

Molekulární a buněčná biologie amyotrofické laterální sklerózy

RNDr. Kateřina Klíčová, prof. MUDr. Jan Mareš, Ph.D., MBA

Neurologická klinika FN a LF UP Olomouc

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je vážné progresivní onemocnění charakterizované změnami centrálních a periferních motorických neuronů. Z důvodu degenerace a zániku motoneuronů postupně dochází ke svalové slabosti a atrofii. ALS je stále častěji považována za multisystémové onemocnění. Pochopení patogeneze ALS je důležité pro vývoj účinných terapeutických přístupů. Cílem tohoto článku je identifikovat a shrnout vybrané molekulární a buněčné mechanismy, které se podílí na patogenezi ALS – mitochondriální dysfunkce, aberantní metabolismus RNA, oxidační stres, a dále také molekulární přístupy k léčbě.

Klíčová slova: amyotrofická laterální skleróza, onemocnění motoneuronu, mitochondriální dysfunkce, aberantní metabolismus RNA, molekulární přístupy k léčbě.

Molecular and cellular biology of amyotrophic lateral sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a severe progressive disease characterized by changes in upper and lower motor neurons. Due to degeneration and extinction of motoneurons, muscle weakness and atrophy gradually occur. ALS is increasingly considered a multisystem disease. Understanding the pathogenesis of ALS is important for the development of effective therapeutic approaches. The aim of this article is to identify and summarize selected molecular and cellular mechanisms involved in the pathogenesis of ALS - mitochondrial dysfunction, aberrant RNA metabolism, oxidative stress, as well as molecular approaches to treatment.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, motoneuron disease, mitochondrial dysfunction, aberrant RNA metabolism, molecular approaches to treatment.

Úvod

Amyotrofická laterální skleróza (ALS), též známá jako motor neuron disease (MND), Charcotova choroba nebo Lou Gehrigova choroba, je způsobena progresivní degenerací motorických neuronů (Wijesekera et Leigh, 2009). ALS poprvé pozoroval Charles Bell v roce 1830, ale plně ji popsal a pojmenoval Jean-Martin Charcot v roce 1874 (Mathis et al., 2017). ALS je fatální onemocnění charakterizované degenerativními změnami centrálních a periferních motorických neuronů, progresivní asymetrickou slabostí a atrofií svalů břišních, bulbárních, hrudních a svalů končetin. ALS je také považována

za multisystémovou degeneraci s dalšími příznaky, jako jsou kognitivní porucha, spasticita, extrapyramidové rysy nebo posturální abnormality (Mathis et al., 2016). Pacienti pociťují nejen příznaky progresivní svalové atrofie a slabosti, ale i zvýšenou únavu a problémy s polykáním. Progresivní funkční deficit má za následek ztrátu soběstačnosti. Medián přežití se pohybuje v rozmezí 2–4 let od nástupu onemocnění a pouze 5–10 % pacientů přežívá déle než 10 let. Ačkoliv se jedná o relativně vzácné onemocnění, tak osobní, společenská a ekonomická zátěž, kterou představuje, je značná (Chiò et al., 2013). K rizikovým faktorům ALS patří především

vyšší věk, mužské pohlaví a rodinná anamnéza (Ingre et al., 2015). Většina pacientů umírá na komplikace související s onemocněním, jako je respirační selhání.

V 90–95 % případů hovoříme o sporadické ALS, kdy je příčina neznámá. Pouze 5–10 % případů je spojeno se známými genetickými mutacemi (familiární typ). Nejběžnější mutace se nacházejí v genech *C9orf72*, *SOD1*, *FUS* nebo *TARDBP* (Obrador et al., 2020). ALS se obvykle projevuje jako slabost v končetinách (spinální) nebo potíženími s mluvením a polykáním (bulbární) (Longinetti et Fang, 2019). Incidence a prevalence ALS stoupá v různých částech světa. Odhadovaný výskyt

v Evropě je 2,2/100 000 obyvatel/rok. Další populační studie zaznamenaly nejvyšší výskyt ve východní Asii 0,89/100 000 obyvatel/rok a v jižní Asii 0,79/100 000 obyvatel/rok (Logroscino et Picinnini, 2019).

