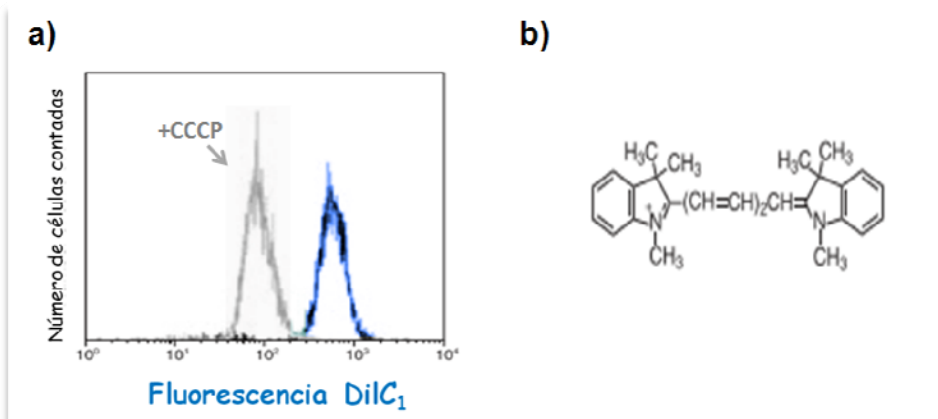


Figura VIII. Determinación del potencial de membrana mitocondrial utilizando la sonda DiIC₁.
a) Registro de la fluorescencia de la sonda catiónica DiIC₁ sin el desacoplador mitocondrial CCCP (azul) y después de añadirlo para despolarizar completamente la mitocondria (gris). b) Estructura de la sonda DiIC₁ apta para atravesar las membranas mitocondriales debido a su alta hidrofobicidad

13. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Para los ensayos de inmunocitoquímica, las neuronas y los astrocitos se crecieron en cubreobjetos de cristal esterilizados al fuego y tratados con una solución de poli-L-ornitina 15 µg/ml (Sigma) y fibronectina 1 µg/ml (Sigma).

A los 6 DIV las neuronas se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS durante 20 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% (v/v) en PBS durante 5 minutos. A continuación, se incubaron en la solución de bloqueo (Triton X-100 al 0.2% v/v, BSA al 1% y suero de cabra al 5% v/v en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente, se incubaron con los anticuerpos anti-MAP2 y anti-GFAP en suero de cabra al 2%, BSA al 1%, PBS-Triton X-100 al 0.2% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBS-Triton X-100 al 0.2% y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti IgG de ratón conjugado con Cy2 y anti IgG de conejo conjugado con Cy3 (Jackson, ver **Tabla VII**) y con el marcador nuclear DAPI 30 µM (Sigma) en suero de cabra al 2%, BSA al 1%, PBS-Triton X-100 al 0.2%, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Por otro lado, los astrocitos a los 15 DIV se transfectaron durante 24 horas con el cDNA de las formas silvestre, fosfodefactiva y fosfomimética de NRF2 fusionado al de la GFP, se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS durante 20 minutos y se incubaron con DAPI 30 µM durante 10 minutos.

Los cubreobjetos de ambos tipos celulares, se lavaron dos veces con PBS y una vez con agua estéril, tras lo cual se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *SlowFadeGold*® (Molecular Probes, Oregon, USA) para evitar la pérdida de fluorescencia. La visualización y adquisición de microfotografías se llevó a cabo utilizando una magnificación de 40X en un microscopio invertido *Nikon Eclipse Ti-E* (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes se procesaron con el software *Photoshop cs2*.

14. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DEL RNA

14.1. EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo con el kit comercial *Genelute™ Mammalian Total RNA Kit* (Sigma-Aldrich).

Las neuronas a los 6 DIV y los astrocitos a los 15 DIV se lisaron con una mezcla de β -mercaptoetanol:*Lysis Solution* en proporción 1:100 (v/v). Los lisados se filtraron con *Genelute Filtration Column* para eliminar los restos celulares y desechar el DNA, haciéndolos pasar por una columna con filtro y centrifugándolos a 16,000 x *g*. Posteriormente, se añadió un volumen equivalente de etanol al 70% en agua DEPC (Di-etil-piro-carbonato) libre de RNasas y se vortió hasta mezclar completamente. A continuación, se pasó la mezcla por *Genelute Binding Column*, donde se adherió el RNA. Se eliminó el filtrado y nos quedamos con la columna que se lavó una vez con *Wash Solution 1*.

Una vez separado el RNA, se trató la columna con 100 U de DNasa I (*DNase I, RNase-free*, Roche) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un tampón compuesto por Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM y CaCl₂ 10 mM; pH 7.9. Tras la incubación, para eliminar todos los restos de DNA y evitar la amplificación de DNA genómico, se lavaron las columnas tres veces, una con *Wash Solution 1* y otra con *Wash Solution 2 Concentrate/ethanol*, que nos permitió un secado completo de la columna. Finalmente, se eluyó en un eppendorf nuevo el contenido de la columna con 50 μ l de *Elution Solution* mediante centrifugado a 16,000 x *g* durante 1 minuto.

El RNA purificado quedó en el filtrado y se midió la concentración con un espectrofotómetro *UV-Vis Nanodrop 2000* (Thermo Scientific). El ratio de absorbancia de 260 frente a 280 nm (A_{260} / A_{280}), que determina la pureza del RNA, fue de 1.8 - 2. Para corroborar la calidad e integridad del RNA extraído, se corrió un gel de agarosa al 0.8% y se observaron dos bandas características a 5.3 y 2.0 Kb correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S, respectivamente (ver **Figura IX**).

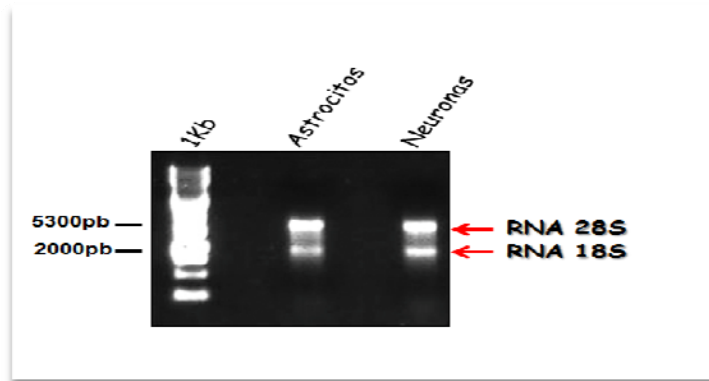


Figura IX. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del RNA total purificado. En esta figura se observa claramente dos bandas características a 5.3 y 2.0 Kb correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S que verifican una buena calidad e integridad del RNA.

14.2. RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La retrotranscripción del RNA se realizó mediante el uso de cebadores aleatorios (“random primers”) y oligo dT (DNA sintético de 15 nucleótidos con base timina complementario a la terminación poliadenilada presente en el mRNA).

Se incubó, en primer lugar, 1 µg de RNA total extraído junto con 0,5 µg de oligo dT en 10 µl de agua DEPC durante 10 minutos a 70°C. A continuación, se dejó 1 minuto en hielo y se incubó, en segundo lugar, con 1 µl de la transcriptasa reversa (*AMV Reverse Transcriptase* 40 U / µl, Promega), 2 µl del correspondiente tampón 10X (suplementado con MgCl₂ 25 mM), 1 µl de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs 10 Mm, Roche), y 1 µl de un inhibidor de RNasas, en un volumen final de 20 µl, durante 50 minutos a 48°C.

14.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) SEMICUANTITATIVA

Para las reacciones de PCR semicuantitativas se utilizó el kit comercial *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD.* (Applied Biosystems). El producto de la retrotranscripción (cDNA 10-100 ng) se incubó en 50 µl de mezcla de reacción (*PCR Master MIX*) que contenía: 1.25 U de DNA polimerasa *Taq Gold*, dNTPs (dATP 200 mM, dCTP 200 mM, dGTP 200 mM y dTTP 200 mM), en un tampón *PCR Gold Buffer 10X* (Tris-HCL 150 mM, KCl 500 mM, pH 8.0). Posteriormente, se añadió 1 µl de los oligonucleótidos (Eurofins Biopharma, Barcelona, España) sentido y antisentido (*primers forward* y *reverse*) de cada uno de los genes de interés (ver **Tabla VIII**) a una concentración final de 1 µM.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 28 ó 35 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 55°C (anillamiento de oligonucleótidos) y 30 segundos a 72°C (elongación) y una extensión final durante 10 minutos a 72°C. En ningún caso se detectó banda por PCR en aquellas muestras sin transcriptasa reversa, utilizadas como controles negativos para corroborar que no teníamos contaminación de DNA genómico.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5' → 3'	AMPLICÓN	T _m (T° Melting)
Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor-2)	Forward 5'-GCAGGACATGGATTTGATTGA-3'	73pb	55.9°C
	Reverse 5'-GTCAAACACTTCTCGACTTAC-3'		55.9°C
CuI3 (Cullina-3)	Forward 5'-GGAGCAATAAGAAATGCTTGCCA-3'	83pb	58.9°C
	Reverse 5'-GGAGCCTCAAAATCTTCCTCATA-3'		58.9°C
Ho-1 (Hemooxigenasa-1)	Forward 5'-AGCACAGGGTGACAGAAGAG-3'	106pb	59.4°C
	Reverse 5'-GAGGGACTCTGGTCTTTGTG-3'		59.4°C
Gc/c (glutamato cisteina ligasa, subunidad catalítica)	Forward 5'-GGCACAAGGACGTGCTCAAGT-3'	118pb	61.8°C
	Reverse 5'-TGCAGAGTTTCAAGAACATCG-3'		55.9°C
Nqo-1 (NADPH deshidrogenasa quinona-1)	Forward 5'-GGGGACATGAACGTCATTCTCT-3'	68pb	56.1°C
	Reverse 5'-AAGACCTGGAAGCCACAGAAGC-3'		59.1°C
Cop9s5 (subunidad 5 signalosoma)	Forward 5'-ACCAGCAGTTTCAGGAACCATTT-3'	82pb	57.1°C
	Reverse 5'-GCGCCAAGATTCACCTTCCCT-3'		59.5°C
Cand1 (Cullin-Associated And Neddylation-Dissociated)	Forward 5'-GCTTTCTGACAAGGAGCAGCTTC-3'	84pb	58.5°C
	Reverse 5'-CCACTGGAAGCTGGAGGGAGTT-3'		60.2°C
Gapdh (Gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa) (Housekeeping)	Forward 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	120pb	54.8°C
	Reverse 5'-CCTTCCAGATGCCAAAGTT-3'		55.4°C

Tabla VIII. Oligonucleótidos empleados en esta memoria para RT-PCR semicuantitativa y a tiempo real (q-PCR). En esta tabla se muestran todos los genes analizados por RT-PCR y qPCR, así como las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la especie de *Rattus norvegicus*, el tamaño del amplicón que generan y su temperatura de Melting, importante para determinar la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos al cDNA.

Posteriormente, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (Seakem®, Lonza) como se describe en la **Sección 14.5**.

14.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (qPCR)

Mediante esta técnica analizamos la expresión de múltiples genes (ver **Tabla VIII**) que cuantificamos de forma relativa respecto a un control interno (*Housekeeping*) que fue la GAPDH.

En la PCR a tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, gracias a la emisión de fluorescencia por parte del *SYBR Green* (Fermentas Life Sciences), fluorocromo que se intercala entre las hebras de DNA. Al intercalarse solamente en el DNA bicatenario, la fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado (amplicón).

Antes de analizar la expresión de los diferentes genes, se puso a punto la concentración de cada oligonucleótido y se calcularon las eficiencias de amplificación de los mismos utilizando diluciones seriadas de RNA (ver **Tabla IX**). Este paso es de gran importancia para poder comparar la expresión de los diferentes genes con respecto al control interno.

OLIGONUCLEÓTIDO	CONCENTRACIÓN	EFICIENCIA
NRF2	0.4 μ M	94.91%
CUL3	0.3 μ M	90.2%
HO-1	0.4 μ M	102%
GCL _c	0.4 μ M	87.59%
NQO-1	0.3 μ M	87.27%
COPS5	0.3 μ M	88.55%
CAND1	0.3 μ M	100.2%
GAPDH (Housekeeping)	0.3 μ M	89.74%

Tabla IX. Optimización de la concentración de oligonucleótidos. En esta tabla se muestran las concentraciones optimizadas para la qPCR de cada uno de los oligonucleótidos empleados en esta memoria junto con el cálculo de las eficiencias para cada gen de estudio.

Para la realización de la qPCR se utilizó el kit comercial *Power SYBR® Green RNA-to-C_t[™] 1-Step Kit* (Applied Biosystems), que consiste en realizar la retrotranscripción y la PCR en un único paso. Una vez comprobada la especificidad de los oligonucleótidos por PCR semicuantitativa, se procedió a realizar la qPCR para cuantificar los niveles de mRNA de cada uno de los genes de estudio en los diferentes tipos de células. Se partió de 200 ng de RNA y el volumen final por reacción fue de 20 µl (*RT Enzyme Mix 125X*, *RT-PCR Mix 2X*, *forward* y *reverse* oligonucleótidos y agua libre de nucleasas). Los oligonucleótidos empleados fueron los mismos que en el caso de la PCR semicuantitativa y que se detallan en la **Tabla VIII**. Todas las reacciones se hicieron por triplicado utilizando el termociclador *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf).

El perfil de cada reacción fue el siguiente: un ciclo de 30 minutos a 48°C (etapa de retrotranscripción), un ciclo de 10 minutos a 95°C (activación de la enzima *Hot Start Taq* DNA polimerasa), 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 55°C (anillamiento y elongación).

El valor que se obtuvo por cada reacción fue el Ct (*threshold cycle*), que es el ciclo en el que la fluorescencia emitida por el SYBR Green es detectable dentro de la fase lineal (ver **Figura X**). Se obtiene así el Ct para cada uno de los genes de estudio y para el *housekeeping*. El incremento de Ct (Δ Ct) es la diferencia entre el Ct de cada gen y el Ct de la GAPDH, que se tomó como referencia o control interno.

La relación en el número de copias que se obtiene al final de una reacción optimizada es de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que es igual a $2^{-(\Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{calibrador})}$ e igual a $2^{-[(Ct_{muestra} - Ct_{GAPDH}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{GAPDH})]}$. Consideramos calibrador la condición sobre la que se compara la expresión y sobre la que se relativiza los resultados dándole el valor de 1. Niveles de expresión igual a 1 indican que la muestra problema presenta la misma expresión de un determinado gen que el control. Niveles >1 indican que hay un incremento de expresión con respecto al control, y niveles <1 indican que la expresión disminuye con respecto al control.

Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias de expresión (*fold* o nº de veces de expresión) entre la muestra problema y un calibrador o control (cuantificación relativa).

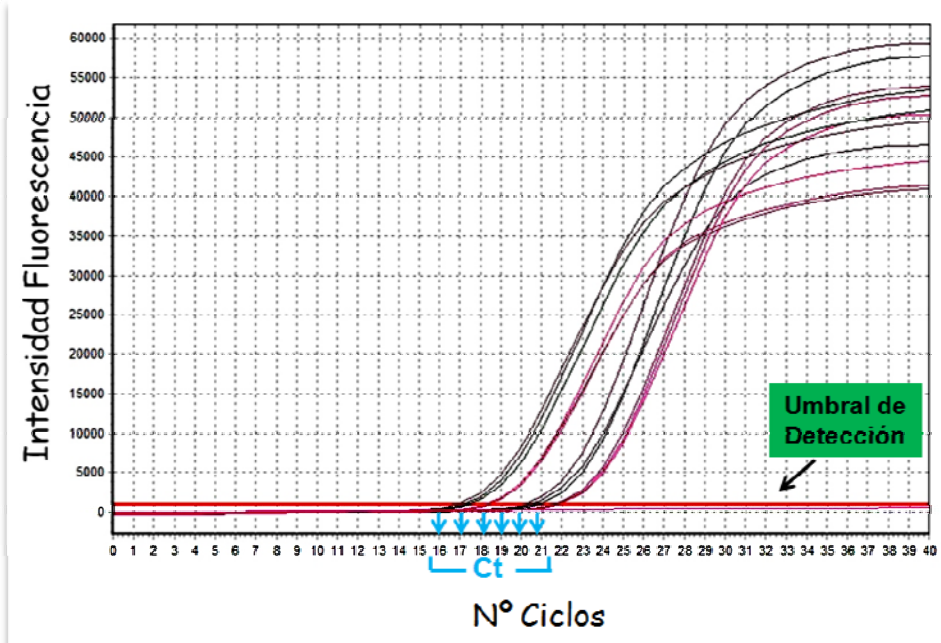


Figura X. Registro de un ensayo de qPCR. En esta figura se observan los picos de fluorescencia emitida por el SYBR Green en diferentes muestras de estudio. El Ct es el primer ciclo de la PCR en el que la fluorescencia emitida por el SYBR Green es detectable en la fase lineal (supera el umbral de detección). El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de RNA o DNA de partida.

14.5. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES HORIZONTALES DE AGAROSA

Esta técnica se utilizó tanto para separar los productos de PCR amplificados, como para separar los productos de la digestión realizada con enzimas de restricción y así poder distinguir diferentes fragmentos de DNA en función de su tamaño.

Antes de la electroforesis, se añadió a las muestras tampón de carga (azul de bromofenol al 0.25%, xileno cianol al 0.25% y ficol al 15%). La electroforesis

se realizó en geles de agarosa inmersos en una solución TAE 1X (TAE 50X; Tris-acético 2 M, EDTA 0.05 M, acético glacial al 10%, pH 8.0), a voltaje constante de 90V durante 1 hora. Para calcular el tamaño de las bandas obtenidas, se incluyeron en los geles el marcador de peso molecular de 1 Kb *Ladder Marker* (Biotools, Madrid, España), que presenta un patrón de bandas que oscila de 0.25 a 10 Kb, o el marcador *DNA Weight Marker XIII (50 pb ladder, Roche)* cuyo patrón de bandas oscila de 50 a 2642 pb.

Para la realización de los geles se utilizó agarosa (*Seakem® LE Agarose*, Lonza) de baja electroendosmosis (menor número de grupos ácidos cargados a pH básico), para incrementar la movilidad electroforética del DNA, a una concentración variable 0.8 - 2% en función del tamaño de la banda de interés.

A los geles se les añadió *Midori Green DNA Stain* (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Alemania), que es una sonda fluorescente que se excita a 350 nm emitiendo luz verde a 540 nm cuando se intercala en la doble hebra del DNA. Para la visualización de las bandas se expuso el gel a un transiluminador de luz UV (Bio-Rad) y, para el posterior análisis de las imágenes, se utilizó el sistema digital *Gel Doc* (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

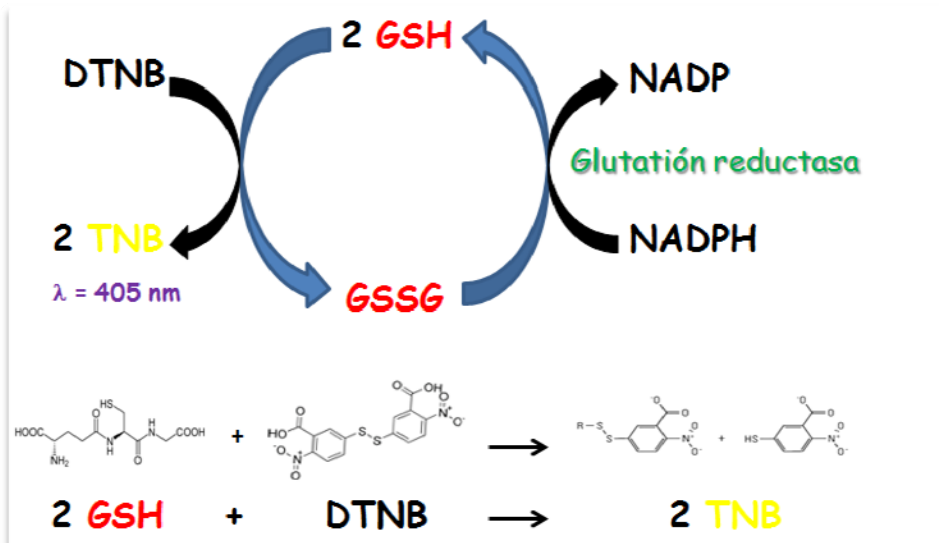
15. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN

Para determinar la concentración de glutatión, las células se lavaron con PBS frío y se recolectaron rápidamente con ácido sulfosalicílico (ASS) al 1% (p/v) con la ayuda de un raspador. Los lisados celulares se centrifugaron a 13.000 x *g* durante 5 min y el contenido de glutatión total, que es igual a la suma del glutatión reducido más dos veces el oxidado ($GS_x = GSH + 2GSSG$), se analizó en los sobrenadantes según el método descrito por [Tietze, 1969]. Este método está basado en la oxidación del GSH (glutatión reducido) a expensas del DTNB (5,5'-ditio-bis-ácido 2-nitrobenzoico; Sigma-Aldrich), que es reducido a TNB ($\lambda_{max}=405$ nm). El recién formado GSSG (glutatión oxidado) es regenerado a GSH mediante la actividad de la glutatión reductasa, que

requiere como cofactor NADPH (H^+). Ésta es, por tanto, una reacción cíclica (ver **Esquema VI**), cuya velocidad es directamente proporcional a la concentración de glutatión total (GSx).

Esta determinación se realizó en placas de 96 pocillos donde se mezclaron 10 μ l de muestra, 90 μ l de H_2O y 100 μ l de la mezcla de reacción (EDTA 1 mM, DTNB 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.

Paralelamente, se llevó a cabo una recta patrón a partir de soluciones estándar de GSSG de concentraciones de 0 a 50 μ M. La concentración de GSx (nmol / mg proteína) se calculó a partir de las pendientes obtenidas en las muestras, extrapolándolas a las obtenidas en la recta patrón.



Esquema VI. Determinación enzimática de GSx. La reducción del DTNB paralela a la oxidación del glutatión permite determinar su concentración a 405 nm. Todo el glutatión oxidado (GSSG) es de nuevo reducido a GSH por la glutatión reductasa usando como cofactor el NADPH.

16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS KINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS

16.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD KINÁSICA CDK5

CDK5 se aisló de los astrocitos mediante inmunoprecipitación, como se describe en la **Sección 9.7**. Tras lavar 5 veces con tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 1%, pH 7.6 y suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa), el inmunoprecipitado se resuspendió en 80 μ l de dicho tampón. A $\frac{1}{4}$ del volumen se le añadió tampón de carga, y se utilizó como control de carga de CDK5.

El resto del inmunoprecipitado se lavó 2 veces con 500 μ l de tampón kinasa (HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasa, pH 7.5). Se aspiró todo el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 25 μ l de tampón kinasa en presencia de ATP 50 μ M, 2 μ Ci de [γ - ^{32}P]-ATP y de histona H1 (1 mg/ml; Calbiochem), que se utilizó como sustrato de la reacción [Wang, *et al.*, 2003]. A continuación, se incubó a 30°C durante 30 minutos en agitación (*Thermomixer*, Eppendorf).

Finalmente, la reacción se paró añadiendo tampón de carga e hirviendo las muestras a 95°C, durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (ver **Sección 9.3**) y, a continuación, el gel se tiñó con azul de Coomassie y se secó a 80°C durante 1 hora con un secador de geles *Gel Dryer* (Bio-Rad).

La incorporación de ^{32}P se visualizó mediante la exposición del gel radiactivo a películas de autorradiografía (*BioMax XAR film*, Kodak) o a una placa de fósforo fotoestimulable (PSP), también conocida como placa de imagen (*IP: Imaging Plate*) o placa radioluminiscente. Ésta se coloca encima del gel radiactivo durante 1 noche en oscuridad (*cassete*) y, al día siguiente, se introduce en un scanner de alta definición *image plate* o *phosphorimager* (*Personal Molecular Imager™ PMI System*, Bio-Rad), que produce una imagen digital que se analiza con el *software Gel Doc* (Bio-Rad).

16.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD KINÁSICA DE CDK5 SOBRE NRF2

Las proteínas de fusión GST-NRF2 (silvestre y fosfodefactiva), purificadas a partir de *E. coli* (ver **Sección 9.8**), se utilizaron como sustratos de la reacción catalizada por CDK5. Así, 10 µg de las proteínas de fusión se lavaron 2 veces con 500 µl de tampón kinasa y se resuspendieron en el mismo tampón (volumen = n° reacciones x 10 + 15 µl) que contenía, además, ATP 50 µM, 2 µCi de [γ -³²P]-ATP y 100 ng de p35/CDK5 (Upstate, Temecula, CA, EE.UU). La mezcla se incubó a 30°C durante 30 minutos y la reacción se detuvo con tampón de carga e hirviendo las muestras a 95°C durante 5 minutos. A continuación, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Coomassie (control de carga) y se secó a 80°C durante 1 hora con un secador de geles. Finalmente, la incorporación de ³²P se visualizó mediante la exposición del gel radiactivo a películas de autorradiografía (*BioMax XAR film* de Kodak) o a una placa de imagen que posteriormente se escaneó con un *phosphorimager*.

17. ENSAYO REPORTERO DE LA LUCIFERASA

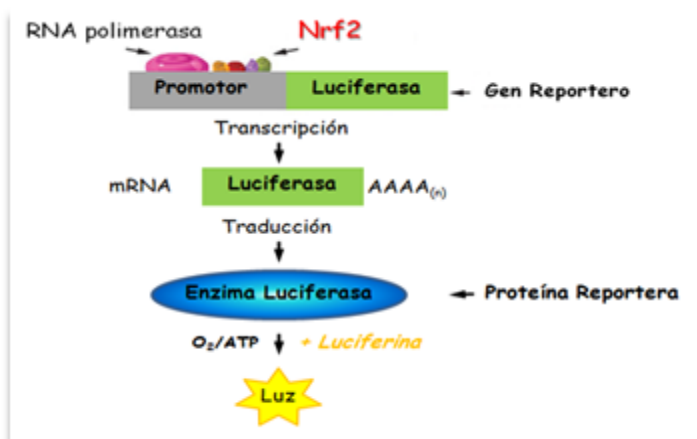
Este ensayo consiste en utilizar el cDNA de la luciferasa de luciérnaga contenido en el plásmido pGL4.12 [luc2CP] (ver **Sección 3.4**) como gen reportero para monitorizar la actividad promotora de ARE (*Antioxidant Response Element*) en el control de la expresión de los genes diana antioxidantes de NRF2, tales como la *Ho-1*, *Gclc* o *Nqo-1*.

Para ello, primero se fusionó la secuencia consenso del promotor ARE en el extremo N-terminal del gen reportero de la luciferasa en el plásmido pGL4.12 [luc2CP] como se muestra en la **Sección 3.4**.

Una vez obtenida la construcción, las neuronas se sembraron en placas de 12 pocillos (3.14 cm² cada pocillo) a una densidad de 250.000 células / cm². A los 5 DIV se transfectaron con la construcción pGL4.12 [luc2CP]-ARE y con el plásmido vacío sin ARE (control negativo), utilizando el reactivo catiónico

Lipofectamine LTX con *Plus Reagent*TM. Al día siguiente, se lavaron las células 2 veces con 1 ml de PBS. En el segundo lavado se despegaron las células en telilla y se trasvasaron a un *ependorf*.

A continuación, se centrifugaron a 700 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Los *pellets* se lisaron con 70 μ l de tampón de lisis 1X (*Reporter Lysis Buffer-RLB 5X*, Promega). Se mezclaron bien con vórtex y se realizó un ciclo de congelación/descongelación rápido con nitrógeno líquido para favorecer el lisado celular y evitar la pérdida de actividad luciferásica. Finalmente, se centrifugaron a 12,000 x g durante 3 minutos a 4°C y se recopilaron los sobrenadantes para realizar el ensayo. Para cada reacción se utilizaron 20 μ l de lisado celular y 100 μ l de mezcla de reacción (*Luciferase Assay Reagent*, Promega), que contiene el sustrato de la luciferasa, luciferina. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con, al menos, triplicados por cada condición, en un luminómetro de placa *Variokan Flash* (Thermo Fischer, Vantaa, Finlandia). Se analizó la intensidad de luz emitida por la luciferasa, que en nuestro estudio era directamente proporcional a la actividad del promotor ARE (ver **Esquema VII**). Este ensayo nos permitió determinar, de forma indirecta en las neuronas corticales, la actividad transcripcional de NRF2 tras su unión al promotor ARE.



Esquema VII. Fundamento del ensayo reportero de la luciferasa. En este esquema se puede observar como la intensidad de luz emitida por la reacción de la luciferasa es directamente proporcional a la actividad transcripcional del promotor ARE y, por tanto, es un método indirecto para analizar la respuesta antioxidante mediada por NRF2, tras su unión a ARE.

18. CELL SORTING DE ASTROCITOS Y NEURONAS

Las neuronas corticales en cultivo primario se sembraron en placas de 145 cm² (Nunc; Roskilde, Dinamarca). A los 6DIV las células se trataron con el inhibidor del proteasoma MG-132 (Calbiochem) durante 2 horas, y las células control con el correspondiente vehículo (DMSO; Sigma). Posteriormente, se tripsinizaron suavemente con EDTA tetrasódico 1mM en PBS (pH 7.4) y, tras centrifugarlas a 500 x *g* durante 5 minutos, se incubaron con el anticuerpo anti-integrina β 5 (marcador específico de la membrana plasmática de los astrocitos) [Foo, 2013] en PBS a 4°C durante toda la noche en agitación orbital y a la dilución que se muestra en la **Tabla VII**. Al día siguiente, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón, conjugado con el fluoróforo Alexa 488, en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación orbital y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se lavaron 2 veces y se resuspendieron en 500 μ l de PBS. Mediante citometría de flujo con *cell sorter FACSAria™ III* (BD Biosciences; Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca), se separaron las células positivas para integrina β 5 (astrocitos y células gliales) de las células integrina β 5 negativas (neuronas), como se muestra en la **Figura XI**. Tras la separación de las dos subpoblaciones celulares, se centrifugaron a 500 x *g* y los *pellets* se lisaron en tampón RIPA para su posterior análisis por Western Blot.

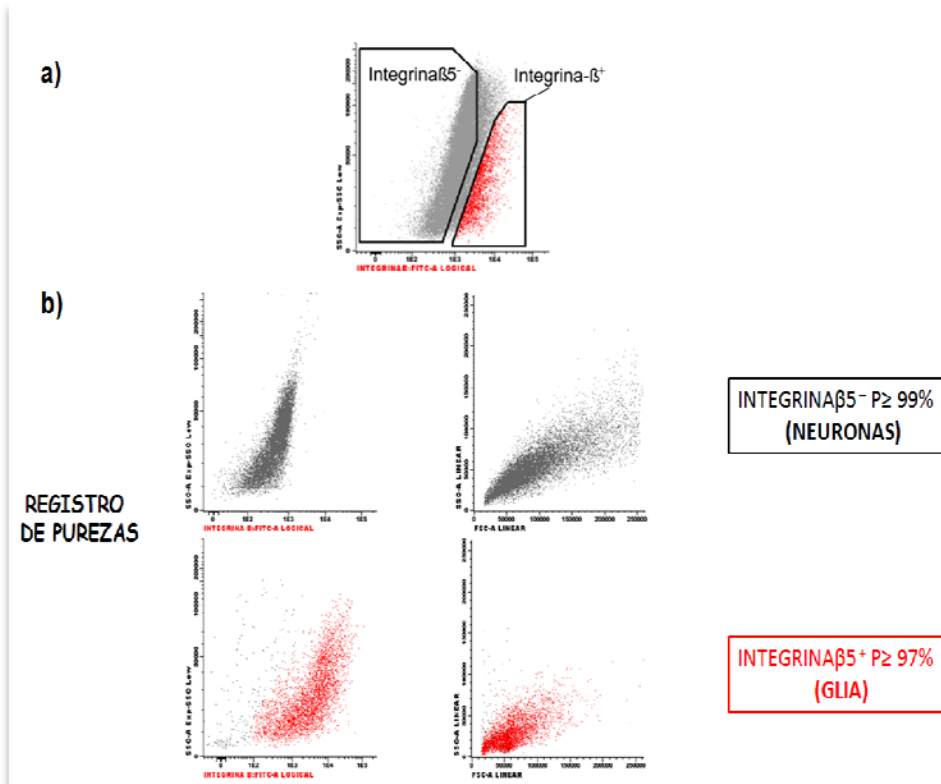


Figura XI: Separación de astrocitos y neuronas mediante Cell Sorting. a) En estos registros se observa la separación realizada entre las células integrina β 5⁻, correspondientes a las neuronas (en negro) y las células integrina β 5⁺, correspondientes a los astrocitos (en rojo). b) Tras la separación de las dos subpoblaciones se realizaron los registros de pureza de cada una de ellas para corroborar la eficiencia del proceso.

19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las determinaciones en células en cultivo fueron realizadas, al menos, por triplicado. Los valores se expresaron como medias \pm S.E.M. (error estándar de la media) en, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test de Bonferroni (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.

A microscopic image showing numerous green fluorescent cells, likely neurons or fibroblasts, against a dark background. The cells are scattered across the frame, with some showing bright green spots and others appearing as faint green outlines. The overall appearance is that of a dense population of cells in culture.

Resultados

" Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad "

Karl Popper

1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ANTIOXIDANTE NRF2-KEAP1-CUL3 EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Para entender el mecanismo molecular responsable de la baja capacidad antioxidante de las neuronas, cuando se compara con la de los astrocitos, se analizó mediante RT-qPCR la abundancia del mRNA de *Nrf2*. Este factor de transcripción es el responsable de coordinar transcripcionalmente la maquinaria antioxidante celular frente al estrés oxidativo y nitrosativo. Como se muestra en la **Figura 1a**, los niveles del mRNA de *Nrf2* fueron ~1600 veces más elevados en los astrocitos que en las neuronas de corteza de rata. En coherencia con estos resultados los análisis mediante Western Blot revelaron que la abundancia de la proteína NRF2 era considerablemente más baja en las neuronas que en los astrocitos (**Figura 1b**). Sin embargo, los niveles de las proteínas CUL3 y KEAP1, encargadas de la poliubiquitinación de NRF2 para su posterior degradación en el proteasoma, eran notablemente más altos en las neuronas que en los astrocitos.

Analizando también los niveles del mRNA de *Cul3* mediante RT-qPCR en ambos tipos celulares, se evidenció un incremento de un ~ 30% en las neuronas en relación a los astrocitos (**Figura 1c**), explicando, probablemente, la baja abundancia de la proteína CUL3 en los astrocitos. Estos resultados sugieren que la vía de degradación de NRF2 en las neuronas está claramente acentuada en relación con la de los astrocitos, afectando a la estabilidad y a la vida media de la proteína. Este hecho podría dar cuenta de la reducida capacidad antioxidante que presentan las neuronas si la comparamos con la de los astrocitos.

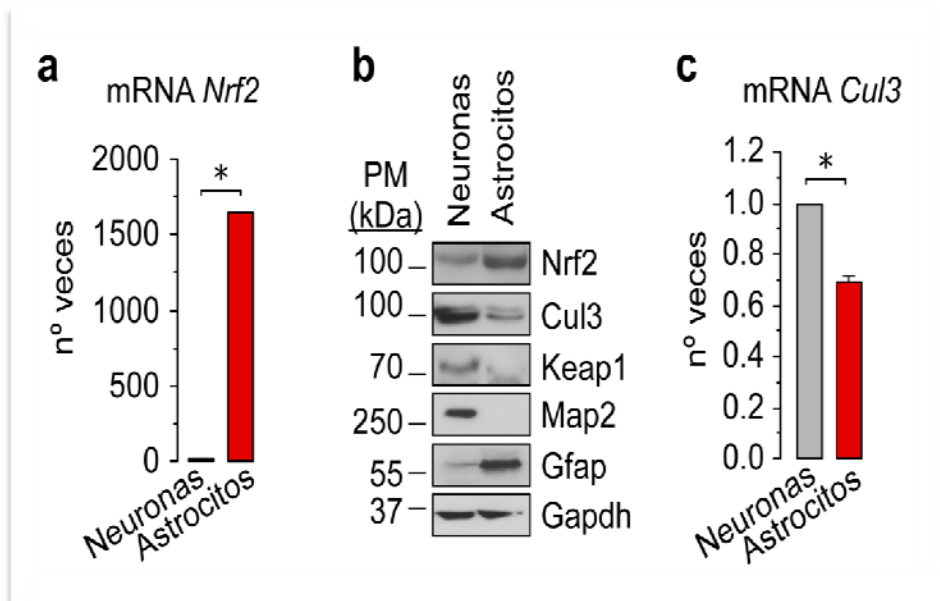


Figura 1. Expresión diferencial de NRF2, KEAP1 y CUL3 en neuronas y astrocitos. (a) Análisis mediante qPCR de la abundancia relativa del mRNA de *Nrf2* en neuronas y astrocitos primarios corticales de rata. El mRNA de la *Gapdh* se usó como housekeeping o gen de referencia para la normalización de los resultados, y los datos de los astrocitos se expresaron como un cambio en el número de veces de expresión del transcrito, relativo a la expresión en neuronas. Los resultados revelaron un nivel de expresión del mRNA de *Nrf2* de ~1600 veces más alto en los astrocitos en comparación con las neuronas. (b) El análisis mediante Western blot indicó una menor abundancia de la proteína NRF2 y una mayor abundancia de las proteínas CUL3 y KEAP1 en las neuronas cuando se comparó con los astrocitos. Los niveles de las proteínas MAP2 y GFAP indicaron la pureza de los cultivos de neuronas y astrocitos, respectivamente. La GAPDH se utilizó como control de carga. (c) Los niveles del mRNA de *Cul3* fueron ~30% más bajos en astrocitos que en neuronas. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

2. EXPRESIÓN DE *Cop9s5* Y *Cand1* EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Puesto que el complejo KEAP1-CUL3-Rbx E3-ubiquitina ligasa está regulado post-traduccionalmente por ciclos de neddilación/deneddilación y ciclos de ensamblaje/desensamblaje a través del complejo multiproteico denominado signalosoma (CSN) y del factor de ensamblaje CAND1,

respectivamente, se analizaron, por RT-qPCR, los niveles de mRNA de la subunidad catalítica del CSN (*Cop9s5*) y de *Cand1* en neuronas y astrocitos.

Dado que los niveles de mRNA de *Cop9s5* y *Cand1* fueron similares en ambos tipos celulares (**Figura 2a, b**), sería poco probable que una expresión diferencial del signalosoma, explicase las diferencias existentes en los niveles de mRNA y de proteína de CUL3 entre las neuronas y los astrocitos, observados anteriormente (**Figura 1b, c**).

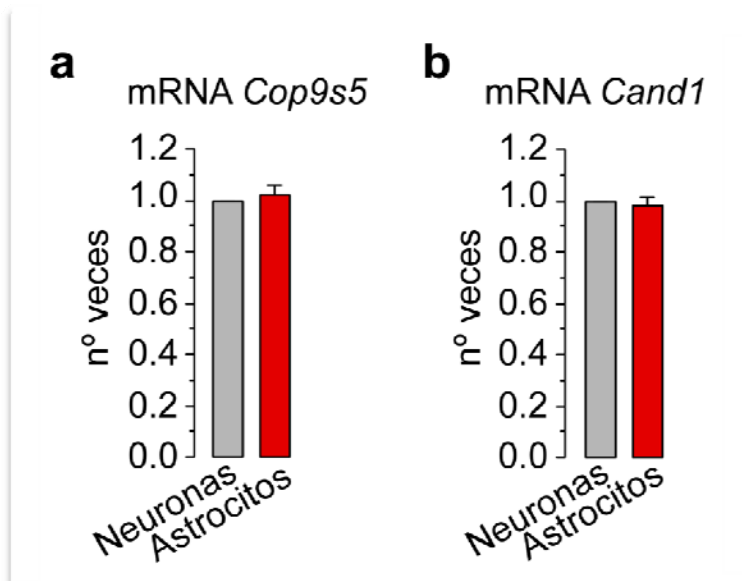


Figura 2. Expresión similar de *Cop9s5* y *Cand1* en neuronas y astrocitos. (a) Análisis mediante qPCR de la abundancia relativa de mRNA de *Cop9s5* en neuronas y astrocitos. Los niveles de mRNA de *Cop9s5* en astrocitos son similares a los de las neuronas. (b) Los niveles de mRNA de *Cand1* en astrocitos son semejantes a los encontrados en las neuronas. El mRNA de la *Gapdh* se usó como housekeeping o gen de referencia para la normalización de los resultados. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

3. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE CUL3 SOBRE LA ESTABILIZACIÓN DE NRF2 EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Para investigar si los altos niveles observados de CUL3 podrían explicar la escasa concentración de NRF2 en las neuronas, se diseñó un RNA de interferencia frente al gen *Cul3* de *Rattus norvegicus* (*siCul3*). La transfección de neuronas y astrocitos primarios con el *siCul3* disminuyó sustancialmente la abundancia de la proteína después de 3 días, conduciendo a una estabilización y acumulación de NRF2, tanto en los astrocitos (**Figura 3a**) como en las neuronas (**Figura 3b**). Estos resultados sugieren que, a pesar de los bajos niveles de mRNA de *Nrf2*, las neuronas son capaces de traducir la proteína y posteriormente degradarla mediante la actividad E3-ubiquitina ligasa de CUL3.

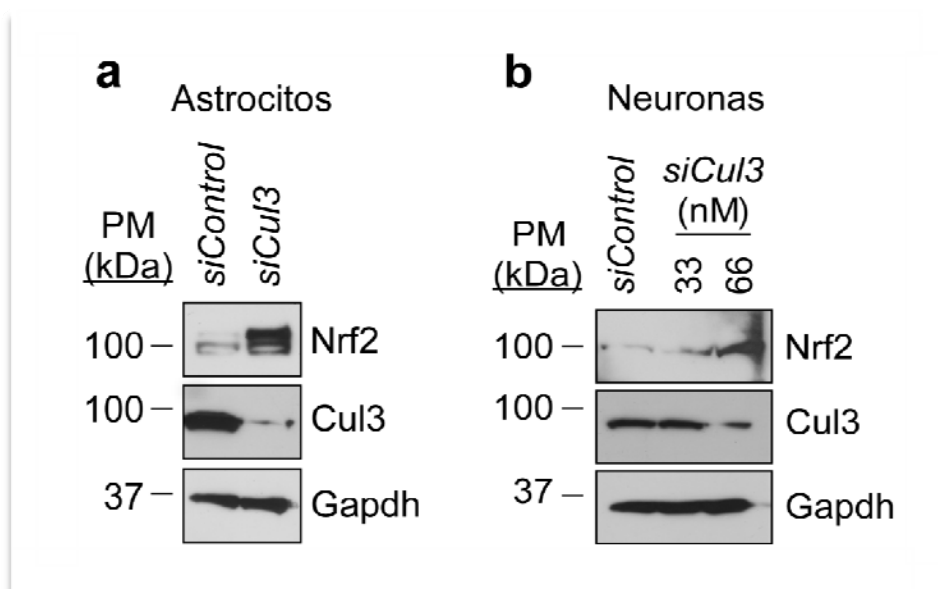


Figura 3. Efecto del silenciamiento de Cul3 sobre la estabilización de NRF2 en neuronas y astrocitos. (a) El uso de un RNA de interferencia frente al gen *Cul3* (*siCul3*, 66 nM) durante 72 horas, condujo a la disminución de la proteína CUL3 y a la acumulación de NRF2 en los astrocitos. **(b)** El tratamiento con *siCul3* de manera dosis-dependiente (33-66 nM), incrementó la abundancia de NRF2 en las neuronas. En ambos casos, se utilizó como *siControl* (66 nM), un RNA de interferencia frente al gen de la luciferasa. La GAPDH se usó como control de carga.

4. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE DOS DE LOS GENES DIANA DE NRF2, *GCLC* Y *HO-1*, EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Para dilucidar si la modulación de NRF2 podría dar cuenta de la expresión de los genes antioxidantes regulados por este factor de transcripción, se analizaron, mediante RT-qPCR, los niveles de mRNA de dos de los genes diana de NRF2, la subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa (*Gclc*) y la hemo-oxigenasa-1 (*Ho-1*). Los niveles de expresión relativa de la *Gclc* y de la *Ho-1*, utilizando como *housekeeping* el mRNA de la *Gapdh*, fueron de ~6 a 40 veces más bajos, respectivamente, en las neuronas que en los astrocitos en condiciones basales (**Figura 4a, b**). Estos resultados indican que la respuesta antioxidante de los astrocitos es sustancialmente más robusta que la de las neuronas.

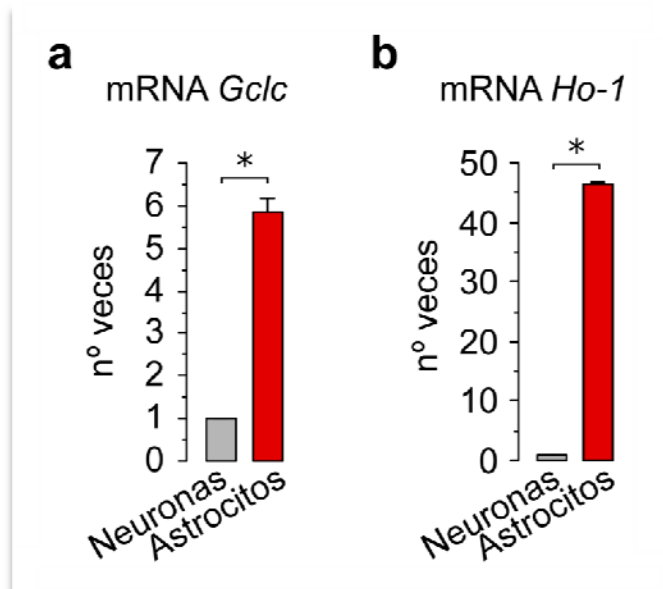


Figura 4. Expresión diferencial de los genes antioxidantes *Gclc* y *Ho-1* en neuronas y astroцитos. El análisis mediante qPCR de dos de los genes diana de NRF2, la subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa (a) y la hemo-oxigenasa-1 (b), reveló unos niveles de expresión de 6-40 veces más bajos, respectivamente, en las neuronas en relación a los astroцитos. El mRNA de la *Gapdh* se usó como *housekeeping* o gen de referencia para normalizar los datos. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

El silenciamiento de *Cul3* en las neuronas indujo una acumulación de NRF2 alcanzando niveles similares a los encontrados en los astrocitos en condiciones basales. (Figura 5a). A pesar de esta acumulación de NRF2, los niveles de mRNA de los genes antioxidantes, *Ho-1* y *Gclc*, no cambiaron, manteniéndose en torno al 10-20% respectivamente, a los encontrados en los astrocitos (Figura 5b). Por lo tanto, se puede deducir que la respuesta antioxidante de las neuronas, aún silenciando *Cul3*, es insuficiente para alcanzar la de los astrocitos.

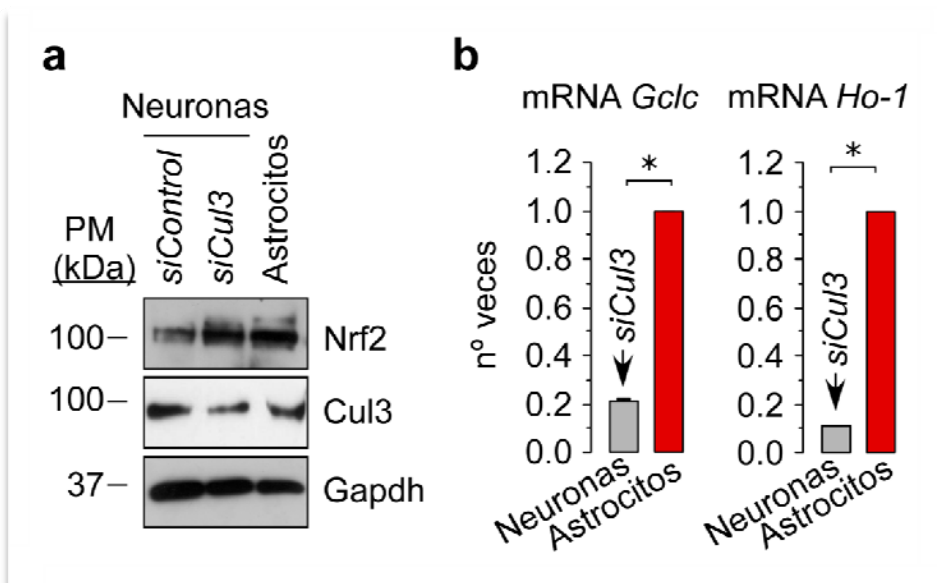


Figura 5. El efecto del silenciamiento de *Cul3* en las neuronas es insuficiente para alcanzar la respuesta antioxidante de los astrocitos. (a) El siCul3 (66 nM) en las neuronas incrementó la proteína NRF2 a niveles similares a aquellos encontrados en los astrocitos. La GAPDH se usó como control de carga. **(b)** Los niveles del mRNA de los genes antioxidantes *Ho-1* y *Gclc* en las neuronas silenciadas con siCul3 (66 nM) fueron de ~ 10-20% respectivamente, a los encontrados en astrocitos en estado basal. El mRNA de la *Gapdh* se usó como housekeeping o gen de referencia para normalizar los resultados de la qPCR. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n = 3$ experimentos independientes).

5. REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE NRF2 MEDIADA POR DEGRADACIÓN EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Con el fin de investigar si la proteína NRF2 en las neuronas es susceptible de regulación, se utilizó el inhibidor del proteasoma, MG-132. Tanto en astrocitos como en neuronas, la inhibición de la maquinaria de degradación de proteínas, durante 2 horas de tratamiento con MG-132, condujo a la estabilización y acumulación de NRF2 (**Figura 6a, b**).

Para confirmar este resultado, se transfectaron las neuronas con el cDNA de *Nrf2*, fusionado al de la proteína verde fluorescente (GFP). Usando el anticuerpo monoclonal anti-GFP, se observó, mediante Western Blot, la acumulación de la proteína de fusión NRF2-GFP tras el tratamiento con MG-132 (**Figura 6c**).

Por otro lado, realizando RT-qPCR, se observó que el tratamiento con MG-132 en neuronas no alteró los niveles del mRNA de *Nrf2*, a menos que estuviera presente el inhibidor de la transcripción Actinomicina D, que disminuyó el transcrito de *Nrf2* ~50% (**Figura 6d**). Sin embargo, la acumulación de la proteína NRF2 promovida por MG-132 no se vio alterada con la Actinomicina D (**Figura 6e**).

Estos resultados revelan que la abundancia de la proteína NRF2, normalmente muy baja en las neuronas en comparación con los astrocitos, es probablemente debida a una mayor tasa de desestabilización de la proteína. Por lo tanto, esta pequeña cantidad de NRF2 en las neuronas es claramente susceptible a regulación post-traducciona, tanto por el silenciamiento de *Cul3* como por la inhibición del proteasoma.