Přežití pacientů závisí na několika faktorech – klinický fenotyp, věk při nástupu onemocnění, pohlaví, časná přítomnost respiračního selhání, ztráta hmotnosti a léčba Riluzolem (jediný chorobu modifikující lék schválený pro ALS). Diagnostika je založena především na klinickém vyšetření a elektromyografickém vyšetření (EMG). Klinická kritéria pro diagnostiku ALS byla stanovena v roce 1994 (kritéria El Escorial), následně byla revidována a od roku 2008 jsou k diagnostice využívána Awaji-Shima kritéria, která jsou senzitivnější (Mathis et al., 2017; Wijesekera et Leigh, 2009).

V současnosti neexistuje žádný definitivní diagnostický test nebo biomarker pro ALS a lékaři spoléhají především na klinická kritéria. Vývoj nových biomarkerů pro sledování progresu ALS je příslibem zdokonalení designu terapeutických studií a lepší pochopení často nepředvídatelné progresu onemocnění (Kiernan et al., 2011). Slibným diagnostickým a prognostickým markerem pro ALS by mohl být pNF-H, jehož zvýšené hladiny v mozkomíšním moku byly zaznamenány u pacientů s touto diagnózou (Ganesalingam et al., 2013; Kaiserová et al., 2017).

S ALS jsou spojeny mutace ve více než 30 genech, avšak ty vysvětlují pouze 20 %

všech případů. Molekulární funkce těchto genů implikují širokou škálu buněčných procesů v patologii ALS. Pochopení těchto procesů může poskytnout vodítka k běžným molekulárním mechanismům jak u familiárních, tak sporadických forem ALS a mohly by být klíčem k vývoji účinných terapeutických přístupů (Le Gall et al., 2020). Cílem tohoto článku je identifikovat a shrnout vybrané molekulární mechanismy, které byly zkoumány u ALS – mitochondriální dysfunkce, aberantní metabolismus RNA a další.

Molekulární a buněčné mechanismy ALS

ALS je stále častěji považována za multisystémové onemocnění. Změny v buněčných procesech mohou být přítomné nejen v motorických neuronech samotných, ale i v dalších buněčných populacích, jako jsou periferní, zánětlivé a gliové buňky. Například astrocyty a mikroglie se podílejí na uvolňování prozánětlivých mediátorů, které vedou k chronickému zánětu neuronů a toxicitě motorických neuronů (Le Gall et al., 2020).

Patogenní mechanismy u ALS fungují prostřednictvím vzájemně souvisejících molekulárních a genetických drah (Kiernan et al., 2011). K navrhovaným mechanismům se řadí (Obr. 1):

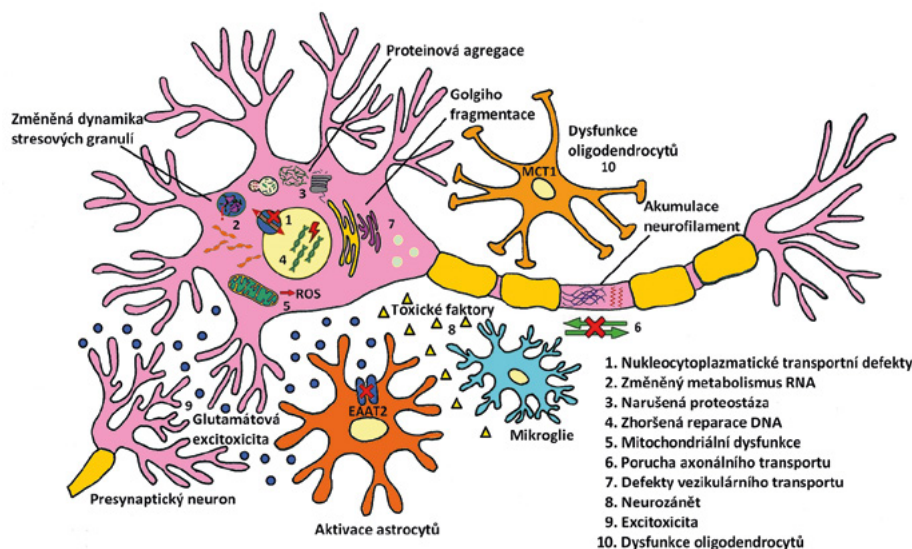
- nukleocytoplasmatické transportní defekty a změna transportu RNA molekul a RNA vazebných proteinů a aberantní metabolismus RNA,