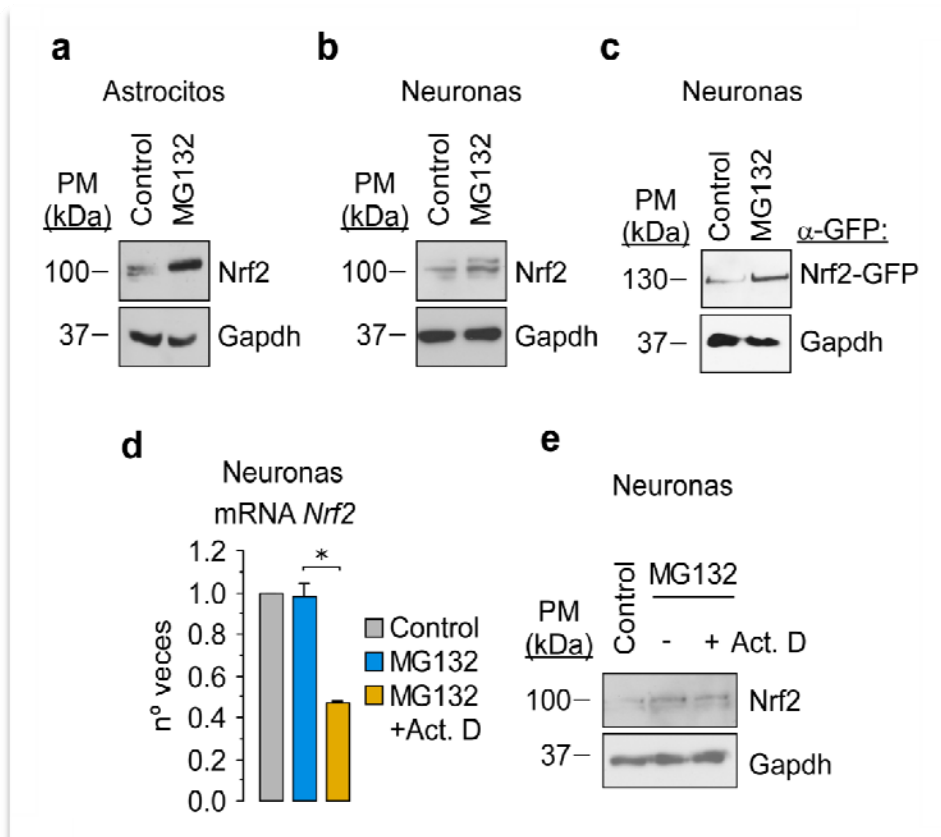


Figura 6. NRF2 está sujeto a una fuerte regulación post-traducciona por degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma. (a) El inhibidor del proteasoma, MG132 (20 μ M, 2 horas) incrementó la abundancia de la proteína NRF2 en los astrocitos. (b) El MG132 incrementó también la abundancia de NRF2 en las neuronas. (c) La transfección de las neuronas con el cDNA completo que codifica la proteína de fusión NRF2-GFP, seguida por el tratamiento con MG132, provocó la acumulación de la proteína de fusión NRF2-GFP. (d) El MG132 no incrementó los niveles del mRNA de NRF2 en las neuronas y el inhibidor transcripcional, actinomicina D (Act.D; 100 ng/ml) disminuyó los niveles del mRNA de NRF2. (e) La acumulación de la proteína NRF2 en neuronas, mediada por el MG132, no se vio alterada por la actinomicina D. En todos los casos, se usó la Gapdh como control de carga para los Western Blot y como housekeeping o gen de referencia para los análisis de qPCR. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n = 3$ experimentos independientes).

Asimismo, las neuronas incubadas previamente durante 2 horas con MG-132 también mostraron un incremento significativo de los niveles de los mRNA de tres de los genes diana de NRF2, *Gclc*, *Ho-1* y *Nqo-1*, aumentando de 1.5 a 2.5 veces con respecto a las neuronas en condiciones basales (Figura 7). Estos datos indican que la acumulación de NRF2 estimulada por la

inhibición del proteasoma, tiene un significado funcional añadido, ya que es capaz de reactivar la respuesta antioxidante neuronal.

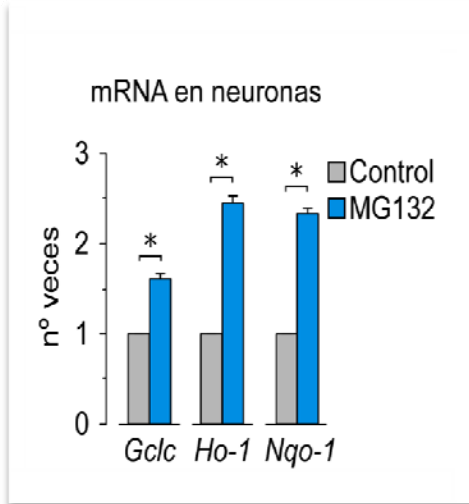


Figura 7. La acumulación de NRF2 mediada por la inhibición del proteasoma activa la respuesta antioxidante neuronal. La incubación de las neuronas con MG132 incrementó la expresión de tres de los genes antioxidantes regulados por NRF2, Gclc, Ho-1 y Nqo-1. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

6. DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DE NRF2 EN LAS NEURONAS.

Dado que las neuronas corticales en cultivo primario contienen, probablemente, trazas de astrocitos, y la abundancia de la proteína NRF2 es considerablemente mayor en los astrocitos que en las neuronas, nos preguntamos si la señal de NRF2 en los cultivos primarios neuronales podría deberse a la contribución de los astrocitos. Para abordar este asunto, primero se caracterizaron los cultivos primarios neuronales por citometría de flujo. Este análisis reveló un enriquecimiento del 96% de células MAP2⁺ (neuronas) y un 4% de células GFAP⁺ (astrocitos), como se muestra en el **Apartado 11 de Material y Métodos**. A continuación, se realizó el Western Blot con 50 μ g de extractos de proteínas obtenidos a partir de las neuronas tratadas previamente, o no, con MG-132, y se comparó la abundancia de NRF2 con la observada en los 2, 10 y 50 μ g de extractos de proteínas obtenidos a partir de astrocitos, tratados del mismo modo. Como se observa en la **Figura 8a**, NRF2 se expresó en los 50 μ g de neuronas pero no se detectó ni en los 2 ni en los 10 μ g de astrocitos (que representan un 4-20% respectivamente de éstos en

los cultivos de neuronas. Por lo tanto, una contribución del 4% de astrocitos en los cultivos neuronales no da cuenta de la señal de la proteína NRF2 en las neuronas.

Para refinar la contribución astrocitaria, en cuanto a la abundancia de NRF2 en los cultivos neuronales, se realizó Western Blot en el que se comparó la intensidad de la banda de NRF2 en 50 µg de extractos proteicos de neuronas con la obtenida en 1, 2 y 4 µg de extractos proteicos de astrocitos. Como se muestra en la **Figura 8b**, no se detectó banda de NRF2 en astrocitos no tratados a ninguna de las concentraciones de extracto de proteína cargada, mientras que las neuronas mostraron una clara banda de NRF2. Curiosamente, la incubación de los astrocitos con MG-132 no fue suficiente para revelar la aparición de NRF2 en 2 µg de astrocitos (**Figura 8b**). Por lo tanto, una contaminación de los astrocitos del 4% no justifica la abundancia de la proteína NRF2 que se encuentra en las neuronas en cultivo primario, ya sea en situación basal o después del tratamiento con MG-132.

Para corroborar estos resultados, se purificaron neuronas por *Cell Sorting* mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo contra la integrina-β5, que es un marcador específico de la membrana plasmática de los astrocitos (**Apartado 18 de Material y Métodos**). El análisis de las células integrina-β5⁻, es decir, de la fracción de neuronas libre de astrocitos, mediante Western Blot, reveló una fracción celular específica neuronal, que expresaba βIII-tubulina, en la que la proteína NRF2 se vio incrementada con el tratamiento de MG-132 (**Figura 8c**). Estos resultados confirman la existencia de NRF2 en las neuronas, a pesar de la contaminación de los astrocitos en los cultivos primarios neuronales.

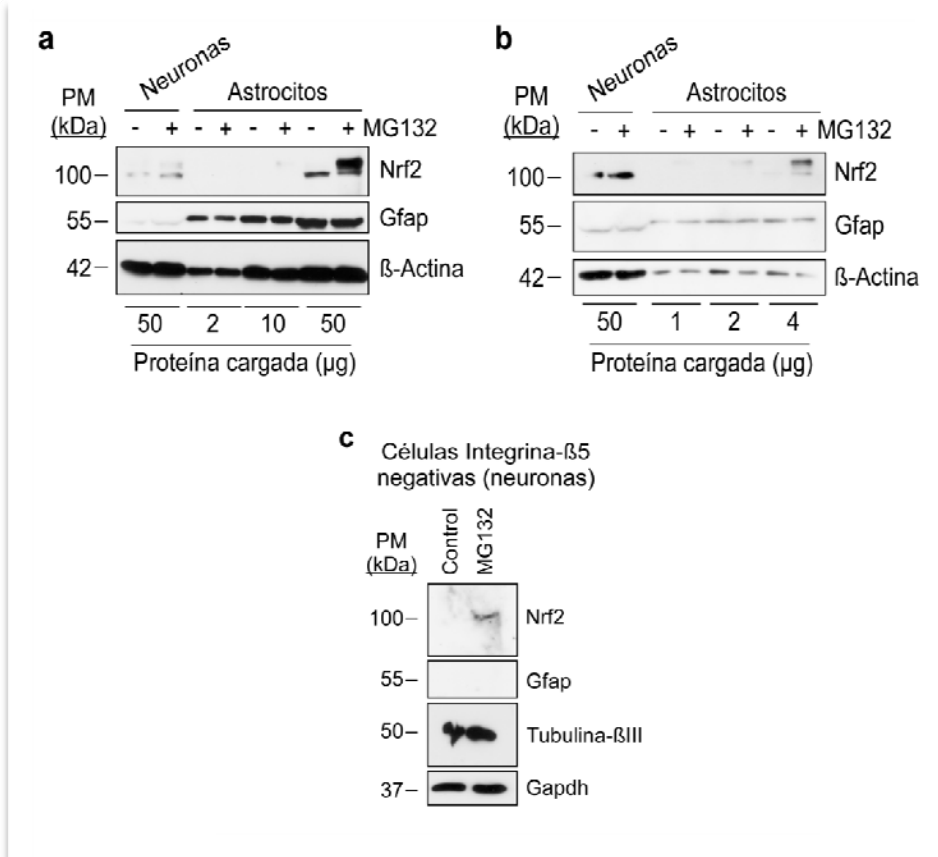


Figura 8. La acumulación de NRF2 por MG132, observada en cultivos primarios de neuronas, es debida a la presencia de NRF2 en las neuronas y no a la contaminación de los astrocitos. (a) La abundancia de NRF2 en 50 μ g de extracto de proteína obtenido a partir de las neuronas tratadas previamente (o no) con MG-132 se comparó, mediante transferencia de Western, con la abundancia de NRF2 observada en 2, 10 o 50 μ g de extractos de proteínas obtenidos a partir de astrocitos, tratados de la misma manera. Mientras que NRF2 se observó en las neuronas, NRF2 no era detectable ni en 2 ni en 10 μ g de astrocitos; solo 50 μ g de extracto de proteína de astrocitos reveló una señal de NRF2. GFAP fue utilizado como un marcador de astrocitos, y β -actina como control de carga. (b) La intensidad de la banda de NRF2 en 50 μ g de extracto de proteína neuronal se comparó con la obtenida en 1, 2 y 4 μ g de extractos de proteínas de astrocitos. NRF2 no se detectó en los astrocitos no tratados en ninguna de las cantidades de extracto de proteína cargadas, mientras que las neuronas mostraron una banda clara de NRF2. La incubación de los astrocitos con MG-132 no fue suficiente para revelar NRF2 en 2 μ g de extracto de proteína (4% de contaminación). (c) Las células integrina β 5 negativas (neuronas purificadas) se obtuvieron por cell sorting a partir de cultivos primarios de neuronas, y sus extractos de proteínas se sometieron a Western Blot, que reveló una banda de expresión de β III tubulina (específica de las neuronas). El tratamiento de las neuronas con MG-132 incrementó la abundancia de NRF2.

7. RESPUESTA NEURONAL A ESTÍMULOS QUE MIMETIZAN ESTRÉS OXIDATIVO.

Posteriormente, se propuso investigar si NRF2 en las neuronas podía ser objeto de regulación por parte de los tratamientos que inducen estrés oxidativo, y que son capaces de oxidar residuos clave de Cys en la proteína KEAP1, conduciendo a la estabilización del factor de transcripción. La incubación de las neuronas con t-BHQ, un conocido y potente oxidante, durante 4 horas, promovió la estabilización y translocación nuclear de NRF2 (**Figura 9a**) y el incremento de 1.7 veces en la transcripción del gen antioxidante, *Gclc* (**Figura 9b**). Además la incubación de las neuronas con un conocido estímulo excitotóxico (glutamato 100 μ M), durante 15 minutos, y tras 4 horas post-estimulación, también condujo a una moderada estabilización y translocación nuclear de NRF2 (**Figura 9c**).

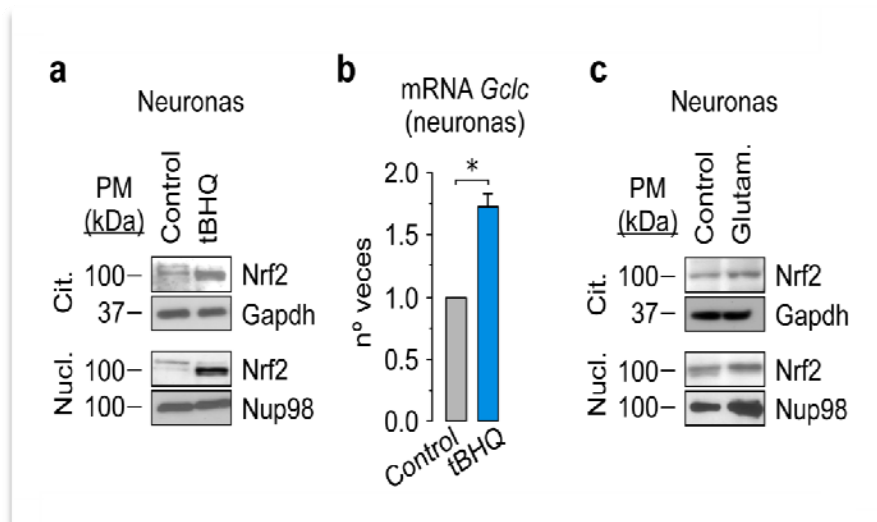


Figura 9. NRF2 experimenta una translocación nuclear que promueve su activación transcripcional bajo estímulos pro-oxidantes. (a) Las neuronas tratadas con tert-butilhidroquinona (tBHQ, 20 μ M, durante 4 horas) incrementó la cantidad de NRF2 en los compartimentos citosólico y nuclear. (b) La tBHQ incrementó los niveles del mRNA de la *Gclc* en las neuronas. (c) El daño excitotóxico (glutamato 100 μ M durante 15 minutos) incrementó en las neuronas, modestamente, la abundancia de la proteína NRF2 en los compartimentos citosólico y nuclear después de 4 horas post-incubación. La GAPDH se usó como marcador citosólico y NUP98 como marcador nuclear.

Para corroborar la actividad transcripcional de NRF2 frente a estos mismos estímulos, se analizó la actividad del elemento de respuesta antioxidante (ARE) en las neuronas, utilizando el gen reportero de la luciferasa. Inesperadamente, se encontró que las neuronas transfectadas con el siRNA control (*siControl*) mostraron un incremento significativo de 2 veces en la actividad del promotor ARE (**Figura 10a**) y en la abundancia de la proteína NRF2, como mostró el análisis mediante Western Blot, (**Figura 10b**) con respecto a las neuronas sin transfectar, probablemente debido al estrés generado en las células tras el proceso de transfección. De hecho, tanto t-BHQ como el glutamato a concentraciones excitotóxicas, estimularon eficientemente la actividad del promotor de los genes diana de NRF2 en las neuronas no transfectadas, efecto que fue abolido por MK801 (**Figura 10a**).

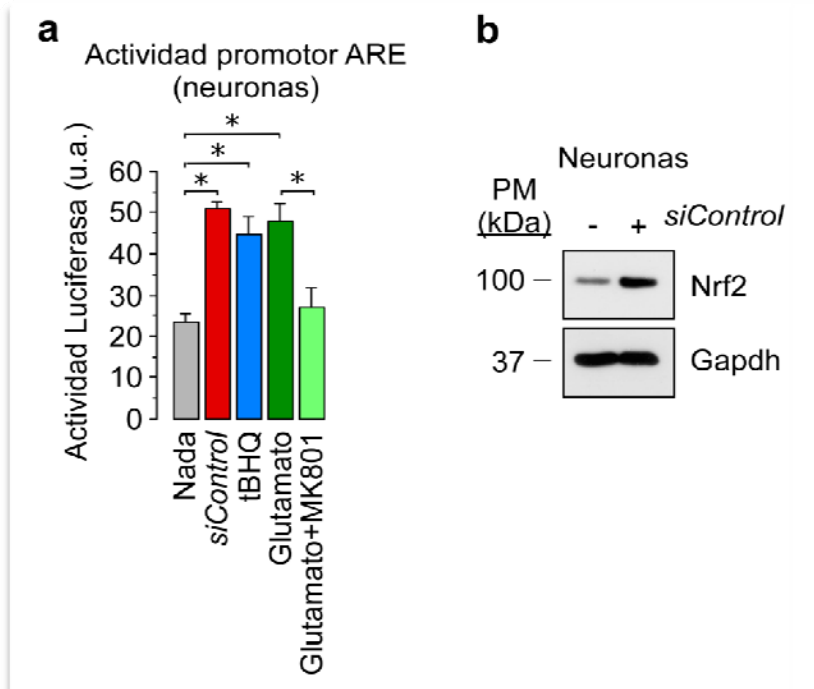


Figura 10. Efecto de la transfección con siRNA sobre la respuesta antioxidante neuronal mediada por la actividad del promotor ARE. (a) Las neuronas transfectadas con siRNA (*siControl*; 100 nM, durante 72 horas) y tratadas con tBHQ (20 μ M, durante 4 horas) o glutamato (100 μ M/15 minutos, a continuación, 4 horas en DMEM), mostraron un aumento de ~ 2 veces en la actividad del promotor ARE; el antagonista de los NMDARs, MK801 (10 μ M), previno este aumento en la actividad del promotor ARE inducido por el glutamato. (b) Las neuronas transfectadas con *siControl* aumentaron la cantidad de la proteína NRF2. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n=3$ experimentos independientes).

A pesar de que el silenciamiento de *Cul3* no fue suficiente para desencadenar la expresión de los genes diana de NRF2, como se muestra en la **Figura 5b**, sí que sensibilizó a las neuronas frente a la t-BHQ y al glutamato, mostrando una mayor actividad del promotor ARE (**Figura 11a**). Sin embargo estos estímulos pro-oxidantes no tuvieron efecto en las neuronas transfectadas con el *siControl*.

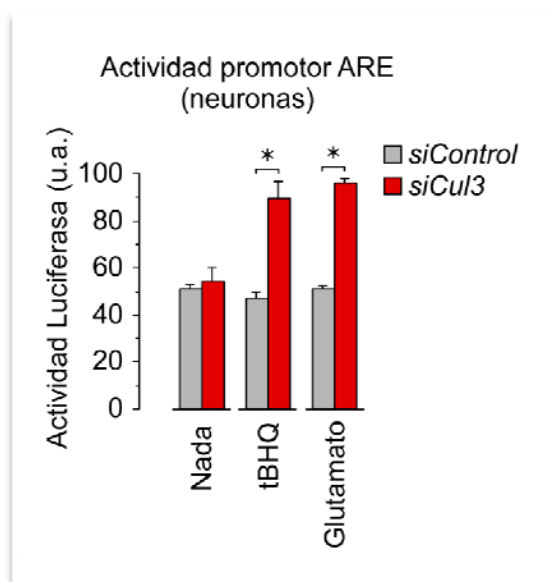


Figura 11. El silenciamiento de *Cul3* sensibilizó a las neuronas frente a estímulos pro-oxidantes. La t-BHQ (20 μ M, durante 4 horas) y el glutamato (100 μ M/15 minutos, a continuación 4 horas en DMEM) no indujeron la activación del promotor ARE en las neuronas transfectadas con *siControl*, pero sí lo hicieron en las transfectadas con *siCul3* (100 nM, durante 72 horas). Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (prueba t-Student; $n=3$ experimentos independientes)

Para confirmar que la actividad del promotor ARE, tras el tratamiento con glutamato, en neuronas silenciadas en *Cul3*, estaba mediada por NRF2, se cotransfectaron las neuronas con un siRNA diseñado frente al gen *Nrf2* (*siNrf2*) de *Rattus norvegicus* (**Figura 12a**). La disminución de los niveles de la proteína NRF2 revirtió el incremento de la actividad del promotor ARE causado por el glutamato (**Figura 12b**). Todos estos resultados sugieren que a pesar de que las neuronas están equipadas con un discreto sistema antioxidante regulado por NRF2, la eficacia de su respuesta es probablemente muy débil a menos que estas células sean sometidas a insultos patológicos que imitan al estrés oxidativo, tales como la oxidación por t-BHQ o la excitotoxicidad mediada por glutamato.

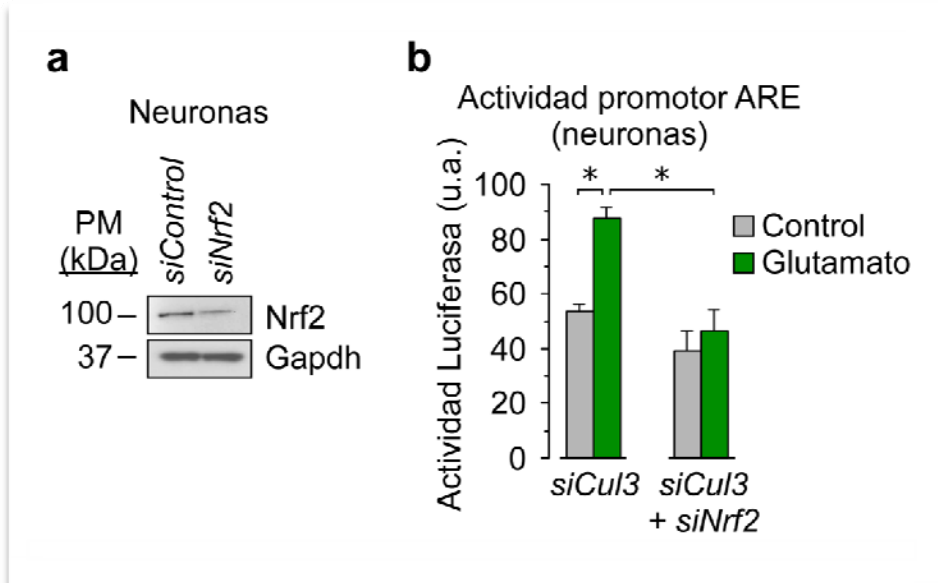


Figura 12. La actividad del promotor ARE está regulada por la interacción del factor de transcripción NRF2. (a) El RNA de interferencia frente a Nrf2 (siNrf2; 100 nM, durante 72 horas) disminuyó los niveles de la proteína NRF2 en las neuronas. (b) La actividad del promotor ARE en las neuronas silenciadas en Cul3, según el ensayo del gen reportero de la luciferasa, aumentó significativamente tras un daño excitotóxico (glutamato 100 μ M/15 minutos, seguido de 4 horas post-estimulación); el siNrf2 abolió el incremento en la actividad del promotor ARE, tras el daño excitotóxico. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M., * $p < 0.05$ (ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n=3$ experimentos independientes).

8. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES NMDA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} INTRACELULAR EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Durante la neurotransmisión fisiológica, las neuronas están sometidas continuamente a cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular que aumentan las ROS mitocondriales. A la vista de nuestros resultados, parece poco probable que la débil vía de señalización mediada por NRF2 en las neuronas, descrita en el presente documento, pueda satisfacer plenamente sus requerimientos antioxidantes. Sin embargo, se sabe que la señalización mediada por los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo NMDA en las neuronas, aumenta la inactivación del gen diana de FOXO, *Txnip* (inhibidor de la tiorredoxina)

[Papadia *et al.*, 2008]. Si bien este mecanismo intrínseco explica plausiblemente la autoprotección neuronal contra el estrés oxidativo durante la actividad sináptica fisiológica, sigue siendo difícil de dilucidar la contribución de los astrocitos para mantener una capacidad antioxidante eficiente en las neuronas durante la neurotransmisión [Haskew-Layton *et al.*, 2010; Bell *et al.*, 2011]. Se ha considerado que el proceso de la neurotransmisión podría iniciar una cascada de eventos que satisfagan las necesidades antioxidantes de las neuronas. Para comprobar esta hipótesis, se incubaron las neuronas en presencia del agonista del receptor ionotrópico de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA). Como se observa en la **Figura 13**, la concentración de Ca^{2+} intracelular se incrementó notablemente tras la incubación de las neuronas con NMDA (20 μM), es decir, una concentración compatible con la neurotransmisión glutamatérgica fisiológica, no excitotóxica.

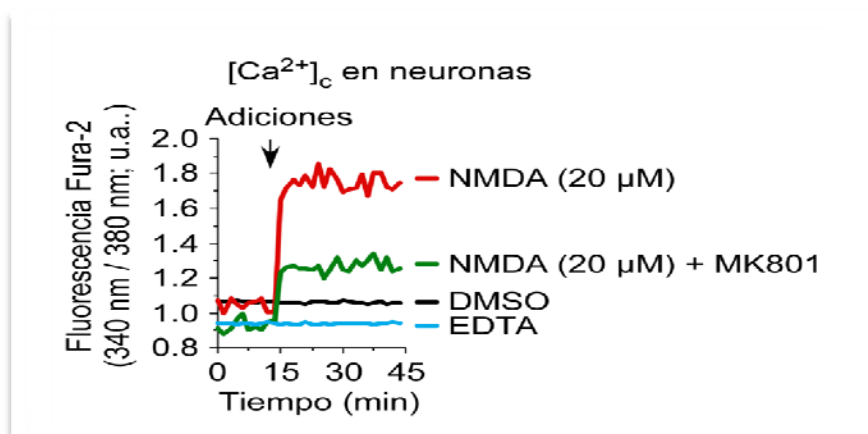


Figura 13. La estimulación de NMDARs conlleva a un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre. Los registros de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico libre ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) usando la sonda fluorescente Fura-2, revelaron un incrementado ratio de fluorescencia dependiente de Fura-2 (510 nm), en neuronas, obtenida tras la excitación a 340 / 380 nm, que evidenció un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tras la incubación con NMDA a 20 μM . Este incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ fue revertido con el tratamiento previo de MK801 10 μM . La incubación de las neuronas con tampón libre de Ca^{2+} , que contenía 1 mM de EDTA, previno completamente los cambios en las emisiones a 510 nm tras la adición de NMDA. El ruido de fondo se determinó a partir de los valores obtenidos de las células incubadas sin Fura-2, solo con el vehículo DMSO.

In vivo, los astrocitos son capaces de retirar el glutamato de la hendidura sináptica gracias a sus transportadores GLAST y GLT1 [Rothstein *et al.*, 1996]. Por lo tanto, al igual que las neuronas post-sinápticas, los astrocitos también están expuestos a la misma concentración del neurotransmisor. En vista de las investigaciones previas que han reportado la existencia de NMDARs en los astrocitos [Verkhratsky *et al.*, 2007], se planteó examinar si el NMDA podría desencadenar un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en estas células. De hecho, observamos que el NMDA, de manera dosis-dependiente (1-100 μM), indujo ondas intracelulares de Ca^{2+} sostenidas en los astrocitos, tal y como se observó en las células individuales, conllevando a un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular dependiente del tiempo (**Figura 14**). Puesto que a partir de 50 μM , el NMDA se considera neurotóxico [Papadia *et al.*, 2008; Wroge *et al.*, 2012], decidimos utilizar la concentración de 20 μM para el resto de experimentos, ya que provocó una respuesta parecida y esta concentración se considera fisiológica, no excitotóxica.

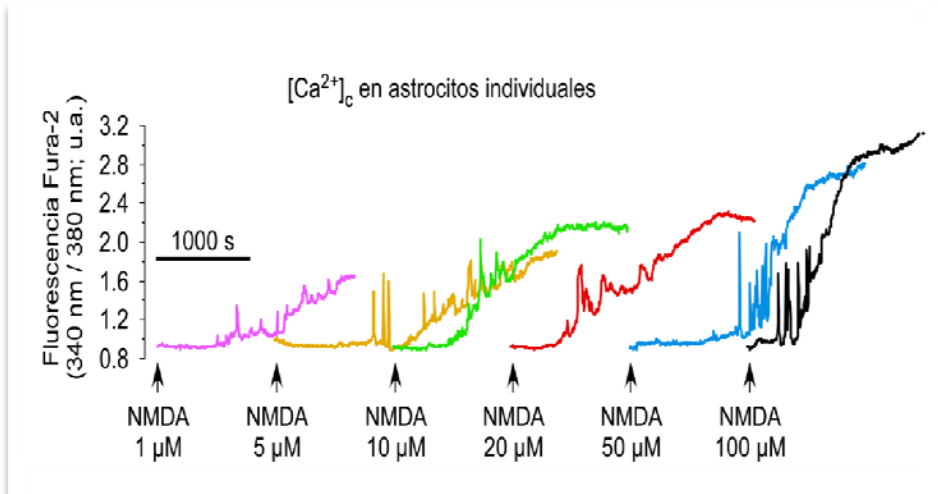


Figura 14. El N-metil-D-aspartato (NMDA), de manera dosis-dependiente, causa un sostenido incremento de Ca^{2+} citosólico libre en los astrocitos. El NMDA, de forma dosis-dependiente, indujo un retrasado y sostenido incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico libre ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) en los astrocitos individuales. Para estos registros se usó la sonda fluorescente Fura-2.

9. LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES NMDA PROMUEVE LA ACTIVACIÓN FUNCIONAL DE NRF2 EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Para demostrar si la estimulación sostenida de NMDARs era capaz de activar la respuesta antioxidante mediada por NRF2, observamos que la expresión de los genes antioxidantes, *Gclc*, *Ho-1* y *Nqo-1*, estaba incrementada tanto en los astrocitos (**Figura 15a**) como en las neuronas (**Figura 15b**). Asimismo, este efecto estaba mediado por los NMDARs, ya que el tratamiento previo con el antagonista selectivo de estos receptores, MK801, abolió por completo esta respuesta antioxidante en los astrocitos (**Figura 15a**).

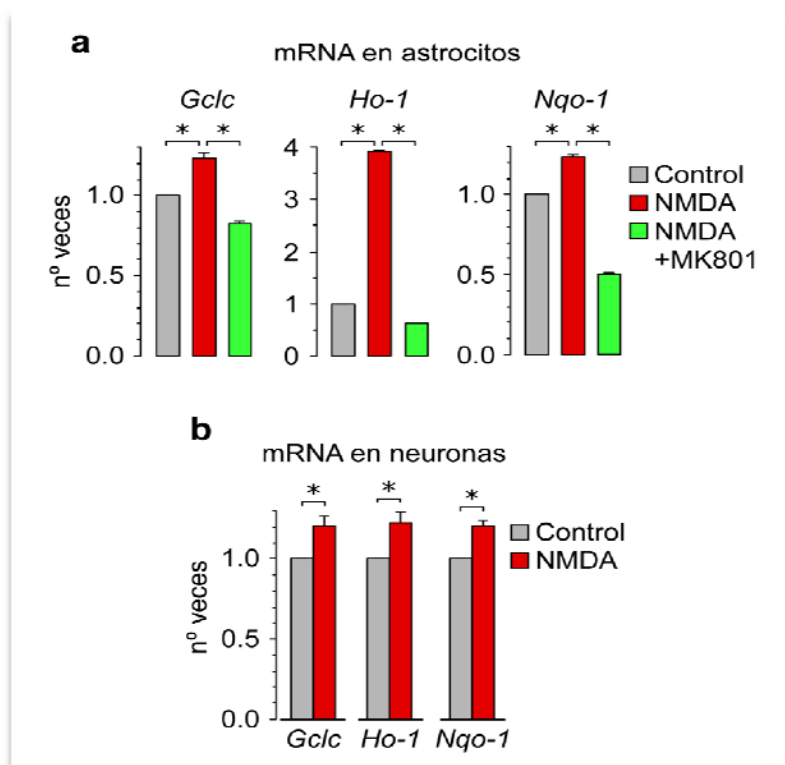


Figura 15. La activación fisiológica de NMDARs desencadenó la activación funcional de NRF2 en astrocitos y neuronas. La incubación de los astrocitos (a) y de las neuronas (b) con NMDA 20 μ M durante 8 horas, incrementó los niveles del mRNA de la *Gclc*, *Ho-1* y *Nqo-1*, efecto que fue abolido por el MK801 (10 μ M). Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n=3$ experimentos independientes para el panel a y test t-Student; $n=3$ experimentos independientes para el panel b).

Por otro lado, se demostró que la respuesta antioxidante mediada por NMDARs, era dependiente de NRF2, ya que silenciando *Nrf2* (Figura 16a, b) en los astrocitos, no se produjo incremento en la transcripción de los genes antioxidantes tras la estimulación con NMDA (Figura 16c).

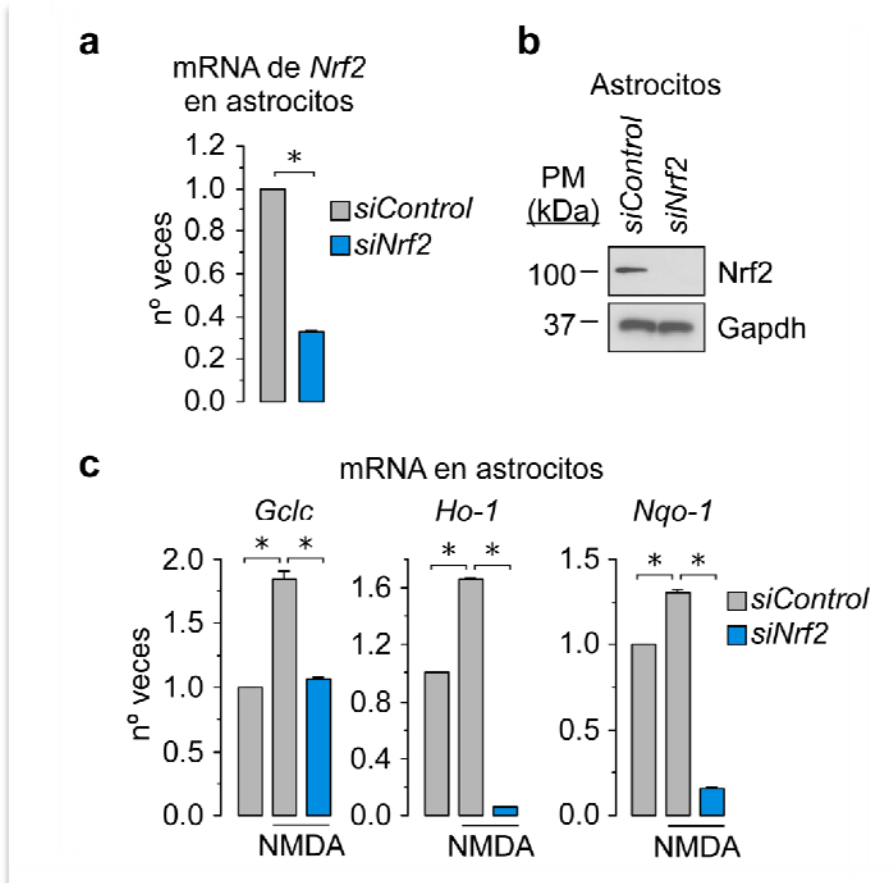


Figura 16. NRF2 regula la respuesta antioxidante activada por los NMDARs en los astrocitos. (a y b) El siNrf2 (100 nM, durante 72 horas) disminuyó los niveles del mRNA de *Nrf2* y la cantidad de proteína según los análisis de qPCR y Western Blot, respectivamente. Se usó como siControl (100 nM) un siRNA frente a la luciferasa. (c) El siNrf2 previno el incremento en los niveles de expresión de *Gclc*, *Ho-1* y *Nqo-1* en los astrocitos, inducido por NMDA (20 μ M, durante 8 horas). Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes para el panel a y ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n=3$ experimentos independientes para el panel c).

10. LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES NMDA AFECTA A LA ABUNDANCIA Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE NRF2 EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Con objeto de confirmar que la estimulación sostenida de receptores glutamatérgicos de NMDA, era capaz de regular la abundancia de NRF2 y su localización subcelular, se trataron las neuronas y los astrocitos primarios con concentraciones fisiológicas de NMDA. Como se observa en los experimentos de Western Blot (**Figura 17a, b**), existe un incremento sustancial en la abundancia de NRF2, tanto en las neuronas como en los astrocitos respectivamente, así como una translocación nuclear de esta proteína en ambos tipos celulares (**Figura 17c, d**).

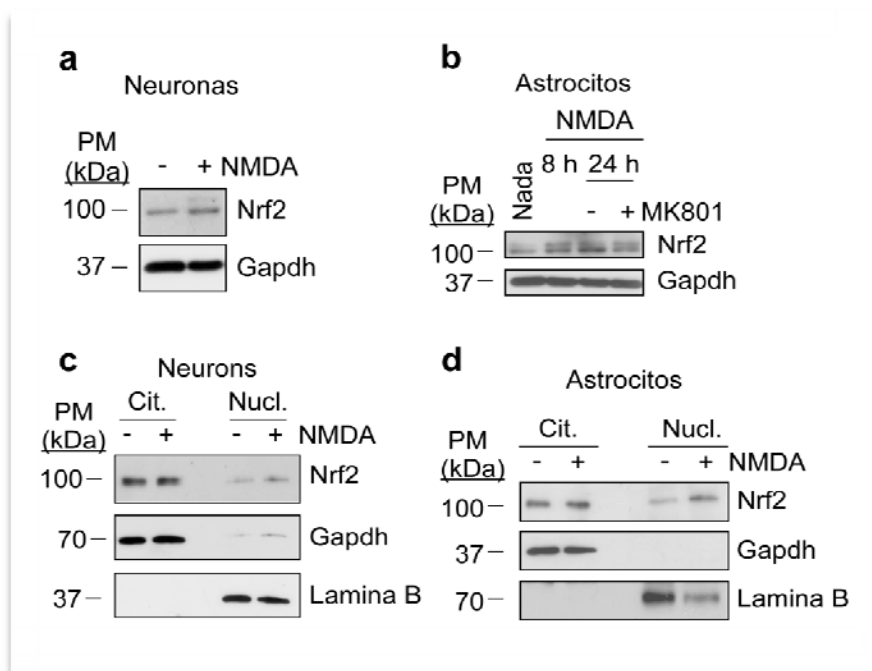


Figura 17. La activación fisiológica de NMDARs promueve la estabilización y translocación nuclear de NRF2 en neuronas y astrocitos. (a) El NMDA (20 μM, 8 horas) incrementó la cantidad de NRF2 en neuronas. **(b)** El NMDA (20 μM, 8 o 24 horas) incrementó la cantidad de NRF2 en astrocitos, y el MK801 abolió este efecto. **(c)** La incubación de las neuronas con NMDA (20 μM, 8 horas) promovió la acumulación de NRF2 en el núcleo. **(d)** El NMDA (20 μM, 8 o 24 horas) incrementó los niveles endógenos de NRF2 en el núcleo de astrocitos. La GAPDH se usó como control de carga y marcador de citosoles y la lamina B como marcador de núcleos.

Estos resultados indican que la activación de los NMDARs, a dosis sutiles, compatibles con la neurotransmisión fisiológica, desencadena una respuesta antioxidante funcional mediada por NRF2 en ambos tipos celulares.

11. FOSFORILACIÓN DE NRF2 POR CDK5 MEDIADA POR ACTIVACIÓN FISIOLÓGICA DE RECEPTORES NMDA EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

A continuación nos propusimos entender los eventos moleculares responsables de la activación de la vía de señalización de NRF2 dependiente de los NMDARs. Teniendo en cuenta que NRF2 contiene muchos sitios consenso, de fosforilación potencial por múltiples proteínas quinasas (base de datos *Scansite*, <http://scansite.mit.edu/>), hipotetizamos si la actividad de los NMDARs podría desencadenar la fosforilación de NRF2. Para responder a esta hipótesis, se inmunoprecipitó la proteína NRF2 y, mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-fosfoserina, se analizó el estado de fosforilación de la proteína. Este experimento reveló la existencia de fosforilación de NRF2 por la activación de los receptores glutamatérgicos de NMDA, tanto en las neuronas como en los astrocitos (**Figura 18a, c**). Conjuntamente, la fosforilación de la proteína fue claramente prevenida con el antagonista de los NMDARs, MK801 (**Figura 18b, c**).

Estos resultados confirman que la activación fisiológica y continuada de NMDARs conduce a la fosforilación del factor de transcripción NRF2 tanto en neuronas como en astrocitos corticales de rata.

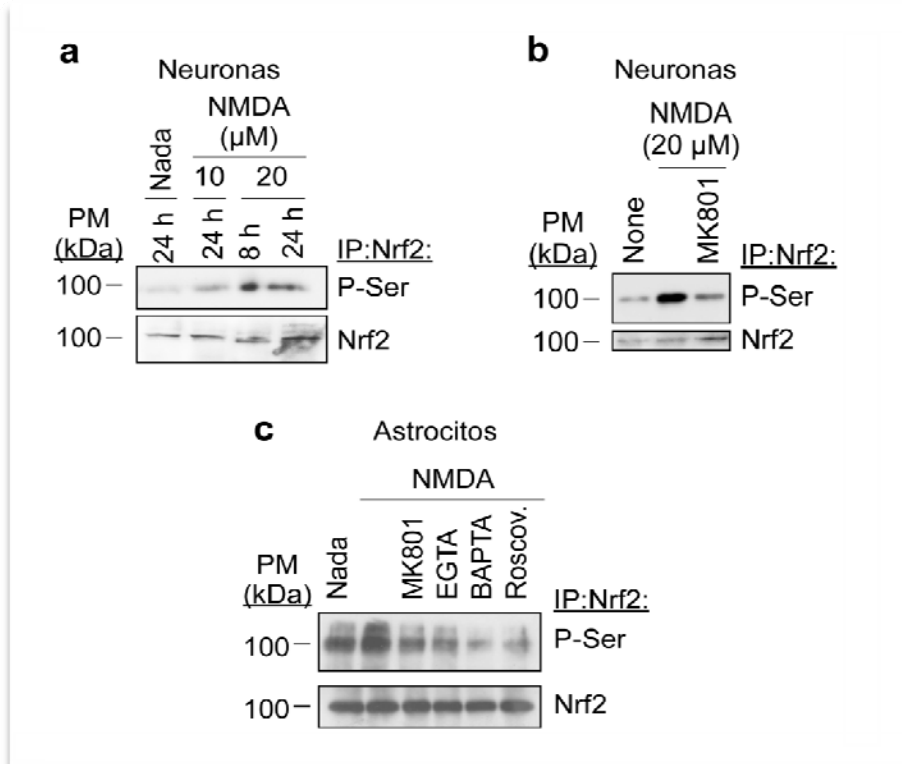


Figura 18. La activación fisiológica y sostenida de NMDARs promueve fosforilación de NRF2. (a) Las neuronas se incubaron con NMDA (10 μM durante 24 horas, o 20 μM durante 8 y 24 horas), NRF2 se inmunoprecipitó y por análisis de transferencia de Western, usando un anticuerpo anti-fosfoserina, se observó una banda incrementada de NRF2 fosforilado tanto con NMDA a 10 μM como a 20 μM. (b) El aumento de la fosforilación de NRF2 promovido por NMDA (20 μM, 8 horas) en las neuronas, fue prevenido por MK-801 (10 μM). (c) La inmunoprecipitación de NRF2 en astrocitos, seguida por análisis de Western Blot usando anti-fosfoserina, reveló un incremento de la fosforilación de NRF2 mediada por NMDA (20 μM durante 8 horas). La fosforilación de NRF2 fue prevenida por el MK-801 (10 μM), por quelación de Ca²⁺ extracelular con EGTA (100 μM en DMEM libre de Ca²⁺), por quelación de Ca²⁺ intracelular con BAPTA (10 μM en DMEM libre de Ca²⁺) y por el inhibidor general de CDKs, roscovitina (10 μM).

Como se describió previamente en nuestro laboratorio, la estimulación excitotóxica de los NMDARs en las neuronas provoca la activación de CDK5 de manera dependiente de Ca²⁺ [Maestre et al., 2008]. Por este motivo, se realizaron búsquedas de dominios consenso en la secuencia de NRF2 potencialmente fosforilables por CDK5, y encontramos, al menos, tres posibles residuos con alta probabilidad de ser fosforilados por CDK5: la Thr395 (VKQNGPKTPVHSSGD), Ser433 (PEKELPVSPGHRKTP) y Thr439

(VSPGHRKTPFTKDKH), según la base de datos *Scansite*. Con estos hallazgos se planteó la hipótesis de si CDK5 podría ser la responsable de la fosforilación de NRF2 bajo la estimulación de NMDARs. Se observó que el secuestro intracelular y extracelular de Ca^{2+} con BAPTA y EGTA respectivamente, y la inhibición de las CDK(s) con roscovitina, abolieron completamente la fosforilación de NRF2 en astrocitos (**Figura 18c**) y en neuronas (**Figura 19a, b**), así como la transcripción de los genes diana de NRF2 en los astrocitos (**Figura 19c**).

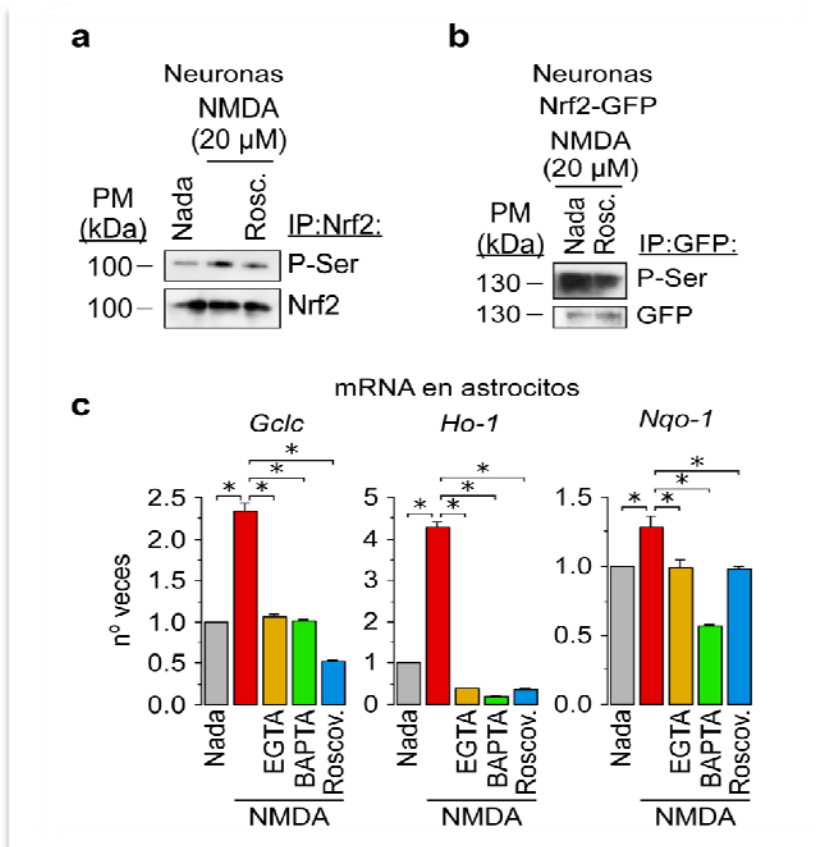


Figura 19. La quelación de Ca^{2+} y la inhibición de CDKs abolen la respuesta antioxidante mediada por NMDA. (a) La incubación de las neuronas con roscovitina (10 μM) previno la fosforilación de Nrf2 endógeno, mediada por NMDA (20 μM , 8 horas). (b) La incubación de las neuronas, previamente transfectadas con la proteína de fusión NRF2-GFP, con NMDA (20 μM , 8 horas), seguida de la inmunoprecipitación de GFP, reveló que la co-incubación con roscovitina (10 μM) abolía la fosforilación de NRF2 mediada por NMDA. (c) El EGTA (100 μM), el BAPTA (10 μM) y la roscovitina (10 μM) previnieron el incremento en los niveles de mRNA de los genes *Gclc*, *Ho-1* y *Nqo-1* mediado por NMDA en astrocitos. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n = 3$ experimentos independientes).

Para corroborar que CDK5 regulaba la estabilización y fosforilación de NRF2, se diseñó un RNA de interferencia frente al gen *Cdk5* (*siCdk5*; 66nM, 72 horas) de *Rattus norvegicus*. Tras el silenciamiento de *Cdk5* en los astrocitos, se observó mediante Western Blot que se prevenía el incremento en los niveles de NRF2 mediado por activación de NMDARs (**Figura 20a**). Asimismo, la fosforilación de NRF2 también disminuyó tras el silenciamiento de *Cdk5*, tanto en los astrocitos (**Figura 20b**) como en las neuronas (**Figura 20c, d**).

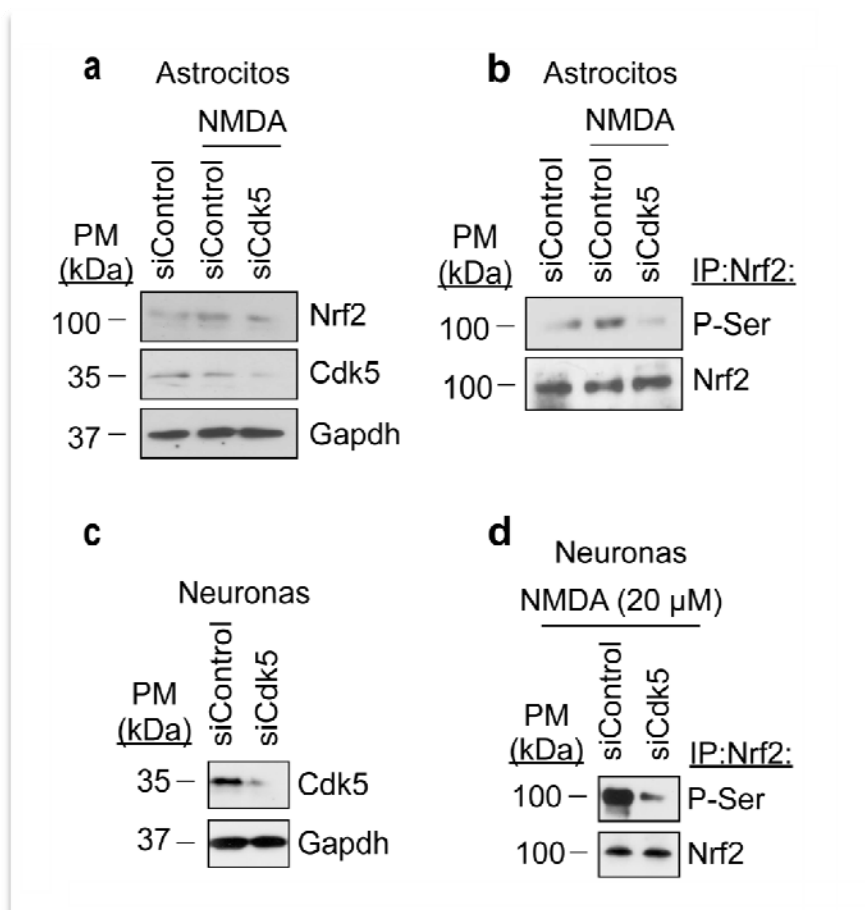


Figura 20. La estimulación de NMDARs promueve fosforilación de NRF2 mediada por CDK5. (a) El *siCdk5* previene el aumento en la abundancia de la proteína NRF2 mediado por NMDA (20 μM, 8 horas) en los astrocitos. **(b)** La fosforilación de NRF2 inducida por NMDA (20 μM, 8 horas) es prevenida por el *siCdk5* en los astrocitos. **(c)** La transfección de las neuronas con el siRNA frente a *Cdk5* (*siCdk5*) provocó una disminución en la abundancia de la proteína CDK5 después de 72 horas. **(d)** El tratamiento de las neuronas con el *siCdk5* redujo los niveles de la fosforilación en residuos de serinas de Nrf2 en extractos de la proteína inmunoprecipitada.

Finalmente, se observó que la disminución de la actividad de CDK5 tras el silenciamiento de la misma, revirtió completamente el aumento de la expresión de los genes diana de NRF2 en los astrocitos (**Figura 21**). Estos resultados revelan que la activación fisiológica de los NMDARs en los astrocitos promueve la fosforilación de NRF2 mediada por CDK5, provocando su activación transcripcional.