- nesprávná lokalizace proteinů vázajících RNA včetně TDP-43 a FUS v cytoplasmě a následná změna transkripce a sestřihu,
- agregující proteiny včetně TDP-43 se hromadí v cytoplasmě a narušují proteostázu,
- zhoršená reparace DNA (geny podílející se na reparaci DNA a zároveň spojeny s ALS – FUS, TARDBP, TAF15, SETX, EWR51),
- mitochondriální dysfunkce vede ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a je považována za iniciační faktor u ALS, s mitochondriemi interaguje také několik proteinů spojených s ALS (SOD1, TDP-43, FUS),
- porucha axonálního transportu,
- akumulace neurofilament; dezorganizace cytoskeletu,
- zhoršený vezikulární transport (geny spojené s vezikulárním transportem a zároveň spojeny s ALS – OPTN, VAPB, CHMP2B, UNC13A), který má za následek akumulaci proteinů,
- sekrece zánětlivých proteinů aktivovaných mikroglie vedoucí k neurozánětu a neurotoxické aktivaci astrocytů,
- excitotoxicita a dysfunkce oligodendrocytů (Mejzini et al., 2019).

Mitochondriální dysfunkce

Mitochondrie plní v buňce řadu důležitých funkcí včetně energetického metabolismu, biosyntézy lipidů, homeostázy vápníku a apoptózy. S mitochondriální dysfunkcí se setkáváme u řady neurodegenerativních onemocnění. Mitochondrie hrají klíčovou roli v přežití buněk. Předpokládá se, že narušení jejich struktury, dynamiky a bioenergetiky je zapojeno také do patogeneze ALS (Smith et al., 2019). Kvůli vysokým energetickým nárokům jsou neurony obzvláště náchylné vůči dysfunkčnosti mitochondrií. Rozsáhlé poškození mitochondrií má za následek odumírání buněk, protože již nemohou produkovat dostatek energie. V centrálním nervovém systému (CNS) je dostatečná dávka energie, která je nutná pro přežití a excitabilitu neuronů většinou závislá právě na mitochondriálních zdrojích. K mitochondriální dysfunkci přispívají mutace v mitochondriální DNA, narušení transkripce a změněná dynamika mitochondrií. V patogenezi ALS může hrát roli snížená mitochondriální kapacita Ca^{2+} , změněná distribuce

Obr. 1. Navrhované patogenní mechanismy u ALS (vytvořeno podle Mejzini et al., 2019)



axonálních mitochondrií, abnormální morfologie mitochondrií, zvýšená produkce ROS a deficit produkce ATP v CNS. Léčba zaměřená na základní mitochondriální procesy vykazuje velký potenciál (Golpich et al., 2017).

Oxidační stres

Oxidační stres (OS) je důsledkem nerovnováhy mezi produkcí a eliminací ROS. Gliové a infiltrované imunitní buňky jsou považovány za hlavní producenty ROS v patologických stavech CNS. Ačkoliv se nevěří, že ROS způsobuje ALS, pravděpodobně zhoršuje její progresi. OS může být zvýšen u familiární i sporadické ALS a může ovlivnit mitochondriální funkci, zhoršit stres endoplazmatického retikula, a také ovlivnit mechanismy homeostázy proteinů, což vede k poškození buněk a ztrátě neuronů (Le Gall et al., 2020; Obrador et al., 2020).