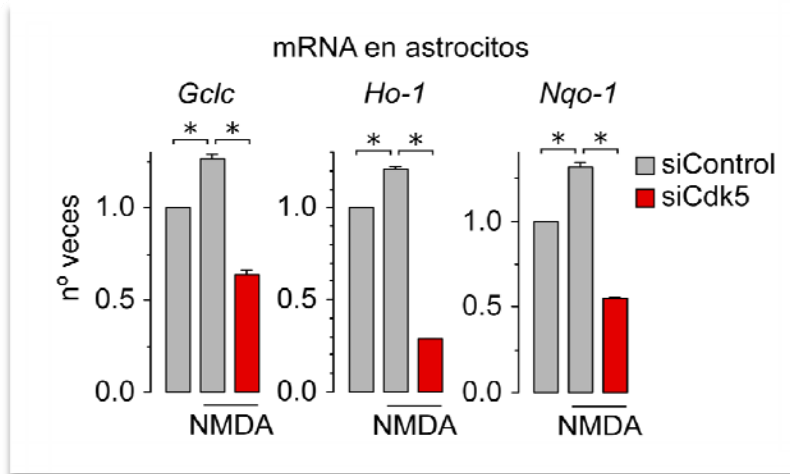


Figura 21. La estimulación de NMDARs promueve la activación transcripcional de Nrf2 mediada por CDK5 en los astrocitos. El silenciamiento de Cdk5 abolió el incremento mediado por NMDA de los niveles de mRNA de los genes diana de NRF2, Gclc, Ho-1 y Nqo-1, en los astrocitos. Los datos son expresados como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n = 3$ experimentos independientes).

12. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE CDK5 MEDIADO POR LA ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA EN NEURONAS Y ASTROCITOS.

Con el objeto de conocer el mecanismo por el cual la activación de los NMDARs es capaz de activar CDK5, conduciendo a la fosforilación de NRF2 en neuronas y astrocitos, se evaluó la posible conversión del cofactor de CDK5, p35, en p25. A pesar de que este fenómeno ya se describió previamente en nuestro laboratorio en neuronas tratadas con concentraciones excitotóxicas de NMDA [Maestre *et al.*, 2008], en condiciones fisiológicas de

neurotransmisión (NMDA, 20 μ M), no se indujo la conversión de p35 a p25 ni en astrocitos (**Figura 22a**) ni en neuronas (**Figura 22b**). De acuerdo con estos resultados, el MDL, un inhibidor de la calpaínas responsables de la proteólisis de p35 para dar lugar a p25 [Kusakawa *et al.*, 2000], no evitó la fosforilación de NRF2 mediada por la activación de NMDARs, ni en astrocitos (**Figura 22c**), ni en neuronas (**Figura 22d**). Por lo tanto, se confirma que la estimulación fisiológica de los NMDARs no promueve la activación de p25/CDK5, que únicamente tiene lugar durante procesos de excitotoxicidad [Maestre *et al.*, 2008].

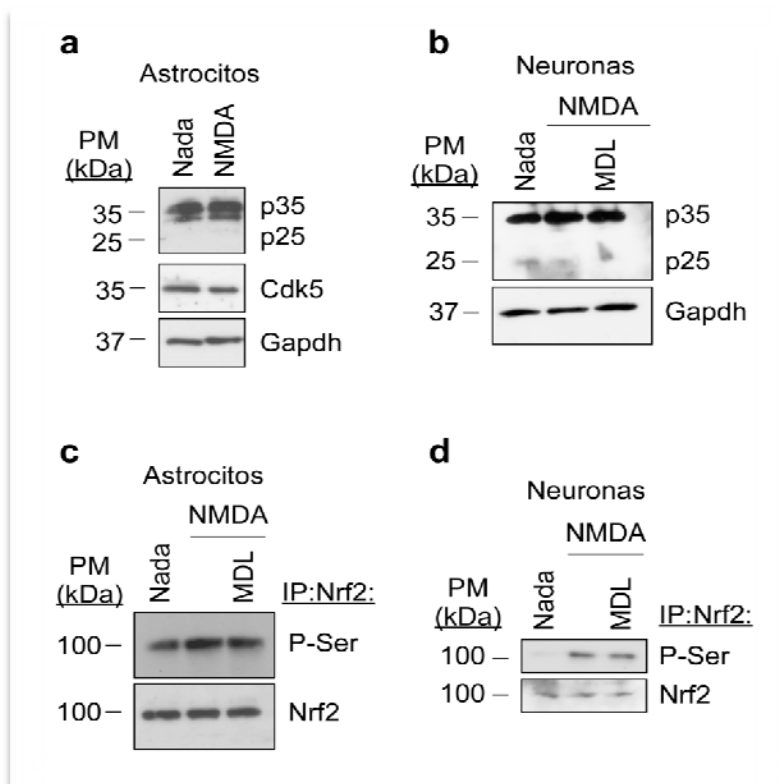


Figura 22. La estimulación fisiológica de los NMDARs no promueve la conversión del cofactor p35 a p25 ni en astrocitos ni en neuronas. (a) El tratamiento con NMDA (20 μ M, 8 horas) no alteró los niveles de la proteína p35 ni promovió la aparición de p25 en los astrocitos. **(b)** El tratamiento con NMDA (20 μ M, 8 horas) no alteró los niveles de la proteína p35 ni promovió la aparición de p25, independientemente de la presencia del inhibidor de calpaína MDL (100 μ M) en neuronas. **(c)** La incubación de los astrocitos con MDL (100 μ M) durante la estimulación con NMDA (20 μ M, 8 horas), no previno el incremento de la fosforilación de Nrf2 mediado por NMDA. **(d)** El tratamiento con MDL en las neuronas, no impidió el incremento de la fosforilación, en residuos de serina de Nrf2, tras el tratamiento con NMDA (20 μ M, 8 horas).

Para determinar si CDK5 era activa en astrocitos tratados con concentraciones fisiológicas de NMDA, se realizó un fraccionamiento subcelular para aislar los núcleos de los citosoles y se inmunoprecipitó la proteína CDK5 de ambos compartimentos. Finalmente se realizó un ensayo de actividad kinásica *in vitro*, incubando la proteína CDK5 inmunoprecipitada de cada compartimento en presencia del sustrato histona H1. Como se muestra en la **Figura 23a**, solo la proteína CDK5 inmunoprecipitada de los extractos citosólicos (pero no de los extractos nucleares) fue capaz de fosforilar la histona H1. Estos resultados confirman que CDK5 permanece activa en el citosol incrementando considerablemente su actividad tras la estimulación con NMDA, y son consistentes con la actividad fisiológica y citosólica de p35/CDK5 [Hisanaga *et al.*, 2010].

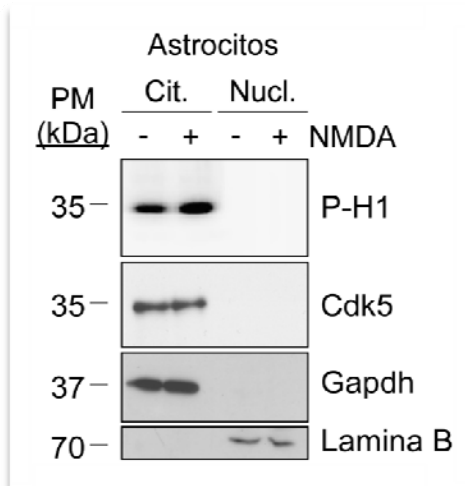


Figura 23. La activación fisiológica de NMDARs potencia la actividad citosólica de CDK5 en astrocitos. El NMDA (20 μ M, 8 horas) incrementó la fosforilación de la H1 (P-H1) solo en los extractos citosólicos de proteínas de astrocitos previamente inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-CDK5. GAPDH se usó como marcador de citosoles (Cit.) y lamina B como marcador de núcleos (Nucl.)

13. LA FOSFORILACIÓN DE NRF2 POR p35/CDK5 REGULA SU LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y SU ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL EN ASTROCITOS.

A continuación se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* para demostrar que p35/CDK5 era capaz de fosforilar a NRF2. Para ello, se utilizó la forma silvestre de la proteína NRF2, previamente purificada como se detalla en el **Apartado 9.8 de Material y Métodos**, y una forma mutada de NRF2 en los

tres sitios potencialmente fosforilables por CDK5 que se mencionaron anteriormente (T395A / S433A / T439A). Como se muestra en la **Figura 24a**, p35/CDK5 fue capaz de fosforilar la forma silvestre de NRF2 y, muy sutilmente, la forma mutada. Por lo tanto, con estos resultados no solo demostramos que NRF2 es un sustrato de p35/CDK5, sino que detallamos tres residuos putativos de fosforilación por esta kinasa en la secuencia de NRF2.

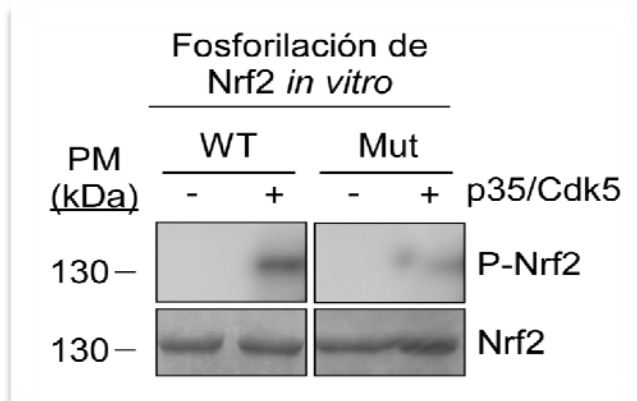


Figura 24. p35/CDK5 fosforila a Nrf2 en los residuos Thr-395, Ser-433 y Thr-439. El ensayo de fosforilación “*in vitro*” de NRF2 reveló una acentuada fosforilación de la forma silvestre de NRF2 (Wt; wild type), mediada por p35/CDK5 y una sutil fosforilación de la forma mutada de NRF2 (Mut) T395A/S433A/T439A.

A continuación, quisimos averiguar si la fosforilación de NRF2 por p35/CDK5, tras la estimulación de los NMDARs, era capaz de regular su localización subcelular en los astrocitos. Para ello, éstos se transfectaron con las formas silvestre y mutada (T395A / S433A / T439A) de NRF2, fusionadas a la GFP, durante 24 horas. Por un lado, se realizó el Western Blot con los lisados totales observándose que el tratamiento fisiológico con NMDA, mantenido durante 8 horas, provocó la acumulación exclusivamente de la forma silvestre y no de la forma mutada de la proteína de fusión NRF2-GFP (**Figura 25a**). Por otro lado, se fraccionó citosol y núcleo de las células transfectadas con cada una de las formas (silvestre y mutada) de la proteína de fusión NRF2-GFP, y se analizó su expresión. En este experimento se pudo comprobar cómo la forma silvestre de NRF2 se acumuló en el citosol y en el núcleo tras el tratamiento fisiológico con NMDA, mientras que la forma mutada

de NRF2 no lo hizo (**Figura 25b**). Además en ausencia de NMDA la forma fosfomimética de NRF2 (T395D / S433D / T439D) se acumuló en el citosol y en el núcleo de los astrocitos mimetizando el efecto del NMDA sobre la forma silvestre de NRF2 (**Figura 25b**).

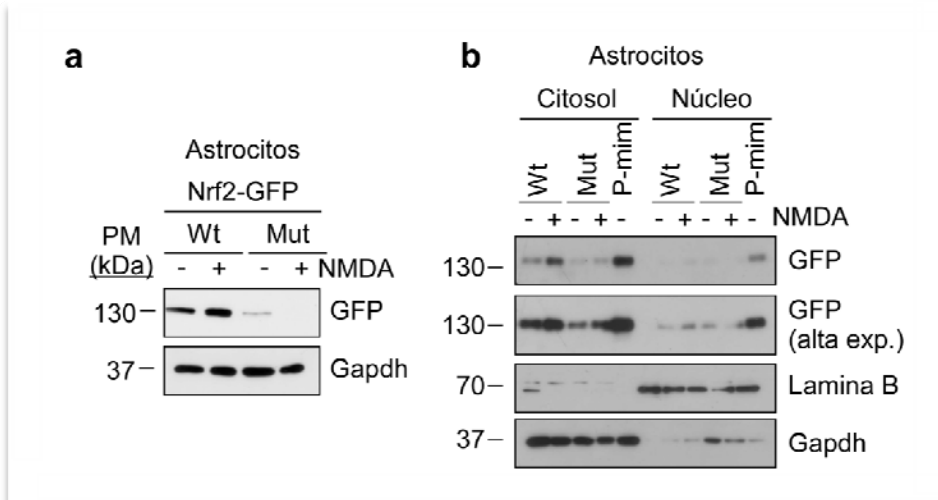


Figura 25. La fosforilación de NRF2 por p35/CDK5 tras la estimulación fisiológica de los NMDARs, conduce a su estabilización y acumulación nuclear. (a) La transfección de los astrocitos con la forma silvestre (Wt) o la forma mutada T395A/S433A/T439A (Mut) de NRF2 fusionadas a la GFP, seguida del tratamiento con NMDA (20 μ M, 8 horas), mostró que el NMDA inducía la acumulación de la forma silvestre pero no de la forma mutada de NRF2-GFP. **(b)** La transfección de los astrocitos con la forma silvestre (Wt) o la forma mutada T395A/S433A/T439A (Mut) de NRF2 fusionadas a la GFP, seguida del tratamiento con NMDA (20 μ M, 8 horas), reveló que el NMDA promovía la acumulación citosólica y nuclear de la forma silvestre (Wt) de NRF2, pero no de la forma mutada T395A/S433A/T439A (Mut). Un mayor tiempo de exposición de la película (alta exp.) mostró NRF2 en el núcleo. La transfección de los astrocitos con la forma fosfomimética T395D/S433D/T439D (P-min) de NRF2 provocó la acumulación citosólica y nuclear de NRF2 en ausencia de NMDA, mimetizando el efecto del NMDA sobre la forma silvestre de NRF2. La GAPDH se usó como marcador citosólico y la lamina B como marcador nuclear.

El análisis de inmunofluorescencia con GFP confirmó estos mismos efectos observados mediante Western Blot (**Figura 26**).

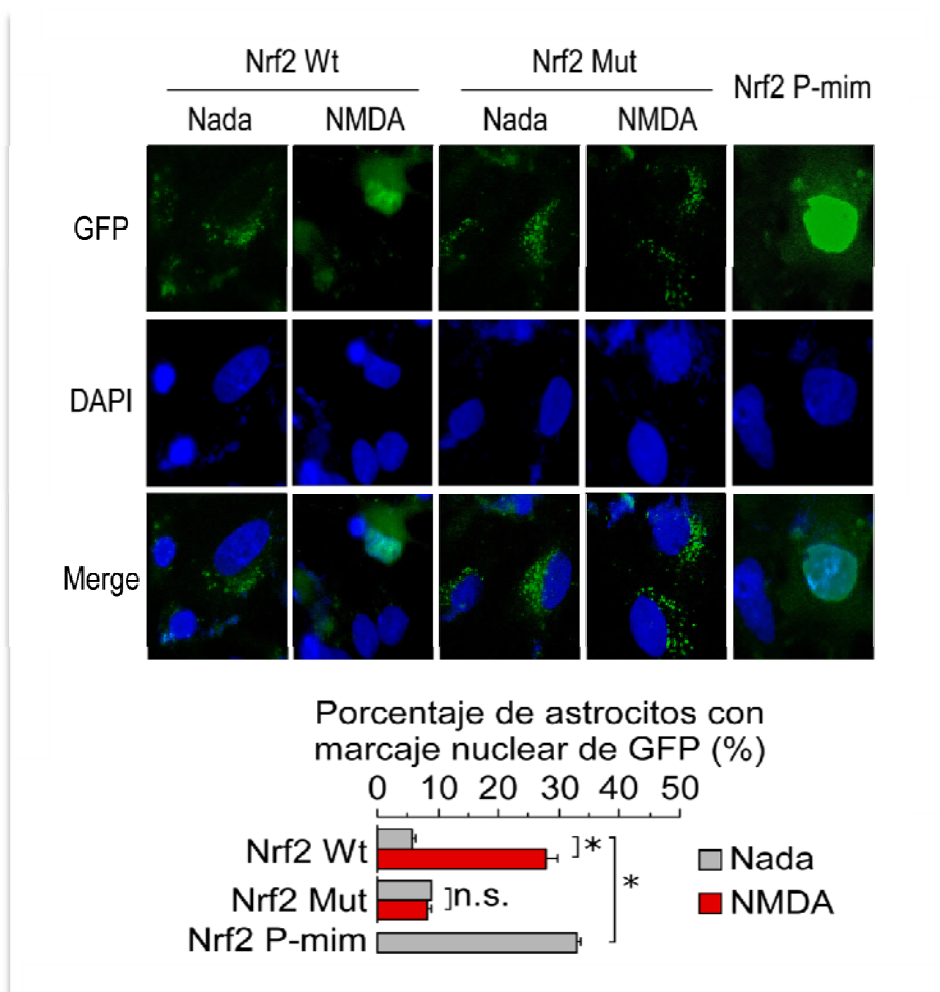


Figura 26. El análisis de inmunofluorescencia con GFP revela una acumulación nuclear de Nrf2 tras la activación fisiológica y mantenida de los NMDARs en los astrocitos. La transfección de los astrocitos con la forma silvestre (NRF2 Wt) o la forma mutada T395A/S433A/T439A (NRF2 Mut) de NRF2 fusionadas a la GFP, seguida del tratamiento con NMDA (20 μ M, 8 horas) y del análisis de inmunofluorescencia con GFP, mostró que el NMDA inducía la acumulación de la forma silvestre de NRF2 pero no de la forma mutada. La transfección de los astrocitos con la forma fosfomimética T395D/S433D/T439D (NRF2 P-min) de NRF2 provocó la acumulación nuclear de NRF2 en ausencia de NMDA, mimetizando el efecto del NMDA sobre la forma silvestre de NRF2. La cuantificación de la proporción de astrocitos con colocalización de GFP-DAPI se realizó en ~150 células y los resultados son mostrados. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n = 3$ experimentos independientes).

Todos estos resultados muestran que la señalización mantenida, de los NMDARs en astrocitos promueve la fosforilación de NRF2 mediada por p35/CDK5 y su translocación al núcleo.

14. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD p35/CDK5 A TRAVÉS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PLC-PKC δ EN ASTROCITOS.

Seguidamente, se intentó desentrañar la vía de señalización responsable de la activación de p35/CDK5 tras la activación de NMDARs en los astrocitos. En vista de que la proteína quinasa C delta (PKC δ) fosforila a p35 manteniendo su estabilidad [Zhao *et al.* 2009], se utilizó el compuesto U73122 (y su isómero inactivo, U73343) [Agarwal *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1994] para inhibir la actividad de la fosfolipasa C (PLC), aguas arriba de la PKC δ , y la rottlerina para inhibir selectivamente la PKC δ [Gschwendt *et al.*, 1994; Susarla & Robinson, 2003]. Mediante inmunoprecipitación y Western Blot se determinó el estado de fosforilación y la estabilidad de p35. Se evidenció que tanto la fosforilación de p35 mediada por la activación de los NMDARs (**Figura 27a**) como su estabilidad (**Figura 27b**), disminuyeron con U73122 y con rottlerina.

Estos resultados sugieren que la presencia de NMDA, desencadena la activación de PKC δ dependiente de la PLC en los astrocitos, lo que conduce a la fosforilación de p35 para coactivar a CDK5 en el citosol. De acuerdo con estos resultados, el inhibidor U73122 (pero no su análogo inactivo, U73343), así como rottlerina, previnieron también la fosforilación de NRF2 (**Figura 27c**), lo que indica la participación de la vía de señalización PLC-PKC δ en la cascada de activación de NRF2 en los astrocitos.

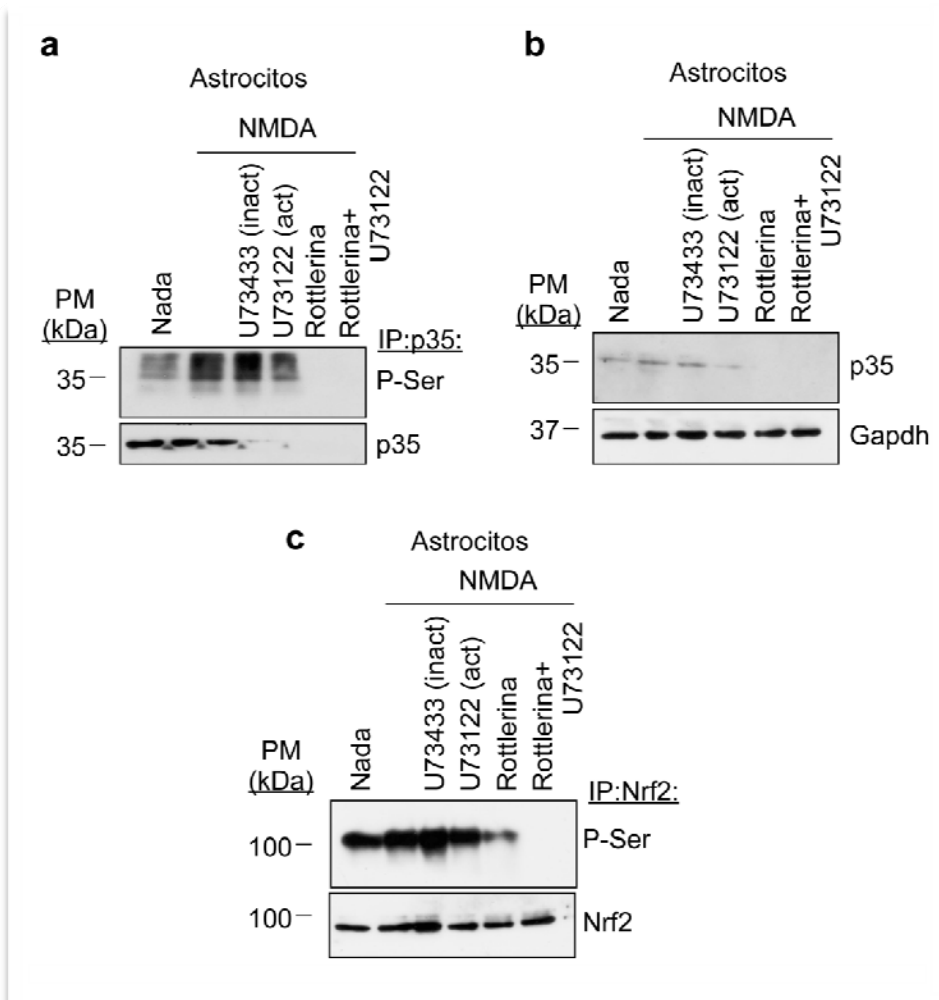


Figura 27. El NMDA activa la vía de señalización PLC-PKC δ en los astrocitos, que media la fosforilación y estabilización de p35 y la fosforilación de NRF2. (a) El NMDA (20 μ M, 8 horas) incrementó la fosforilación de p35 según el ensayo de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-fosfoserina en extractos de inmunoprecipitados de p35. El antagonista inactivo de la PLC, U73433 (10 nM), no previno la fosforilación de p35. Sin embargo, el antagonista activo de la PLC, U73122 (10 nM) si previno la fosforilación de p35. El inhibidor de la PKC δ , rottlerina (25 μ M), tanto sola como en combinación con el U73122, abolió el incremento de fosfo-p35. **(b)** El antagonista inactivo de la PLC, U73433 (10 nM), no disminuyó los niveles de p35 en astrocitos tratados con NMDA (20 μ M, 8 horas). Sin embargo, el antagonista activo de la PLC, U73122 (10 nM) disminuyó la abundancia de p35, y el inhibidor de la PKC δ , rottlerina (25 μ M), tanto sola como en combinación con el U73122, indujo una pérdida total de la proteína p35. **(c)** El incremento de la fosforilación de NRF2, según el ensayo de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-fosfoserina en extractos de inmunoprecipitados de NRF2 de astrocitos tratados con NMDA (20 μ M, 8 horas), se previno con U73122 (pero no con U73433) y con rottlerina, tanto sola como en combinación con U73122.

15. IMPORTANCIA DEL Ca^{2+} EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD p35/CDK5 EN ASTROCITOS.

Con objeto de investigar el papel que desempeña el Ca^{2+} en este mecanismo de regulación, se registraron las ondas de Ca^{2+} citosólicas ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) tras la activación de los NMDARs en los astrocitos corticales individuales. Como se muestra en la **Figura 28a**, el antagonista inactivo de la PLC, U73343, fue incapaz de alterar el incremento en las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mediado por NMDA. Sin embargo, el antagonista activo de la PLC, U73122, previno completamente el incremento en las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mediado por NMDA (**Figura 28b**). En vista de estos resultados y teniendo en cuenta que el Ca^{2+} juega un papel crucial en este mecanismo de regulación, se quiso analizar la contribución del retículo endoplásmico en los cambios de las $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Para este análisis, se incubaron los astrocitos con NMDA en ausencia de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_{e.c.}=0$). Como se muestra en la **Figura 28c**, el NMDA incrementó las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante un periodo limitado, después del cual el inhibidor de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico, tapsigargina, no tuvo efecto. Sin embargo, la incubación de los astrocitos bajo $[\text{Ca}^{2+}]_{e.c.}=0$ con tapsigargina y en ausencia de NMDA incrementó las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de forma transitoria. Después de este periodo, la adición de NMDA (20 μM) no tuvo efecto sobre las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (**Figura 28d**). Por lo tanto, la aparición de las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en los astrocitos tratados con NMDA tiene su origen en el retículo endoplásmico. Todos estos resultados revelan la participación de la PLC en la vía de señalización mediada por NMDARs y el posible papel del Ca^{2+} en el mantenimiento de la actividad de la vía PLC-PKC δ .

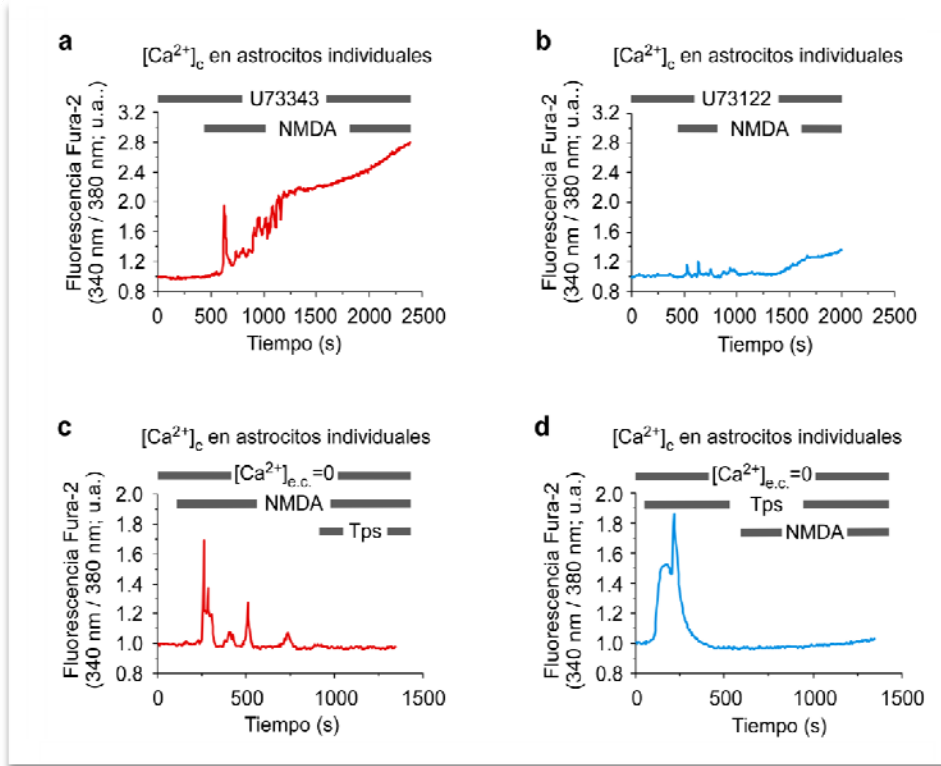


Figura 28. La activación de la PLC por estimulación fisiológica de NMDARs desencadena la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico. (a) Los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), seguidos del tratamiento con NMDA ($20 \mu\text{M}$) en astrocitos individuales, reveló que el inhibidor inactivo de la PLC, U73343, era incapaz de alterar los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mediados por NMDA. (b) El inhibidor activo de la PLC, U73122, abolió el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ inducido por NMDA ($20 \mu\text{M}$). (c) Los astrocitos incubados con NMDA ($20 \mu\text{M}$) en ausencia de Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_{e.c.}=0$), presentaron un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante un periodo limitado, después del cual, el inhibidor de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico, tapsigargina (Tps, $1 \mu\text{M}$), no tuvo efecto. (d) La incubación de los astrocitos con Tps incrementó la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transitoriamente. Después de este periodo, la adición del NMDA ($20 \mu\text{M}$) no tuvo efecto sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

16. LA VÍA ANTIOXIDANTE NRF2 MEDIADA POR NMDA EN ASTROCITOS PROTEGE A LAS NEURONAS FRENTE A ESTRÉS.

Para determinar las implicaciones fisiológicas de nuestros resultados, nos propusimos investigar si la activación de la respuesta antioxidante de NRF2 mediada por NMDA desencadenaba protección neuronal. La incubación de las neuronas con 20 μ M de NMDA durante 8 h no alteró su concentración de glutatión (GSH) como se indica en la **Figura 29a**. Esto sugiere que la estimulación de la vía de NRF2 en neuronas es insuficiente para mejorar su estatus antioxidante. Sin embargo, el NMDA, añadido en las mismas condiciones, sí incrementó la concentración de GSH en los astrocitos (**Figura 29b**).

Trabajos publicados con anterioridad [Bolaños *et al.*, 1996; Dringen *et al.*, 1999b; Díaz-Hernández *et al.*, 2005], han demostrado que los astrocitos suministran precursores del GSH (glutamina, cisteína y glicina) a las neuronas para su biosíntesis *de novo*. Por lo tanto, nos planteamos la posibilidad de que la activación de la vía CDK5-NRF2, descrita en este trabajo, mediada por la señalización de NMDARs en los astrocitos, pudiera satisfacer las demandas neuronales de glutatión durante la neurotransmisión. Para abordar esta hipótesis, se realizaron co-cultivos de astrocitos y neuronas que se incubaron en presencia de NMDA 20 μ M. Después de 8 horas de incubación, las neuronas se separaron de los astrocitos y se analizaron. Como se observa en la **Figura 29c**, la concentración de GSH en las neuronas, después de estar en contacto con los astrocitos, fue ~ 3 veces mayor en comparación con la de las neuronas incubadas sin astrocitos (**Figura 29a**). Curiosamente, el tratamiento con NMDA, que en las neuronas solas no alteró las concentración de GSH (**Figura 29a**), promovió un incremento de ~ 2 veces de la concentración de GSH neuronal en co-cultivo con astrocitos (**Figura 29c**). Este efecto fue dependiente de CDKs, ya que la roscovitina previno el incremento en los niveles de GSH neuronal mediado por NMDA (**Figura 29c**). Además el tratamiento con acivicina, un inhibidor específico de la γ -glutamyltranspeptidasa [Stole & Meister, 1991; Dringen *et al.*, 1997a], responsable de la liberación de los precursores de GSH desde los astrocitos, previno el incremento de la

concentración de GSH mediado por NMDA en las neuronas en cocultivo (Figura 29d). Por lo tanto, la señalización de NMDARs en los astrocitos desencadena la liberación de los precursores de GSH, lo que conduce a un incremento de la concentración del antioxidante en las neuronas adyacentes.

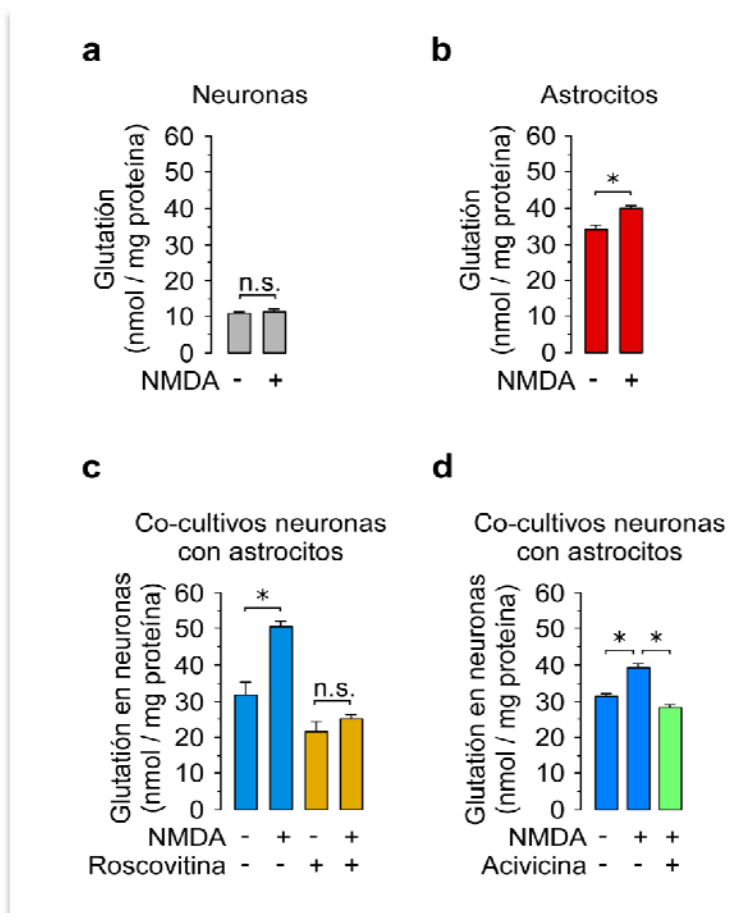


Figura 29. La activación de la vía CDK5-NRF2 mediada por NMDA en los astrocitos incrementa la concentración de GSH en las neuronas co-cultivadas. (a) El NMDA (20 μ M, 8 horas) no alteró la concentración de GSH en las neuronas. (b) El NMDA (20 μ M, 8 horas) incrementó significativamente la concentración de GSH en los astrocitos. (c) La incubación de las neuronas con astrocitos en co-cultivo durante 8 horas, incrementó la concentración de GSH neuronal \sim 3 veces en comparación con las neuronas cultivadas solas (panel a). La incubación de los co-cultivos de neuronas y astrocitos con NMDA (20 μ M, 8 horas) incrementó en \sim 1.7 veces la concentración de GSH en las neuronas, un efecto que se previno con la roscovitina (10 μ M). (d) La incubación de los co-cultivos de neuronas y astrocitos con acivicina (100 μ M) previno el incremento de la concentración de GSH neuronal mediado por NMDA (20 μ M, 8 horas). Los datos se expresan como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student para paneles a, b, c y ANOVA seguido del test de Bonferroni para panel d; $n = 3$ experimentos independientes).

A continuación, nos propusimos de determinar si el suministro de los precursores de GSH desde los astrocitos hacia las neuronas afectaba a la vulnerabilidad neuronal frente a estrés oxidativo. Como se muestra en la **Figura 30a**, la incubación de las neuronas con H_2O_2 (400 μM) durante 1 hora, tras ser co-cultivadas con astrocitos, promovió muerte neuronal por apoptosis. Sin embargo, la apoptosis fue abolida por la presencia de NMDA durante el co-cultivo, efecto que fue rescatado por la acivicina (**Figura 30a**). Por lo tanto, la disponibilidad del GSH y la supervivencia neuronal, tras la señalización de NMDARs en los astrocitos, dependen del suministro de los precursores de GSH desde los astrocitos hacia las neuronas.

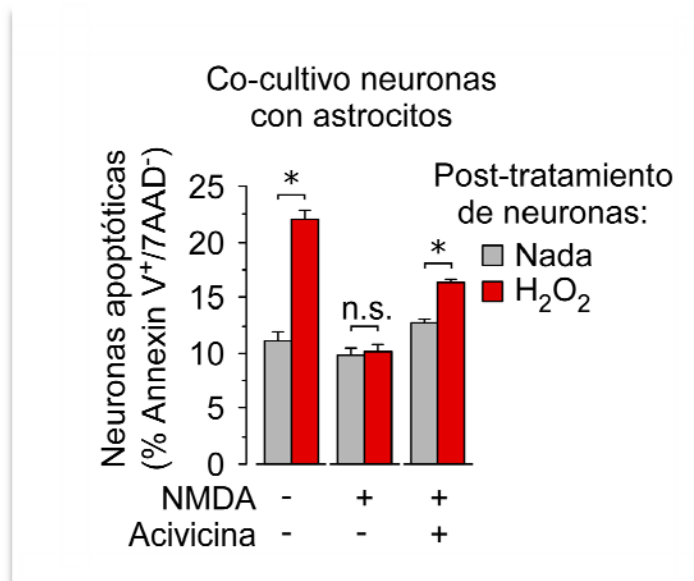


Figura 30. El suministro de los precursores del GSH desde los astrocitos, mediado por NMDA, proporciona una mayor supervivencia neuronal frente a estrés oxidativo. La incubación de las neuronas con H_2O_2 (400 μM , 1 hora), tras un periodo de 8 horas de co-incubación con astrocitos, incrementó significativamente la muerte neuronal por apoptosis. La presencia de NMDA (20 μM) durante la co-incubación, dio lugar a neuronas más resistentes a la agresión del H_2O_2 . Sin embargo, esta resistencia se perdió con la presencia de acivicina. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M., * $p < 0.05$ (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes)

Para evaluar si la protección neuronal mediada por la señalización de NMDARs en los astrocitos dependía de la vía de transducción CDK5-NRF2, se silenció *Nrf2* (Figura 16a y b) o *Cdk5* (Figura 20a) en los astrocitos antes de que fueran co-cultivados con las neuronas. Como se muestra en las Figuras 31a y b, el silenciamiento, tanto de *Nrf2* como de *Cdk5*, abolió el efecto neuroprotector de la señalización de NMDARs.

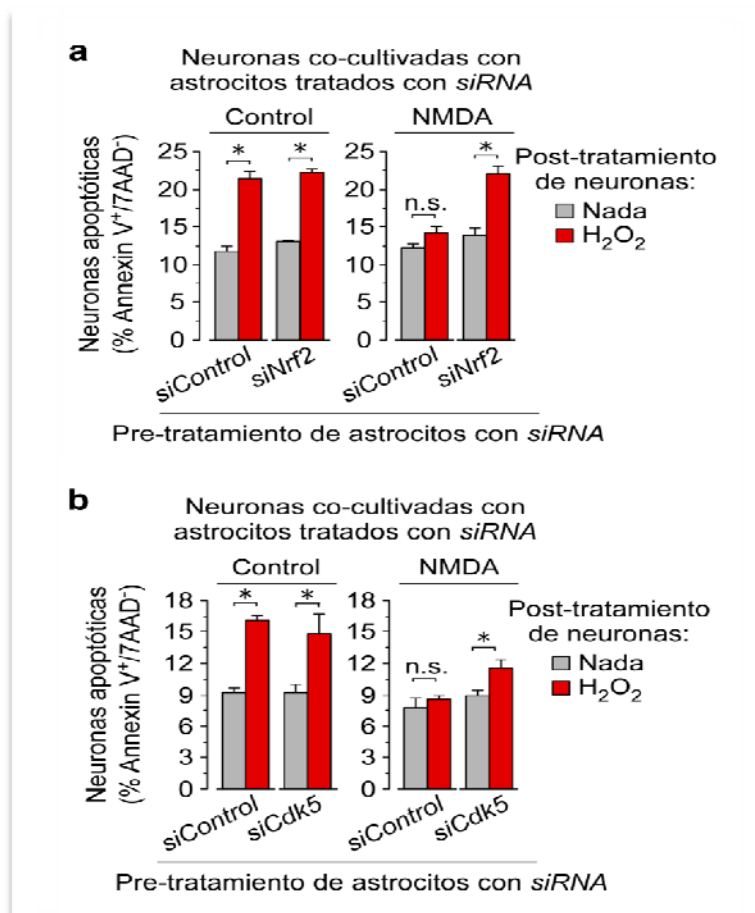


Figura 31. La activación de la vía de transducción CDK5-NRF2 mediada por la estimulación de NMDARs en los astrocitos incrementa la supervivencia neuronal frente a estrés oxidativo. La incubación de las neuronas con H₂O₂ (400 μM, 1 hora), tras un periodo de 8 horas de co-incubación con astrocitos, incrementó la apoptosis neuronal si los astrocitos en co-cultivo eran transfectados con siControl, pero la presencia de NMDA (20 μM) durante el co-cultivo previno este efecto. Sin embargo, el silenciamiento de *Nrf2* (siNrf2, panel a) o el de *Cdk5* (siCdk5, panel b) en astrocitos antes del co-cultivo, fue incapaz de prevenir la apoptosis neuronal inducida por H₂O₂, independientemente de la presencia de NMDA durante el co-cultivo. Los datos se expresan como la media ±S.E.M., * p<0.05 (test t-Student; n=3 experimentos independientes).

La presencia de H_2O_2 causó una disminución del $\Delta\psi_m$ neuronal después de que las neuronas fuesen cocultivadas con los astrocitos. Sin embargo, este efecto fue abolido si el co-cultivo de astrocitos y neuronas era tratado previamente con NMDA (**Figura 32**).

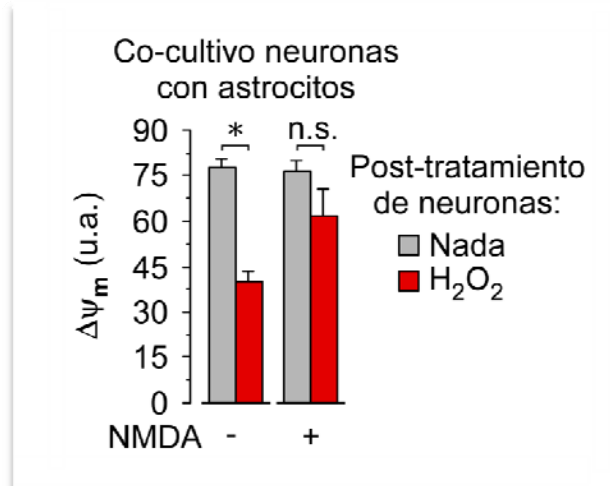


Figura 32. La estimulación fisiológica y sostenida de NMDARs en cocultivos de neuronas y astrocitos revirtió el $\Delta\psi_m$ neuronal tras el estímulo pro-oxidante de H_2O_2 . La incubación de las neuronas con H_2O_2 (400 μM , 1 hora), tras un periodo de 8 horas de co-incubación con astrocitos, disminuyó sustancialmente el potencial de membrana interna mitocondrial ($\Delta\psi_m$) neuronal, efecto que fue abolido si el NMDA (20 μM) estaba presente durante el periodo de co-incubación. Los datos se expresan como la media \pm S.E.M, * $p < 0.05$ (test t-Student; $n=3$ experimentos independientes).

Finalmente, se observó mediante el ensayo de *Amplex Red*, que el incremento en la formación de H_2O_2 desencadenado por el estímulo excitotóxico (glutamato 100 μM / 15 minutos) sobre las neuronas, se previno con el tratamiento de NMDA (20 μM , 8 horas) en el co-cultivo de neuronas y astrocitos. Sin embargo, ni el silenciamiento de *Nrf2*, o de *Cdk5* en los astrocitos, previo al co-cultivo con las neuronas, fue capaz de rescatar la protección neuronal, mediada por NMDA frente a la formación de H_2O_2 inducida por glutamato. Por lo tanto, la vía de transducción CDK5-NRF2 durante la señalización de NMDARs en los astrocitos mantiene la protección antioxidante y la supervivencia de las neuronas.

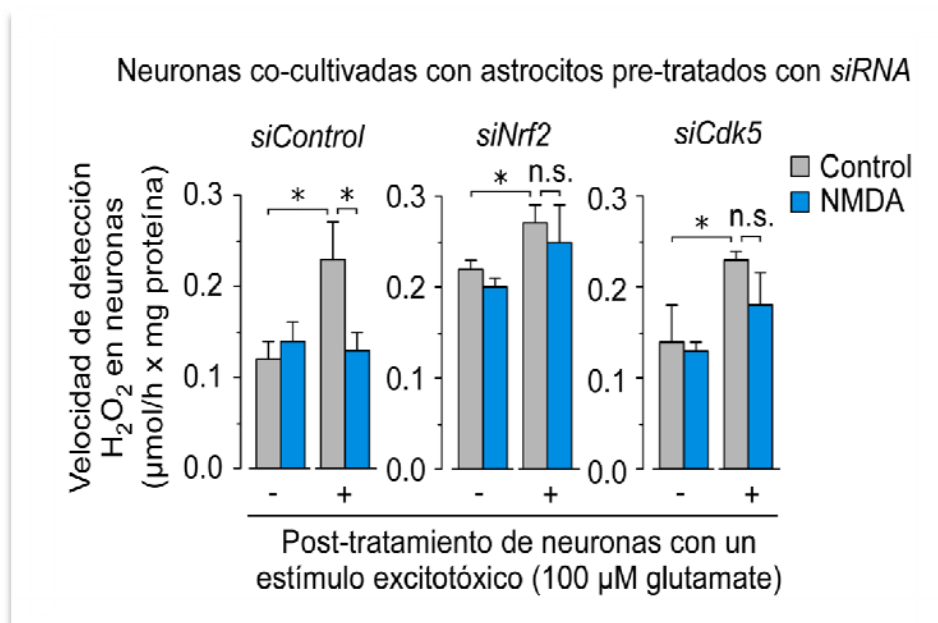


Figura 33. La activación de la vía de transducción CDK5-NRF2 mediada por la estimulación de NMDARs en los astrocitos reduce la formación de ROS en las neuronas. Tras 8 horas de incubación de las neuronas con los astrocitos en co-cultivo (ya sea en ausencia o presencia de NMDA 20 µM), los astrocitos se retiraron y las neuronas se incubaron adicionalmente (o no) con glutamato (100 µM/15 minutos, seguido de 1 hora en DMEM) (post-tratamiento con un estímulo excitotóxico). Este estímulo excitotóxico incrementó la formación de H₂O₂, efecto que fue prevenido si el NMDA estaba presente durante el periodo de co-cultivo. Sin embargo, el NMDA fue incapaz de impedir el incremento de H₂O₂ inducido por glutamato si Nrf2 o Cdk5 eran silenciados (siNrf2 o siCdk5) en los astrocitos antes de ser co-cultivados con las neuronas. Los datos se expresan como la media ±S.E.M., * $p < 0.05$ (ANOVA seguido del test de Bonferroni; $n = 3$ experimentos independientes).

A microscopic image showing numerous green fluorescent cells, likely bacteria or yeast, against a black background. The cells are scattered throughout the frame, with some appearing as bright green spots and others as more complex, branching structures. The overall appearance is that of a dense population of microorganisms.

Discusión

" El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito, y para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea ".

Alexander Fleming

1. LA INSUFICIENTE RESPUESTA ANTIOXIDANTE NEURONAL SE DEBE A LA CONTINUA DESESTABILIZACIÓN DE NRF2 Y A LA BAJA DISPONIBILIDAD DE PRECURSORES DE GSH

A pesar de que el sistema antioxidante mediado por NRF2 se expresa en neuronas, donde es susceptible a la regulación dependiente de NMDARs, nuestros datos demuestran que es claramente insuficiente para proporcionarles protección antioxidante, incluso en presencia de los astrocitos. Por lo tanto, nuestros resultados podrían explicar el enigma de la débil capacidad antioxidante de las neuronas en comparación con los astrocitos. Esto puede deberse a la estricta regulación negativa a la que está sometido el factor de transcripción NRF2 en las neuronas.

Por otro lado, cabe mencionar que, a pesar de que las neuronas disponen de toda la maquinaria para sintetizar glutatión, carecen de los precursores (Gln, Gly y Cys) necesarios para la síntesis del tripéptido [Sagara *et al.*, 1996; Dringen, 2000; Bolaños & Heales, 2010] Así, los astrocitos aportan una función esencial en el mantenimiento de la respuesta antioxidante neuronal. Aunque *Cul3* se silenció en las neuronas y se consiguieron niveles de NRF2 muy similares a los de astrocitos, su respuesta antioxidante siguió siendo insuficiente. Por consiguiente, la limitación tanto del suministro de los precursores del GSH como de la capacidad de las neuronas para usarlos, provoca estrés oxidativo y, eventualmente, neurodegeneración [Jenner *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 1982].

Es interesante resaltar que la proteína E3-ubiquitina ligasa CUL3 no es solo importante para la regulación de la respuesta antioxidante celular mediada por NRF2, sino que es imprescindible en la regulación de la arborización dendrítica neuronal y diferenciación neuronal [Djagaeva & Doronkin, 2009; Sobieszczuk, 2012]. Es posible que la elevada expresión de CUL3 en neuronas contribuya decisivamente al mantenimiento del estado altamente diferenciado que caracteriza a estas células. De ser así, la continua desestabilización de NRF2 por CUL3 podría interpretarse como un indeseable, a la vez que necesario, efecto secundario de la elevada especialización neuronal.

2. LA ESTIMULACIÓN FISIOLÓGICA Y SOSTENIDA DE NMDAR EN LOS ASTROCITOS INCREMENTA LA ACTIVIDAD DE p35/CDK5 EN EL CITOSOL

El mecanismo de regulación de NRF2 aquí descrito no implica la conversión del cofactor p35 a p25, un fenómeno que ya se describió previamente en nuestro laboratorio en neuronas tratadas con concentraciones excitotóxicas de NMDA [Maestre *et al.*, 2008]. Bajo nuestras condiciones, la moderada entrada de Ca^{2+} a través de los NMDARs no parece que active a las calpaínas responsables de la proteólisis de p35 a p25 en neuronas o astrocitos. Además, cuando se realizó el ensayo de actividad de CDK5 en los compartimentos citosólico y nuclear, únicamente se observó fosforilación de H1 en el compartimento citosólico. Por ello, deducimos que es la forma citosólica de CDK5 (p35/CDK5) la responsable de la poli-fosforilación de NRF2, que desencadena su translocación nuclear para la activación de la respuesta antioxidante. Estos datos son compatibles con la actividad fisiológica y citosólica de p35/CDK5 [Lee, 1996; Zhu, 2005; Hisanaga, 2010], que se la ha relacionado con la supervivencia neuronal [Endo *et al.*, 2009].

Dado que la PKC δ es insensible a Ca^{2+} [Kikkawa *et al.*, 2002], y puesto que este catión es imprescindible en el mecanismo de activación transcripcional de NRF2 según lo detallado en este trabajo, no podemos descartar un mecanismo adicional de activación de p35/CDK5 independiente de la vía PLC-PKC δ . Así, de acuerdo a trabajos anteriores [Dhavan *et al.*, 2002; He *et al.*, 2008], la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} - Calmodulina (CAMKII) es capaz de interactuar, de manera dependiente de Ca^{2+} , con p35, regulando su estabilidad. Además esta interacción se potencia tras la activación de NMDARs. Este mecanismo de regulación de la estabilidad de p35 podría ser compatible y simultáneo con el mediado por la vía de señalización PLC-PKC δ descrita en este trabajo, de forma que ambos mantendrían el complejo p35/CDK5 activo en el citosol para fosforilar y activar NRF2.

3. EL Ca^{2+} ES IMPRESCINDIBLE PARA LA ACTIVACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA VÍA NMDAR-PLC-PKC δ EN LOS ASTROCITOS

El mecanismo molecular específico que integra la actividad del receptor de NMDA con la vía PLC-PKC δ en los astrocitos queda aún por dilucidar. Nuestros resultados muestran que el NMDA desata la activación de PLC dependiente de Ca^{2+} , efecto que ya ha sido reportado anteriormente en las neuronas [Nagasawa et al., 2004]. En astrocitos, nuestros datos muestran que la PLC promueve la liberación del catión desde el retículo sarcoplásmico a través de canales dependientes de IP_3 , como demuestran los experimentos con el inhibidor de las bombas SERCA, tapsigargina. Este fenómeno es compatible con el efecto observado en las neuronas [Young et al., 2004], donde el Ca^{2+} liberado desde el retículo impulsa la activación de PLC en un ciclo de retroalimentación positiva. Esta vía de transducción de señales podría ser activada por la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores ionotrópicos de NMDA en los astrocitos, mientras que el *feedback* entre el Ca^{2+} , procedente del retículo, y la PLC, serían responsables de la estimulación mantenida de la PKC δ .