Aberantní metabolismus RNA

V souvislosti s ALS byla pozornost zaměřena také na dysregulaci RNA jako klíčového mechanismu. Důležitou roli v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění (zejména ALS, Alzheimerovy choroby, frontotemporální demence) hraje odpověď metabolismu RNA na stres. Proteiny vázající RNA (RNA binding protein – RBP) řídí využití mRNA během stresu částečně prostřednictvím tvorby organel bez membrán, tzv. stresových granulí (SG). Mnoho těchto proteinů obsahuje prionové domény, které se podílí na tvorbě a dynamice SG, jedná se o komplexy RNA/protein vznikající pod buněčným stresem, které jsou schopny bránit translaci specifických mRNA (neesenciálních transkriptů a proapoptických proteinů), a tím usnadňují přežití buněk, pokud jsou vystaveny stresu. Chronický stres spojený se stárnutím vede ke vzniku chronických perzistentních SG, které pravděpodobně působí jako ohnisko pro agregaci proteinů souvisejících s onemocněním. Předpokládá se, že také prionové domény hrají důležitou roli v reverzibilním sestavení SG. V souvislosti s ALS vzrostl zájem o zapojení SG do její patogeneze. Terapeutické přístupy inhibující akumulaci SG chrání před progresí onemocnění-

ní na zvířecích modelech (Mejzini et al., 2019; Wolozin et Ivanov, 2019).

Genetické faktory

V souvislosti s ALS bylo identifikováno velké množství genetických faktorů, které zvyšují náchylnost nebo ovlivňují rychlost progresse nemoci. Až 10 % případů ALS je přenášeno v rámci rodin (familiární typ), většinou jsou zděděny autosomálně dominantním způsobem, často s vysokou penetrací. První gen spojený s ALS byl popsán v roce 1993 a jednalo se o gen *SOD 1*. Při použití přísných kritérií je možné vytvořit seznam genů, jejichž mutace se jednoznačně podílejí na patogenezi ALS. Tyto geny mění proteostázu a kontrolu kvality proteinů, narušují aspekty stability, funkce a metabolismu RNA, narušují dynamiku cytoskeletu v axonu. Na základě sekvenování DNA u sporadických případů ALS bylo u 1–3 % pacientů zjištěna misense mutace *SOD 1* a dalších 5 % bylo způsobeno intronickou expanzí v *C9orf72* (Taylor et al., 2017).

Molekulární přístupy k léčbě

ALS je nevyléčitelné onemocnění, avšak pokroky v genové terapii otevírají novou perspektivu léčby. Pozornost byla upřena na léčiva cílená na RNA se dvěma hlavními zkoumanými strategiemi, kterými jsou krátká interferující RNA (siRNA) a antisense oligonukleotidy (AO). siRNA lze použít k downregulaci exprese cílových genů, ke kterým jsou komplementární, prostřednictvím interakcí s RNA-indukovaným umlčovací indexem. Přestože již bylo provedeno několik preklinických výzkumů o použití k cílení genů ALS, žádný z nich doposud nedosáhl klinických studií. Přístupy genové terapie zahrnující dodání AO do CNS jsou testovány v klinických studiích u pacientů s mutacemi v *SOD1* nebo *C9orf72*. AO se mohou navázat na RNA a změnit genovou expresi prostřednictvím několika různých mechanismů. Mohou být použity k obnovení či snížení exprese proteinu nebo k modifikaci produkce izoforem proteinu prostřednictvím strategií sestřihu. Léčba neurodegenerativních onemocnění pomocí AO může být v tomto ohledu výhodná, protože

AO lze podávat přímo do CNS intratékálním podáním. AO mohou být slibné pro budoucí terapeutický vývoj pro podskupiny pacientů s ALS (Mejzini et al., 2019; Cappella et al., 2019).