4. LOS DIFERENTES MECANISMOS DE REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE NRF2 GARANTIZAN UNA RESPUESTA ANTIOXIDANTE CELULAR MÁS EFICIENTE

Se sabe que NRF2 se fosforila en la Ser40 por la PKC δ [Niture et al., 2009; Bloom et al., 2003], lo que constituye un paso necesario, pero no suficiente, para desencadenar la translocación nuclear de NRF2. Nuestros datos resaltan el crítico papel que desempeña, en los astrocitos, la PKC δ en la respuesta antioxidante mediada por NRF2. Esta kinasa es capaz de coordinar, por un lado, la fosforilación directa de la Ser40 de NRF2 [Niture et al., 2009; Bloom et al., 2003], y por el otro, la triple fosforilación de los residuos Thr395, Ser433 y Thr439, mediada por p35/CDK5 (este trabajo). Cabe destacar que estos residuos de NRF2 no parecen ser los únicos fosforilados por p35/CDK5, ya

que al realizar el ensayo de fosforilación *in vitro*, se observó que la forma fosfodeficiente de NRF2 en estos tres residuos aún presentaba una ligera fosforilación. Esto sugiere la existencia de algún otro residuo en la secuencia de NRF2 susceptible a la fosforilación por esta Ser/Thr kinasa. Además, se sabe que el mecanismo de acetilación/desacetilación también es capaz de regular la actividad transcripcional de NRF2, permitiendo su translocación nuclear [Kawai *et al.*, 2010]. Esta compleja regulación de NRF2 puede proporcionar múltiples oportunidades de amplificación de la señal, lo que representa una gran ventaja para garantizar una respuesta antioxidante más eficiente que conlleve a la supervivencia neuronal.

5. FUNCIÓN DE LOS NMDARs EN ASTROCITOS.

Nuestros resultados apoyan la idea de que los astrocitos desempeñan un papel activo e imprescindible durante la neurotransmisión [Perea & Araque, 2005]. A través de sus NMDARs, los astrocitos detectan la actividad glutamatérgica y responden a ella sustentando la protección antioxidante de las neuronas (este trabajo). Así, esta nueva vía de transducción de señales podría revelar una función concreta de los NMDARs en los astrocitos [Schipke *et al.*, 2001]. Por otro lado, sería interesante determinar si el mecanismo molecular descrito en este trabajo explica el efecto neuroprotector del precondicionamiento isquémico [Bell *et al.*, 2011]. Dado que este precondicionamiento isquémico depende de la actividad transcripcional de NRF2 en los astrocitos [Bell *et al.*, 2011], nuestros datos apoyarían fuertemente esta idea.

Finalmente, con este trabajo se resalta la importancia de los NMDARs de los astrocitos en procesos clave para el funcionamiento del SNC, tales como neurotransmisión o plasticidad sináptica. Un conocimiento exhaustivo de estos receptores en los astrocitos nos ayudaría a encontrar nuevas dianas terapéuticas frente a las numerosas patologías cerebrales graves en las que están implicados.

6. POSIBLE IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN CDK5-NRF2 EN CÁNCER

Nuestros resultados sugieren que p35/CDK5 podría colaborar en múltiples funciones adicionales además de la protección antioxidante como, por ejemplo, la regulación de la proliferación, elongación, alargamiento y migración de los procesos astrocíticos para la formación de la conocida cicatriz glial, producida tras una lesión mecánica. El complejo p35/CDK5 se sobre-expresa en los astrocitos tras una lesión producida mecánicamente por raspado, y co-localiza con las proteínas GFAP y tubulina para controlar la morfología de estas células gliales [He *et al.*, 2007]. No obstante, estas posibles funciones deben investigarse específicamente.

La vía de señalización CDK5-NRF2 que aquí describimos parece ser ubicua, dado que se observa al menos en dos tipos celulares. Puesto que NRF2 es una proteína que se encuentra incrementada en muchos tipos de células cancerosas [Hayes & McMahon, 2009; DeNicola *et al.*, 2011; Jaramillo & Zhang 2013], se podría especular que CDK5, que contribuye a la progresión del cáncer [Liang *et al.*, 2013], podría mantener la actividad antioxidante de NRF2 y la supervivencia de estas células. Además, NRF2 presenta un papel crucial en cáncer ya que protege a las células cancerosas frente a agentes quimio y radioterapéuticos, favoreciendo la progresión de la enfermedad [Singh *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010]. La posible implicación de esta vía de señalización en cáncer la convierte en una potencial diana terapéutica para combatir esta enfermedad.

A microscopic image of neurons, likely from a rat brain, showing cell bodies and dendrites. The neurons are stained with a green fluorescent dye, and several cell bodies are highlighted with bright blue or cyan spots, possibly indicating specific markers or active regions. The background is dark, making the glowing structures stand out.

Conclusiones

*" El experimentador que no sabe lo que está buscando
no comprenderá lo que encuentra ".*

Claude Bernard

A la vista de los resultados presentados en este trabajo, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. El factor de transcripción NRF2 se degrada continuamente en neuronas por acción de CUL3, lo que explica la débil expresión de NRF2 y capacidad antioxidante de las neuronas en comparación con los astrocitos.
2. La activación fisiológica de los receptores de NMDA en astrocitos desencadena una vía de transducción de señal que conduce a la translocación de NRF2 al núcleo, donde promueve la expresión de genes antioxidantes.
3. El mecanismo molecular responsable de la activación de NRF2 por estimulación de receptores de NMDA en astrocitos implica la activación, Ca^{2+} dependiente, de PLC que activa PKC δ , la cual mantiene a p35 fosforilado y unido a CDK5 en el citosol. El complejo p35/CDK5 activo fosforila NRF2 en los residuos Thr-395, Ser-433 y Thr-439, lo que contribuye a su translocación al núcleo.
4. La estimulación de receptores de NMDA en astrocitos mediante la activación de la vía de señalización descrita suministra precursores de glutatión a las neuronas adyacentes, a las que protege frente al daño oxidativo.



Bibliografía

" Nuestra victoria se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una recompensa completa ".

Mahatma Gandhi

Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J. W. Wang, Y. T., Salter, M. W., and Tymianski, M. (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science*. **298**: 846-850.

Agarwal, M. L., Larkin, H. E., Zaidi, S. I., Mukhtar, H., Oleinick, N.L. (1993). Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. *Cancer Res* **53**: 5897-5902.

Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J. Comp. Neurol.* **347**: 150-160.

Almeida, A. & Bolanos, J.P. (2001). A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* **77**: 676-690.

Almeida, A., Heales, S. J., Bolanos, J. P., and Medina, J. M. (1998). Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res* **790**: 209-216.

Almeida, A., Moncada, S., Bolanos, J. P. (2004). Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* **6**: 45-51.

Anderica-Romero, A. C., Gonzalez-Herrera, I. G. Santamaria, A. Pedraza-Chaverri, J. (2013). Cullin 3 as a novel target in diverse pathologies. *Redox Biol* **1**: 366-372.

Aoki, C., Venkatesan, C., Go, C.G., Mong, J.A., Dawson, T.M. (1994). Cellular and subcellular localization of NMDA-R1 subunit immunoreactivity in the visual cortex of adult and neonatal rats. *J. Neurosci.* **14**: 5202-5222.

Apopa, P. L., He, X. Ma, Q. (2008). Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol* **22**: 63-76.

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G. (2001). Dynamic signaling between neurons and glia. *Annu Rev Physiol* **63**:795–813.

Araque, A. & Perea, G. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* **47**: 241-248.

Araujo, I. M., Carreira, B. P., Pereira, T., Santos, P. F., Soulet, D., Inacio, A., Bahr, B. A., Carvalho, A. P., Ambrosio, A. F., Carvalho, C. M. (2007). Changes in calcium dynamics following the reversal of the sodium-calcium exchanger have a key role in AMPA receptor-mediated neurodegeneration via calpain activation in hippocampal neurons. *Cell Death Differ* **14**: 1635-1646.

Backus, K. H., Kettenmann, H., Schachner, M (1989). Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* **22**: 274-282.

Ballatori, N., Krance, S. M., Marchan, R., Hammond, C. L. (2009). Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med* **30**: 13-28.

Bano, D., Young, K. W., Guerin, C. J., Lefevre, R., Rothwell, N. J. Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., Nicotera, P. (2005). Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* **120**: 275-285.

Bell, K. F., Al-Mubarak, B. et al. (2011). Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E1-2; author reply E3-4.

Benassi, B., Fanciulli, M., Fiorentino, F., Porrello, A., Chiorino, G., Loda, M., Zupi, G., Biroccio, A. (2006). c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol Cell* **21**: 509-19.

Beresewicz, M., Kowalczyk, J. E., Zablocka, B. (2006). Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate and ryanodine receptors in vivo after transient brain ischemia in gerbils. *Neurochem Int* **48**: 568-571.

Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B., Pozzan, T., Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate Ca^{2+} -dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* **391**:281–285.

Bloom, D. A., Jaiswal, A. K. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* **278**: 44675-44682.

Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T., Snyder, S. H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**: 1051-1061.

Bolanos, J. P. & Heales, S. J. (2010). Persistent mitochondrial damage by nitric oxide and its derivatives: neuropathological implications. *Front Neuroenergetics* **2**: 1.

Bolanos, J. P., Heales, S. J., Peuchen, S., Barker, J. E., Land, J.M., Clark, J. B. (1996). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med* **21**: 995-1001.

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

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J. P. (1995). 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.

Boveris, A. (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* **105**: 429-35.

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

Broadstock, M., Austin, P. J., Betts, M. J., Duty, S. (2012). Antiparkinsonian potential of targeting group III metabotropic glutamate receptor subtypes in the rodent substantia nigra pars reticulata. *Br J Pharmacol* **165**: 1034-1045.

Bruno, V., Battaglia, G., Kingston, A., O'Neill, M. J., Catania, M. V., Di Grezia, R., Nicoletti, F. (1999). Neuroprotective activity of the potent and selective mGlu1a metabotropic glutamate receptor antagonist, (+)-2-methyl-4 carboxyphenylglycine (LY367385): comparison with LY357366, a broader spectrum antagonist with equal affinity for mGlu1a and mGlu5 receptors. *Neuropharmacology* **38**: 199-207.

Brustovetsky, T., Bolshakov, A., Brustovetsky, N. (2010). Calpain activation and Na⁺/Ca²⁺ exchanger degradation occur downstream of calcium deregulation in hippocampal neurons exposed to excitotoxic glutamate. *J Neurosci Res* **88**: 1317-1328.

Butcher, S. P. & Hamberger, A. (1987). In vivo studies on the extracellular, and veratrine-releasable, pools of endogenous amino acids in the rat striatum: effects of corticostriatal deafferentation and kainic acid lesion. *J Neurochem* **48**: 713-721.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., Barres, B.A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* **28**: 264-278.

Castellano, C., Cestari, V. Ciamei, A. (2001). NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets* **2**: 273-283.

Cazanave, S., Berson, A., Haouzi, D., Vadrot, N., Fau, D., Grodet, A., Letteron, P., Feldmann, G., El-Benna, J., Fromenty, B., Robin, M. A. Pessayre, D. (2007). High hepatic glutathione stores alleviate fas-induced apoptosis in mice. *J Hepatol* **46**: 858-868.

Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., Zhang, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**: 793-798.

Chen Y., Shertzer H.G., Schneider S.N., Nebert D.W., Dalton T.P. (2005). Glutamate cysteine ligase catalysis: Dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. *J Biol Chem* **280**: 33766-33774.

Cheng, K. & Ip, N. Y (2003). Cdk5: a new player at synapses. *Neurosignals* **12**: 180-190.

Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K. K., Barnes, J. M., Collingridge, G.L., Henley, J. M. (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* **379**: 78-81.

Cho, H. Y., Reddy, S. P., Debiase, A., Yamamoto, M., Kleeberger, S. R. (2005). Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury. *Free Radic Biol Med* **38**: 325-343.

Choi D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* **7**: 369-379.

Choo, A. M., Geddes-Klein, D. M., Hockenberry, A., Scarsella, D., Mesfin, M. N., Singh, P., Patel, T. P., Meaney, D. F. (2012). NR2A and NR2B subunits differentially mediate MAP kinase signaling and mitochondrial morphology following excitotoxic insult. *Neurochem Int* **60**: 506-516.

Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S., Sevarino, K. A. (1995). Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* **15**: 6498-6508.

Circu M. L., & Aw T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**: 749-762.

Clark, J., & Simon, D. K. (2009). Transcribe to survive: transcriptional control of antioxidant defense programs for neuroprotection in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* **11**: 509-528.

Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W., Ting, J. P. (2006). DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15091-15096.

Collins, M. O., Husi, H., Yu, L., Brandon, J. M., Anderson, C. N., Blackstock, W. P., Choudhary, J. S., Grant, S. G. (2006). Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem* **97 Suppl 1**: 16-23.

Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Melone, M. (1996) Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* **17**, 254-258

Cope, G. A., & Deshaies, R. J. (2003). COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell* **114**: 663-671.

- Copple, I. M., Goldring, C. E., Kitteringham, N. R., Park, B. K.** (2008). The Nrf2-KEAP1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* **246**: 24-33.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. & Smith, S. J.** (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long range signalling. *Science* **247**, 470-473.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., Diehl, J. A.** (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* **23**: 7198-7209.
- Cullinan, S. B., Gordan, J. D., Jin, J., Harper, J. W., Diehl, J. A.** (2004). The KEAP1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a CUL3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a CUL3-KEAP1 ligase. *Mol Cell Biol* **24**: 8477-8486.
- Dalton TP, Chen Y, Schneider S. N., Nebert D. W. & Shertzer H. G.** (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med* **37**: 1511-1526.
- D'Autreaux B & Toledano M. B.** (2007). Ros as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in Ros homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 813-824.
- Delgado-Esteban, M., Almeida, A., Bolanos, J. P.** (2000). D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *J Neurochem* **75**: 1618-1624.
- DeNicola, G. M., Karreth, F. A. et al.** (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**: 106-109.

Devesa A, O'Connor J. E., Garcia C, Puertes I. R., Vina J. R. (1993). Glutathione metabolism in primary astrocyte cultures: Flow cytometric evidence of heterogeneous distribution of GSH content. *Brain Res* **618**: 181-189.

Dhakshinamoorthy, S., Jain, A. K., Bloom, D. A., Jaiswal, A. K. (2005). BACH1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J Biol Chem* **280**: 16891-16900.

Dhavan, R., Greer, P. L., Morabito, M. A., Orlando, L. R., Tsai, L. H. (2002). The cyclin-dependent kinase 5 activators p35 and p39 interact with the alpha-subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and alpha-actinin-1 in a calcium-dependent manner. *J Neurosci* **22**: 7879-7891.

Díaz-Hernández J. I., Almeida A, Delgado-Esteban M, Fernández E & Bolanos JP. (2005). 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.

Diaz-Hernandez JI, Moncada S, Bolanos JP & Almeida A. (2007). Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 protects neurons against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Differ* **14**: 1211-1221.

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of KEAP1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11908-11913.

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Wakabayashi, N. (2005). KEAP1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **44**: 6889-6899.

Djagaeva, I. & Doronkin, S. (2009). COP9 limits dendritic branching via Cullin3-dependent degradation of the actin-crosslinking BTB-domain protein Kelch. *PLoS One* **4**: e7598.

Dong, X. X., Wang, Y., Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* **30**: 379-387.

Douglas K. T. (1987). Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **59**: 103-167.

Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr. Neurobiol.* **62**: 649-671.

Dringen R., Gutterer J. M., Gros C., Hirrlinger J. (2001). Aminopeptidase N mediates the utilization of the GSH precursor CysGly by cultured neurons. *J Neurosci Res* **66**: 1003-1008.

Dringen R., & Hirrlinger J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* **384**: 505-516.

Dringen R., Kranich O., Hamprecht B. (1997a). The γ -glutamyl-transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem. Res.* **22**: 727-733.

Dringen R., Kranich O., Löschmann P. A., Hamprecht B. (1997b). Use of dipeptides for the synthesis of glutathione by astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem.* **69**: 868-874.

Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J. M., Hirrlinger, J., Hamprecht, B. (1999b). The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* **72**: 2523-2530.

Dringen R., Pfeiffer B., Hamprecht B. (1999a). Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: Supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J. Neurosci.* **19**: 562-569.

Dringen, R., Scheiber, I. F., Mercer, J. F. (2013). Copper metabolism of astrocytes. *Front Aging Neurosci* **5**: 9.

Dubiel W. (2009). Resolving the CSN and CAND1 paradoxes. *Mol Cell* **35**: 547-549.

Dzamba, D., Honsa, P., Anderova, M. (2013). NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Curr Neuropharmacol* **11**: 250-262.

Emile, L., Mercken, L., Apiou, F., Pradier, L., Bock, M. D., Menager, J., Clot, J., Doble, A., Blanchard, J. C. (1996). Molecular cloning, functional expression, pharmacological characterization and chromosomal localization of the human metabotropic glutamate receptor type 3. *Neuropharmacology* **35**: 523-530.

Endo R., Saito T., Asada A., Kawahara H., Ohshima T., Hisanaga S. (2009) Commitment of MPP⁺-induced neuronal cell death by proteasome-mediated degradation of p35 Cdk5 activator. *J. Biol.Chem.* **284**, 26029–26039.

Estrada-Sánchez, A. M., Montiel, T., Segovia, J., Massieu, L. (2009). Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. *Neurobiol Dis* **34**: 78-86.

Fernández-Fernández, S., Almeida, A., Bolanos, J. P. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *Biochem J* **443**: 3-11.

Flohe L. (2009). The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1389-1403.

Flohe L., Gunzler W., Jung G., Schaich E., Schneider F. (1971). [glutathione peroxidase. li. Substrate specificity and inhibitory effects of substrate analogues]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **352**: 159-169.

Foo, L. C. (2013). Purification of rat and mouse astrocytes by immunopanning. *Cold Spring Harb Protoc* **2013**: 421-432.

Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H. D., Ng, L., Luk, D. C., Sheng, M., Stewart, C. L., Morgan, J. I., Connor, J. A., Curran, T. (1994). Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* **13**: 325-338.

Franco R., & Cidlowski J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* **16**: 1303-1314.

Franklin C. C., Krejsa C. M., Pierce R. H, White C. C., Fausto, N. Kavanagh T. J. (2002). Caspase-3-dependent cleavage of the glutamate-l-cysteine ligase catalytic subunit during apoptotic cell death. *Am J Pathol* **160**: 1887-1894.

Furukawa, M., & Xiong, Y. (2005). BTB protein KEAP1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol* **25**: 162-171.

Gan, L., Johnson, D. A., Johnson, J. A. (2010). KEAP1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1. *Eur J Neurosci* **31**: 967-977.

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

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

Gassen, M., Pinchasi, B., Youdim, M. B. (1998). Apomorphine is a potent radical scavenger and protects cultured pheochromocytoma cells from 6-OHDA and H₂O₂-induced cell death. *Adv Pharmacol* **42**: 320-324.

Gegg, M. E., Beltrán, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J. P., Clark, J. B., Moncada, S., Heales, S. J. (2003). Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurons: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem* **86**: 228-237.

Glodzik, L., King, K. G., Gonen, O., Liu, S., De Santi, S., de León, M. J. (2008). Memantine decreases hippocampal glutamate levels: a magnetic resonance spectroscopy study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **32**: 1005-1012.

Go Y. M. & Jones D. P. (2008). Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1273-1290.

Gottlieb, M. & Matute, C. (1997). Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 290-300.

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

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

Grueter, B. A., & Winder, D. G. (2005). Group II and III metabotropic glutamate receptors suppress excitatory synaptic transmission in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropsychopharmacology* **30**: 1302-1311.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450.

Gschwendt, M., Muller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., Marks, F. (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 93-98.

Gunter, K. K., & Gunter, T. E. (1994). Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **26**: 471-485.

Gunter, T. E., & Gunter, K. K. (2001). Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB Life* **52**: 197-204.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**: 1634-1658.

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

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**: 501-514.

Hara, H., Ohta, M., Adachi, T. (2006). Apomorphine protects against 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2-ARE pathway. *J Neurosci Res* **84**: 860-866.

Hardingham, G.E., Bading, H. (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* **26**: 81-89.

Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* **11**: 682-696.

Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* **5**: 405-414.

Harrison F. E., & May J. M. (2009). Vitamin c function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter svct2. *Free Radic Biol Med* **46**: 719-730.

Haskew-Layton, R. E., Payappilly, J. B., et al. (2010) Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17385-17390.

Haydon, P.G. (2001). Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**:185-193.

Hayes, J. D., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G. J., Wolf, C. R., Yamamoto, M. (2000). The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin. *Biochem Soc Trans* **28**: 33-41.

Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 51-88.

Hayes, J. D. & McMahon, M. (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* **34**: 176-188.

He, L., Hou, Z., Qi, R. Z. (2008). Calmodulin binding and Cdk5 phosphorylation of p35 regulate its effect on microtubules. *J Biol Chem* **283**: 13252-13260.

He, Y., Li, H. L., Xie, W. Y., Yang, C. Z., Yu, A. C., Wang, Y. (2007). The presence of active Cdk5 associated with p35 in astrocytes and its important role in process elongation of scratched astrocyte. *Glia* **55**: 573-583.

Heales, S. J., Bolanos, J. P., Land, J. M., Clark, J. B. (1994). Trolox protects mitochondrial complex IV from nitric oxide-mediated damage in astrocytes. *Brain Res* **668**: 243-5.

Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G., Choquet, D. (2008). Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neurologin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20947-20952.

Hekimi S, Lapointe J & Wen Y. (2011). Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* **21**: 569-576.

Hirrlinger J., König J., Keppler D., Lindenau J., Schulz J. B., Dringen R. (2001). The multidrug resistance protein mrp1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem* **76**: 627-636.

Hisanaga, S., & Endo, R. (2010). Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death. *J Neurochem* **115**: 1309-1321.

Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **17**: 31-108.

Holmgren A. Regulation of ribonucleotide reductase. (1981). *Curr Top Cell Regul* **19**: 47-76.

Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L. J., Cleveland, D. W., Rothstein, J. D. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1604-1609.

Hsieh, M. H., Ho, S. C., Yeh, K. Y., Pawlak, C. R., Chang, H. M., Ho, Y. J., Lai, T. J., Wu, F. Y. (2012). Blockade of metabotropic glutamate receptors inhibits cognition and neurodegeneration in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model. *Pharmacol Biochem Behav* **102**: 64-71.

Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M. R., Khor, T. O., Gopalkrishnan, A., Lin, W., Reddy, B., Chan, J. Y., Kong, A. N. (2006). Identification of Nrf2-regulated genes induced by chemopreventive isothiocyanate PEITC by oligonucleotide microarray. *Life Sci* **79**: 1944-1955.

Huang C. S., Anderson M. E., Meister A. (1993a). Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **268**: 20578-20583.

Huang, C. S., Chang, L. S., Anderson, M. E., Meister, A. (1993b). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**: 19675-1980.

Huang, H. C., Nguyen, T., Pickett, C. B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12475-12480.

Igarashi, K., Hoshino, H., Muto, A., Suwabe, N., Nishikawa, S., Nakauchi, H., Yamamoto, M. (1998). Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and BACH1 as a possible biochemical basis for beta-globin locus control region complex. *J Biol Chem* **273**: 11783-11790.

Iida, K., Itoh, K., Kumagai, Y., Oyasu, R., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., Akaza, H., Yamamoto, M. (2004). Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* **64**: 6424-6431.

Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., Yamamoto, M. (1995). Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol* **15**: 4184-4193.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M. (1999). KEAP1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13**: 76-86.

Jain, A. K., Bloom, D. A., Jaiswal, A. K. (2005). Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* **280**: 29158-29168.

Jain, A. K., & Jaiswal, A. K. (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem* **281**: 12132-12142.

Jain, A. K., & Jaiswal, A. K. (2007). GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem* **282**: 16502-16510.

Jain, A. K., Mahajan, S., Jaiswal, A. K. (2008). Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of INrf2: a novel mechanism in Nrf2 activation. *J Biol Chem* **283**: 17712-17720.

Jaiswal, A. K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* **36**: 1199-1207.

Janaky, R., Shaw, C. A., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P., Oja, S. S. (2000). Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes. *Neuroscience* **95**: 617-624.

Jaquenoud, M., van Drogen, F., Peter, M. (2002). Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C (Cdh1). *Embo J* **21**: 6515-6526.

Jaramillo, M. C. & Zhang, D. D. (2013). The emerging role of the Nrf2-KEAP1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* **27**: 2179-2191.

Jenner, P., Dexter, D. T., Sian, J., Schapira, A. H., Marsden, C. D. (1992). Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* **32 Suppl**: S82-S87.

Jin, W., Lo, T. M., Loh, H. H., Thayer, S. A. (1994). U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* **642**: 237-243.

Johnson, D. A., Andrews, G. K., Xu, W., Johnson, J. A. (2002). Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice. *J Neurochem* **81**: 1233-1241.

Johnson, K. A., Jones, C. K., Tantawy, M. N., Bubser, M., Marvanova, M., Ansari, M. S., Baldwin, R. M., Conn, P. J., Niswender, C. M. (2013). The metabotropic glutamate receptor 8 agonist (S)-3,4-DCPG reverses motor deficits in prolonged but not acute models of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* **66**: 187-195.

Joly, C., Gomeza, J., Brabet, I., Curry, K., Bockaert, J., Pin, J. P. (1995). Molecular, functional, and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1. *J Neurosci* **15**: 3970-3981.

Jones D. P. (2002). Redox potential of gsh/gssg couple: Assay and biological significance. *Methods Enzymol* **348**: 93-112.