Jak bylo již zmíněno, RBP hrají klíčovou roli v patogenezi ALS. Mutace v proteinu obsahujícím valosin (VCP/p97) způsobuje ALS a vykazuje chybnou lokalizaci RBP, příčinou je změněná funkce D2 ATPázové domény VCP. Ve studii Harley et al. (2021) inhibice domény D2 ve VCP mutantních motorických neuronech dokázala zvrátit nesprávnou lokalizaci TDP-43 a FUS. Jedná se o zajímavou možnost využití inhibitorů VCP D2 ATPázy při léčbě ALS související s VCP. Inhibitory VCP však mohou narušit buněčnou homeostázu a v budoucích studiích bude důležité optimalizovat terapeutickou dávku (Harley et al., 2021).

Závěr

Patofyziologie neurodegenerativních onemocnění může vycházet ze zranitelnosti v buněčném metabolismu. ALS je jedním ze závažných neurodegenerativních onemocnění. Diagnostika ALS je především v počátcích onemocnění složitá. Pochopení molekulárně genetických mechanismů této choroby je důležité k identifikaci budoucích vhodných diagnostických a prognostických biomarkerů, a také biomarkerů vhodných k monitoraci odpovědi pacientů na terapii.

Seznam zkratk

ALS – amyotrofická laterální skleróza
AO – antisense oligonukleotid
ATP – adenosintrifosfát
CNS – centrální nervový systém
EMG – elektromyografické vyšetření
MND – motor neuron disease
OS – oxidační stres
RBP – RNA binding protein
ROS – reaktivní formy kyslíku
SG – stress granule

Podpořeno z Evropského fondu pro regionální rozvoj – projekt ENOCH (reg.č. : CZ.02. 1. 01/0.0/0.0/16_019/0000868).

LITERATURA

1. Cappella M, Ciotti Ch, Cohen-Tannoudji M, Biferi MG. Gene therapy for ALS – a perspective. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4388.
2. Ganesalingam J, An J, Bowser R, Andersen PM, Shaw CH. pNfH is a promising biomarker for ALS. *Amyotroph Lateral*

3. *Scler Frontotemporal Degener*. 2013;14(2):146-9.

3. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: pathogenesis and treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2017;23(1):5-22.

4. Harley J, Hagemann C, Serio A, Patani R. TDP-43 and FUS mislocalization in VCP mutant motor neuron is reversed by pharmacological inhibition of the VCP D2 ATPase domain. *Brain Commun*. 2021;3(3):166.

5. Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):118-30.
6. Ingre C, Ross PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol*. 2015;7:181-93.
7. Kaiserová M, Grambalova Z, Otruba P, et al. Cerebrospinal fluid levels of chromogranin A and phosphorylated neurofilament heavy chain are elevated in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2017;136(4):360-364.
8. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011;77(9769):942-55.
9. Le Gall L, Anakor E, Connolly O, et al. Molecular and cellular mechanism affected in ALS. *J Pers Med*. 2020;10(3):101.
10. Logroscino G, Piccininni M. Amyotrophic lateral sclerosis descriptive epidemiology: the origin of geographic difference. *Neuroepidemiology*. 2019;52(1-2):93-103.
11. Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol*. 2019;32(5):771-776.
12. Mathis S, Couratier P, Julian A, et al. Management and therapeutic perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2017;17(3):263-276.
13. Mathis S, Couratier P, Julian A, Corcia P, Le Masson G. Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res*. 2017;12(2):181-184.
14. Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, et al. ALS genetics, mechanisms, and therapeutic: where are we now? *Front Neurosci*. 2019;13:1310.
15. Obrador E, Salvador R, López-Blanch R, et al. Oxidative stress, neuroinflammation and mitochondria in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(9):901.
16. Smith EF, Shaw PJ, De Vos K. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2019;710:132933.
17. Taylor JP, Brown Jr RH, Cleveland DW. Decoding ALS: from gene to mechanism. *Nature*. 2016;539(7628):197-206.
18. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:3.
19. Wolozin B, Ivanov P. Stress granule and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2019; 20(11):649-666.