Kanai, Y., & Hediger, M. A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**: 467-471.

Kanai, Y., Clemencon, B., Simonin, A., Leuenberger, M., Lochner, M., Weisstanner, M., Hediger, M. A. (2013). The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med* **34**: 108-120.

- Kang, K. W., Lee, S. J., Park, J. W., Kim, S. G.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* **62**: 1001-1010.
- Kang, M. I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S. G., Yamamoto, M.** (2004). Scaffolding of KEAP1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2046-2051.
- Kang, K. W., Lee, S. J., Kim, S. G.** (2005). Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **7**: 1664-1673.
- Kannoji, A., Phukan, S., Sudher Babu, V., Balaji, V. N.** (2008). GSK3beta: a master switch and a promising target. *Expert Opin Ther Targets* **12**: 1443-1455.
- Kapelari, B., Bech-Otschir, D., Hegerl, R., Schade, R., Dumdey, R., Dubiel, W.** (2000). Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J Mol Biol* **300**: 1169-1178.
- Karapetian, R. N., Evstafieva, A. G., Abaeva, I. S., Chichkova, N. V., Filonov, G. S., Rubtsov, Y. P., Sukhacheva, E. A., Melnikov, S. V., Schneider, U., Wanker, E. E., Vartapetian, A. B.** (2005). Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of KEAP1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. *Mol Cell Biol* **25**: 1089-1099.
- Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., Yamamoto, M.** (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* **6**: 857-868.
- Kaufman, A. M., Milnerwood, A. J., Sepers, M. D., Coquinco, A., She, K., Wang, L., Lee, H., Craig, A. M., Cynader, M., Raymond, L. A.** (2012). Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptor signaling in cocultured striatal and cortical neurons. *J Neurosci* **32**: 3992-4003.

Kawai, Y., Garduno, L., et al. (2010). Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization. *J Biol Chem* **286**: 7629-7640.

Kelner M. J. & Montoya M. A. (2000). 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.

Khodorov, B., Pinelis, V., Vergun, O., Storozhevykh, T., Vinskaya, N. (1996). Mitochondrial deenergization underlies neuronal calcium overload following a prolonged glutamate challenge. *FEBS Lett* **397**: 230-234.

Kikkawa, U., Matsuzaki, H., Yamamoto, T. (2002). Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *J Biochem* **132**: 831-839.

Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., Bossy-Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **9**: 505-518.

Kobayashi, A., Kang, M. I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of KEAP1. *Mol Cell Biol* **26**: 221-229.

Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor KEAP1 functions as an adaptor for CUL3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**: 7130-7139.

Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2006). Nrf2-KEAP1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* **46**: 113-40.

Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Inoue, K. (2003). Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:11023-11028.

Königsberg, M. (2007). Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* **26**: 18-25.

Kraft, A. D., Johnson, D. A., Johnson, J. A. (2004). Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J Neurosci* **24**: 1101-1112.

Krebs, C., Fernandes, H.B., Sheldon, C., Raymond, L.A., Baimbridge, K.G. (2003). Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia *in vivo* and anoxia *in vitro*. *J. Neurosci.* **23**: 3364-3372.

Kruman, II., Pedersen, W. A., Springer, J. E., Mattson, M. P. (1999). ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp Neurol* **160**: 28-39.

Kumar, C., Igarria, A., D'Autreaux, B., Planson, A. G., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A. K., Delaunay-Moisan, A., Toledano, M. B. (2011). Glutathione revisited: A vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *Embo J* **30**: 2044-2056

Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., Hisanaga, S. (2000). Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* **275**: 17166-17172.

Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T. W. (2002). Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter." *Mol Cell Biol* **22**: 2883-2892.

Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., Kensler, T. W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the KEAP1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* **278**: 8135-8145.

Lalo, U., Palygin, O., North, R.A., Verkhatsky, A., Pankratov, Y. (2011). Age-dependent remodelling of ionotropic signalling in cortical astroglia. *Aging Cell* **10**: 392-402

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

Le, W. D., Colom, L. V., Xie, W. J., Smith, R. G., Alexianu, M., Appel, S. H. (1995). Cell death induced by beta-amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. *Brain Res* **686**: 49-60.

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

Lee B. S., Heo, J., Kim Y. M., Shim S. M., Pae H. O., Kim Y. M., Chung H. T. (2006). Carbon monoxide mediates heme oxygenase 1 induction via Nrf2 activation in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **343**: 965–972.

Lee, K. Y., Rosales, J. L., Tang, D., Wang, J. H. (1996). Interaction of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and neuronal Cdk5 activator in bovine brain. *J Biol Chem* **271**: 1538-1543.

Lee, M. C., Ting, K. K., Adams, S., Brew, B. J., Chung, R., Guillemín, G. J. Characterization of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PLoS One* **5**: e14123.

Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., Tsai, L. H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**: 360-364.

Lee, O. H., Jain, A. K., Papusha, V., Jaiswal, A. K. (2007). An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem* **282**: 36412-36420.

Lee, T. D., Yang, H., Whang, J., Lu, S. C. (2005). Cloning and characterization of the human glutathione synthetase 5'-flanking region. *Biochem J* **390**: 521-528.

Li, W., & Ye, Y. (2008). Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2397-2406.

Liang, Q., Li, L. et al. (2013) CDK5 is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Sci Rep* **3**: 2932.

Lievens, J. C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Boscovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le Goff, L., Bates, G. P. (2001). Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* **8**: 807-821.

Lipton, S. A. (2004). Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* **1**: 101-110.

Lipton, S.A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**: 160-170.

Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM & Liu RM. (2004). Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci* **1019**: 346-349.

Liu, F., Nguyen, J. L., Hulleman, J. D., Li, L., Rochet, J. C. (2008). Mechanisms of DJ-1 neuroprotection in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* **105**: 2435-2453.

Lo, S. C., & Hannink, M. (2006). CAND1-mediated substrate adaptor recycling is required for efficient repression of Nrf2 by KEAP1. *Mol Cell Biol* **26**: 1235-1244.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Lewis-Farr A & Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Lu S. C. (2000). Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* **36**: 95-116.

Lu S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* **30**: 42-59.

Luetjens, C. M., Bui, N. T., Sengpiel, B., Munstermann, G., Poppe, M., Krohn, A. J., Bauerbach, E., Krieglstein, J., Prehn, J. H. (2000). Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci* **20**: 5715-5723.

Luque, J. M. & Richards, J. G. (1995). Expression of NMDA 2B receptor subunit mRNA in Bergmann glia. *Glia* **13**: 228-232.

Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D. A., Wei, N., Shevchenko, A., Deshaies, R. J (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**: 1382-1385.

Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Gómez-Sánchez, J. C., Bolanos, J. P., Almeida, A. (2008). Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *Embo J* **27**: 2736-2745.

- Maiorino, M., Ursini, F., Bosello, V., Toppo, S., Tosatto, S. C., Mauri, P., Becker, K., Roveri, A., Bulato, C., Benazzi, L., De Palma, A., Flohe, L.** (2007). The thioredoxin specificity of drosophila GPx: A paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *J Mol Biol* **365**: 1033-1046.
- Makar, T. K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A. S., Perumal, A. S., Cooper A. J. L.** (1994). Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* **62**: 45-53.
- Mari, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J. C.** (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* **11**: 2685-2700.
- Martin, H. L., & Teismann, P.** (2009). Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *Faseb J* **23**: 3263-3272.
- Mateo, Z., & Porter, J. T.** (2007). Group II metabotropic glutamate receptors inhibit glutamate release at thalamocortical synapses in the developing somatosensory cortex. *Neuroscience* **146**: 1062-1072.
- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S., Yuzaki, M.** (2002). Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* **100**: 43-52.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y., Yuzaki, M.** (2003). Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* **23**: 10064-10073.
- Matsuoka, Y., Kitamura, Y., Okazaki, M., Sakata, M., Tsukahara, T., Taniguchi, T.** (1998). Induction of heme oxygenase-1 and major histocompatibility complex antigens in transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**: 824-832.

Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., Rydel, R. E. (1992). Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* **12**: 376-389.

McDonald, J. W., & Johnston, M. V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* **15**: 41-70.

McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McLellan, L. I., Wolf, C. R., Cavin, C., Hayes, J. D. (2001). The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res* **61**: 3299-3307.

McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* **279**: 31556-31567.

McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D. (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-KEAP1 complex. *J Biol Chem* **281**: 24756-24768.

McNaughton, L. A. & Hunt, S. P. (1992). Regulation of gene expression in astrocytes by excitatory amino acids. *Brain Res Mol Brain Res* **16**: 261-266.

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

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

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

- Merlet, J., Burger, J., Gomes, J. E., Pintard, L.** (2009). Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1924-1938.
- Miller, R. F.** (2004). D-Serine as a glial modulator of nerve cells. *Glia* **47**: 275-283.
- Mothet, J.P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., Baux, G.** (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 102: 5606–5611.
- Motohashi, H., & Yamamoto, M.** (2004). Nrf2-KEAP1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10**: 549-557.
- Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J. D., Yamamoto, M.** (2002). Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* **294**: 1-12.
- Murphy MP.** (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13.
- Nagasawa, K., Nishida, K., Nagai, K., Shimohama, S., Fujimoto, S.** (2004). Differential expression profiles of PLC-beta1 and -delta1 in primary cultured rat cortical neurons treated with N-methyl-D-aspartate and peroxynitrite. *Neurosci Lett* **367**: 246-249.
- Nath, R., Davis, M., Probert, A. W., Kupina, N. C., Ren, X., Schielke, G. P., Wang, K. K.** (2000). Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **274**: 16-21.
- Nedergaard, M.** (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* **263**:1768-1771.

Nguyen, D., Alavi, M. V., Kim, K. Y., Kang, T., Scott, R. T., Noh, Y. H., Lindsey, J. D., Wissinger, B., Ellisman, M. H., Weinreb, R. N., Perkins, G. A., Ju, W. K. (2011). A new vicious cycle involving glutamate excitotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dynamics. *Cell Death Dis* **2**: e240.

Nguyen, T., Sherratt, P. J., Nioi, P., Yang, C. S., Pickett, C. B. (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by KEAP1. *J Biol Chem* **280**: 32485-32492.

Nioi, P., & Hayes, J. D. (2004). Contribution of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res* **555**: 149-171.

Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J. D. (2003). Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* **374**: 337-348.

Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P. J., Pickett, C. B. (2005). The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **25**: 10895-10906.

Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M., Hayashi, Y. (2001). Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* **21**: RC185.

Niture, S. K., Jain, A. K., Jaiswal, A. K. (2009). Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* **122**: 4452-4464.

Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/CUL3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* **284**: 13856-13868.

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

Ohh, M., Kim, W. Y., Moslehi, J. J., Chen, Y., Chau, V., Read, M. A., Kaelin, W. G., Jr (2002). An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep* **3**: 177-182.

Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y. A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K. I., Aaronson, S. A., Lee S. W. (2004). Asc is a bax adaptor and regulates the p53-bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat. Cell Biol.* **6**: 121-128.

Okawa, H., Motohashi, H., Kobayashi, A., Aburatani, H., Kensler, T. W., Yamamoto, M. (2006). Hepatocyte-specific deletion of the KEAP1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 79-88.

Oliet, S. H. & Mothet, J. P. (2009). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* **158**: 275-283.

Osburn, W. O., & Kensler, T. W (2008). Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res* **659**: 31-39.

Palygin O., Lalo U., Verkhatsky, A., Pankratov, Y. (2010) Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* **48**: 225-231.

Palygin O., Lalo, U., Pankratov, Y. (2011). Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **163**: 1755-1766.

Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **7**: 39-47.

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

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. (2003). 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.

Papadia, S., Soriano, F. X., Leveille, F., Martel, M. A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., Kaindl, A., Sifringer, M., et al. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* **11**: 476-487.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* **369**:744-747.

Paul, S., & Connor, J. A. (2010). NR2B-NMDA receptor-mediated increases in intracellular Ca²⁺ concentration regulate the tyrosine phosphatase, STEP, and ERK MAP kinase signaling. *J Neurochem* **114**: 1107-1118.

Perea, G. & Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* **25**: 2192-2203.

Pérez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J., Heinemann, S. F. (2001). Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* **21**: 1228-1237.

- Perry, T. L., Godin, D. V. Hansen, S.** (1982). Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett.* **33**, 305-310.
- Peth, A., Berndt, C., Henke, W., Dubiel, W.** (2007). Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability. *BMC Biochem* **8**: 27.
- Petroski, M. D., & Deshaies, R. J.** (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 9-20.
- Pintard, L., Kurz, T., Glaser, S., Willis, J. H., Peter, M., Bowerman, B.** (2003). Neddylation and deneddylation of CUL-3 is required to target MEI-1/Katanin for degradation at the meiosis-to-mitosis transition in *C. elegans*. *Curr Biol* **13**: 911-921.
- Pompella, A., Corti, A., Paolicchi, A., Giommarelli, C., Zunino, F.** (2007). Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* **7**: 360-366.
- Porter, J.T., McCarthy, K.D.** (1996). Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* **16**: 5073-5081.
- Poyton, R. O., Ball, K. A. Castello, P. R.** (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* **20**: 332-340.
- Puddifoot, C., Martel, M. A., Soriano, F. X., Camacho, A., Vidal-Puig, A., Wyllie, D. J., Hardingham, G. E.** (2012). PGC-1alpha negatively regulates extrasynaptic NMDAR activity and excitotoxicity. *J Neurosci* **32**: 6995-7000.
- Rada, P., Rojo, A. I., Evrard-Todeschi, N., Innamorato, N. G., Cotte, A., Jaworski, T., Tobon-Velasco, J. C., Devijver, H., Garcia-Mayoral, M. F., Van Leuven, F., Hayes, J. D., Bertho, G., Cuadrado, A.** (2012). Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/beta-TrCP axis. *Mol Cell Biol* **32**: 3486-3499.

Rahman, I. (2005). Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutat Res* **579**: 58-80.

Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW & Athar M. (1999). Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol* **29**: 543-568.

Ramos-Gómez, M., Kwak, M. K., Dolan, P. M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T. W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3410-3415.

Rangasamy, T., Cho, C. Y., Thimmulappa, R. K., Zhen, L., Srisuma, S. S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Petrache, I., Tuder, R. M., Biswal, S. (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* **114**: 1248-1259.

Rebrin, I. & Sohal, R. S. (2008). Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv Drug Deliv Rev* **60**: 1545-1552.

Reddy, N. M., Kleeberger, S. R., Cho, H. Y., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Biswal, S., Reddy, S. P. (2007). Deficiency in Nrf2-GSH signaling impairs type II cell growth and enhances sensitivity to oxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**: 3-8.

Reynaert, N. L., Ckless, K., Guala, A. S., Wouters, E. F., van der Vliet, A., Janssen-Heininger, Y. M. (2006). In situ detection of s-glutathionylated proteins following glutaredoxin-1 catalyzed cysteine derivatization. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 380-387.

Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**: 326-330.

Ross, D., Cotgreave, I., Moldeus, P. (1985). The interaction of reduced glutathione with active oxygen species generated by xanthine-oxidase-catalyzed metabolism of xanthine. *Biochim Biophys Acta* **841**: 278-282.

Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., Welty, D. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**: 675-686.

Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **38**: 73-84.

Rushmore, T. H., Morton, M. R., Pickett, C. B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* **266**: 11632-11639.

Sagara, J., Makino, N. Bannai, S. (1996). Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* **66**, 1876-1881.

Sagara J, Miura K & Bannai S. (1993). Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* **61**, 1667-1671.

Salazar, M., Pariente, J. A., Salido, G. M., Gonzalez, A. (2008). Ebselen increases cytosolic free Ca²⁺ concentration, stimulates glutamate release and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. *Toxicology* **244**: 280-291.

SantaCruz, K. S., Yazlovitskaya, E., Collins, J., Johnson, J., DeCarli, C. (2004). Regional NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**: 63-69.

Sasaki, H., Suzuki, A., Shitara, M., Hikosaka, Y., Okuda, K., Moriyama, S., Yano, M., Fujii, Y. (2012) Genotype analysis of the NRF2 gene mutation in lung cancer. *Int J Mol Med* **31**: 1135-1138.

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. (2004). Fas-mediated apoptosome formation is dependent on reactive oxygen species derived from mitochondrial permeability transition in jurkat cells. *J Immunol* **173**: 285-296.

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**: 1191-1212.

Scheiber, I. F., & Dringen, R. (2011). Copper-treatment increases the cellular gsh content and accelerates gsh export from cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* **498**: 42-46.

Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., Kirchhoff, F. (2001). Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *Faseb J* **15**: 1270-1272.

Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaille, J.C., Robitaille, R. (2006). GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci* **26**: 5370–5382.

Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., Ojima, H., Ohta, T., Yamamoto, M., Hirohashi, S. (2008). Genetic alteration of KEAP1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* **135**: 1358-1368.

Shih, A. Y., Erb, H., Murphy, T. H. (2007). Dopamine activates Nrf2-regulated neuroprotective pathways in astrocytes and meningeal cells. *J Neurochem* **101**: 109-119.

- Shimizu, N., Matsunami, T., Onishi, S.** (1960). Histochemical demonstration of ascorbic acid in the locus coeruleus of the mammalian brain. *Nature* **186**: 479-480.
- Sies, H.** (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* **82**: 291-295.
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M. O., Herman, J. G., Baylin, S. B., Sidransky, D., Gabrielson, E., Brock, M. V., Biswal, S.** (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* **3**: e420.
- Smith, S.J.** (1994). Neuromodulatory astrocytes. *Curr Biol* **4**: 807-810.
- Snyder, G. H., Cennerazzo, M. J., Karalis, A. J., Field, D.** (1981). Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry* **20**: 6509-6519.
- Sobieszczuk, D. F., Poliakov, A., Xu, Q., Wilkinson, D. G.** (2012). A feedback loop mediated by degradation of an inhibitor is required to initiate neuronal differentiation. *Genes Dev* **24**: 206-218.
- Soltaninassab, S. R., Sekhar, K. R., Meredith, M. J., Freeman, M. L.** (2000). Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Cell Physiol* **182**: 163-170.
- Starling, A. J., Andre, V. M., Cepeda, C., de Lima, M., Chandler, S. H., Levine, M. S.** (2005). Alterations in N-methyl-D-aspartate receptor sensitivity and magnesium blockade occur early in development in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci Res* **82**: 377-386.
- Stole, E., & Meister, A.** (1991). Interaction of gamma-glutamyl transpeptidase with glutathione involves specific arginine and lysine residues of the heavy subunit. *J Biol Chem* **266**: 17850-17857.

Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G., Lipton, S. A. (1995). Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* **15**: 6509-6520.

Sugimoto, M., Kuhlenkamp, J., Ookhtens, M., Aw, T. Y., Reeve, J., Jr., Kaplowitz, N. (1985). Gamma-glutamylcysteine: A substrate for glutathione S-transferases. *Biochem Pharmacol* **34**: 3643-3647.

Sun, Z., Zhang, S., Chan, J. Y., Zhang, D. D. (2007). KEAP1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* **27**: 6334-6349.

Susarla, B. T., & Robinson, M. B. (2003). Rottlerin, an inhibitor of protein kinase Cdelta (PKCdelta), inhibits astrocytic glutamate transport activity and reduces GLAST immunoreactivity by a mechanism that appears to be PKCdelta-independent. *J Neurochem* **86**: 635-645.

Takebe, G., Yarimizu, J., Saito, Y., Hayashi, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Nagasawa, S. Takahashi, K. (2002). A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein p. *J Biol Chem* **277**: 41254-41258.

Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**: 169-179.

Temple, M. D., Perrone, G. G., Dawes, I. W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**: 319-326.

Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* **62**: 5196-5203.

Tietze, F. (1969). 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.

Thomas, B., & Beal, M. F. (2007). Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**: R183-94.

Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., Yamamoto, M. (2006). KEAP1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* **26**: 2887-2900.

Tong, K. I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S., Yamamoto, M. (2007). Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol* **27**: 7511-7521.

Toppo, S., Flohe, L., Ursini, F., Vanin, S., Maiorino, M. (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1486-1500.

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

Urushitani, M., Nakamizo, T., Inoue, R., Sawada, H., Kihara, T., Honda, K., Akaike, A., Shimohama, S. (2001). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca(2+) overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca(2+) influx. *J Neurosci Res* **63**: 377-387.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44-84.

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

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

Velichkova, M., Guttman, J., Warren, C., Eng, L., Kline, K., Vogl, A. W., Hasson, T. (2002). A human homologue of *Drosophila* kelch associates with myosin-VIIa in specialized adhesion junctions. *Cell Motil Cytoskeleton* **51**: 147-164.

Velichkova, M., & Hasson, T. (2005). KEAP1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol Cell Biol* **25**: 4501-4513.

Venugopal, R., & Jaiswal, A. K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14960-14965.

Vera, G., & Tapia, R. (2012). Activation of group III metabotropic glutamate receptors by endogenous glutamate protects against glutamate-mediated excitotoxicity in the hippocampus in vivo. *J Neurosci Res* **90**: 1055-1066.

Verkhatsky, A. & Kirchhoff, F. (2007). NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* **13**: 28-37.

Vidaurre, O. G., Gascon, S., Deogracias, R., Sobrado, M., Cuadrado, E., Montaner, J., Rodríguez-Pena, A., Díaz-Guerra, M. (2012) Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death Dis* **3**: e256.

Vignes, M., & Collingridge, G. L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* **388**: 179-182.

Villeneuve, N. F., Lau, A., Zhang, D. D. (2010). Regulation of the Nrf2-KEAP1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal* **13**: 1699-1712.

Vincent, I., Jicha, G., Rosado, M., Dickson, D. W. (1997). Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* **17**: 3588-3598.

Wada, H., Yeh, E. T., Kamitani, T. (1999). Identification of NEDD8-conjugation site in human cullin-2. *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 100-105.

Wang, G. J., Randall, R. D., Thayer, S. A. (1994). Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from Ca²⁺ loads. *J Neurophysiol* **72**: 2563-2569.

Wang, J., Liu, S., Fu, Y., Wang, J. H., Lu, Y. (2003). Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci* **6**: 1039-1047.

Wasserman, W. W., & Fahl, W. E. (1997a). Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5361-5366.

Wasserman, W. W., & Fahl, W. E. (1997b). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch Biochem Biophys* **344**: 387-396.

Waxman, E. A., & Lynch, D. R. (2005). N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* **11**: 37-49.

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

Weiss, J. H., Pike, C. J., Cotman, C. W. (1994). Ca²⁺ channel blockers attenuate beta-amyloid peptide toxicity to cortical neurons in culture. *J Neurochem* **62**: 372-375.

Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y. F., Rocque, P. A. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* **265**: 15361-15364.

Wen, Y., Yang, S., Liu, R., Brun-Zinkernagel, A. M., Koulen, P., Simpkins, J. W. (2004). Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer's disease-like tauopathy in female rats. *J Biol Chem* **279**: 22684-22692.

White, R. J., & Reynolds, I. J. (1997). Mitochondria accumulate Ca²⁺ following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurons. *J Physiol* **498 (Pt 1)**: 31-47.

Wild, A. C., Moinova, H. R., Mulcahy, R. T. (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor nrf2. *J Biol Chem* **274**: 33627-33636.

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

Wroge, C. M., Hogins, J., Eisenman, L., Mennerick, S. (2012). Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. *J Neurosci* **32**: 6732-6742.

Wu, K., Chen, A., Pan, Z. Q. (2000). Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. *J Biol Chem* **275**: 32317-32324.

- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D.** (2004a). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* **134**: 489-492.
- Wu, T., Wang, H. L., Chu, C. C., Yu, J. M., Chen, J. Y., Huang, C. C.** (2004b). Clinical and electrophysiological studies of a family with probable X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth neuropathy and ptosis. *Chang Gung Med J* **27**: 489-500.
- Yang, H., Zeng, Y., Lee, T. D., Yang, Y., Ou, X., Chen, L., Haque, M., Rippe, R., Lu, S. C.** (2002). 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.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S.,** (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:15194-15199.
- Young, K. W., Garro, M. A., Challiss, R. A., Nahorski, S. R.** (2004). NMDA-receptor regulation of muscarinic-receptor stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate production and protein kinase C activation in single cerebellar granule neurons. *J Neurochem* **89**: 1537-1546.
- Zancai, P., Dal Col, J., Piccinin, S., Guidoboni, M., Cariati, R., Rizzo, S., Boiocchi, M., Maestro, R., Dolcetti, R.** (2005). Retinoic acid stabilizes p27Kip1 in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45Skp2 and Cks1 proteins. *Oncogene* **24**: 2483-2494.
- Zeevalk, G. D., Razmpour, R., Bernard, L. P.** (2008). Glutathione and Parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Biomed Pharmacother* **62**: 236-249.
- Zhang, D. D.** (2006). Mechanistic studies of the Nrf2-KEAP1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* **38**: 769-789.

Zhang, P., Singh, A., Yegnasubramanian, S., Esopi, D., Kombairaju, P., Bodas, M., Wu, H., Bova, S. G., Biswal, S. (2010). Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther* **9**: 336-346.

Zhao, C. T., Li, K., Li, J. T., Zheng, W., Liang, X. J., Geng, A. Q., Li, N., Yuan, X. B. (2009). PKCdelta regulates cortical radial migration by stabilizing the Cdk5 activator p35. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21353-21368.

Zheng, J., Yang, X., Harrell, J. M., Ryzhikov, S., Shim, E. H., Lykke-Andersen, K., Wei, N., Sun, H., Kobayashi, R., Zhang, H. (2002). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell* **10**: 1519-1526.

Zheng, Y. L., Li, B. S., Kanungo, J., Kesavapany, S., Amin, N., Grant, P., Pant, H. C. (2007). Cdk5 Modulation of mitogen-activated protein kinase signaling regulates neuronal survival. *Mol Biol Cell* **18**: 404-413.

Zhou, C., Wee, S., Rhee, E., Naumann, M., Dubiel, W., Wolf, D. A. (2003). Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell* **11**: 927-938.

Zhu, Y. S., Saito, T., Asada, A., Maekawa, S., Hisanaga, S. (2005). Activation of latent cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)-p35 complexes by membrane dissociation. *J Neurochem* **94**: 1535-1545.