

Stwardnienie zanikowe boczne: uwarunkowania genetyczne i transgeniczny model choroby

Paweł GRIEB

Zakład Farmakologii Doświadczalnej

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Opisane w 1869 roku przez francuskiego neurologa Jean-Marie Charcot stwardnienie zanikowe boczne (*Sclerosis lateralis amyotrophica*, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, ALS) jest najczęstszym schorzeniem paralitycznym dorosłych. Jego charakterystyczną cechą jest postępująca, względnie wybiórcza degeneracja motoneuronów w rdzeniu kręgowym i w mózgu, w ciągu 3-5 lat prowadząca do paraliżu mięśni oddechowych i śmierci [1]. Ponury rozgłos ALS zyskało w roku 1941 w USA, gdy stało się przyczyną śmierci jednego z najwybitniejszych sportowców amerykańskich, baseballisty Henry'ego Louisa (Lou) Gehriga znanego jako *Iron Horse* (Żelazny Koń) – stąd schorzenie to jest także znane jako „choroba Lou Gehriga”.

ALS występuje dość rzadko (1-3 nowe zachorowania/100 tysięcy mieszkańców/rok), ale jest chorobą całkowicie nieuleczalną i staje się przyczyną co osiemsetnego zgonu [2]. Jego etiologia pozostaje nieznana. Większość źródeł podaje, że do 20% przypadków ALS jest determinowane genetycznie – to tzw. odmiana rodzinna tej choroby, *familial ALS* (fALS). Jest ona klinicznie nie do odróżnienia od znacznie częściej występującej formy sporadycznej (sALS), choć zwykle rozpoczyna się w nieco młodszym wieku. W 1993 roku Daniel R. Rosen i współautorzy z Day Neuromuscular Research Laboratory, Massachusetts General Hospital, opublikowali w *Nature* doniesienie [3], w którym wykazali powiązanie pomiędzy niektórymi przypadkami fALS a mutacjami w genie enzymu dysmutazy ponadlenkowej typu 1 (*SOD-1*), którego *locus* znajduje się na chromosomie 21. Od opublikowania tej przełomowej pracy liczba znanych mutacji związanych z ALS nieustannie rośnie i obecnie jest ich już ponad 100 [4].

Chociaż, wg niektórych źródeł, tylko 1/5 przypadków fALS jest związana z mutacjami genu *SOD-1* [5], badania dotyczące warunkowania fALS przez obecność zmutowanego enzymu SOD-1 w komórkach stanowią obecnie główny front badań nad patomechanizmem ALS. Przyczyny tego stanu rzeczy są prawdopodobnie dwie. Po pierwsze, powszechnie zakłada się (choć nie wiadomo, czy słusznie), że wyjaśnienie patomechanizmu fALS pomoże w zrozumieniu patomechanizmu sALS. Po drugie, struktura i funkcja enzymu SOD-1 są dosyć dobrze znane.

Dysmutazy ponadtlenkowe katalizują dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-), czyli jego przemianę do tlenu i nadtlenu wodoru (rozkładanego następnie przez katalazę lub

peroksydazę glutationu), $2\text{O}_2^- \xrightarrow{\text{CuZnSOD}} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$, i są istotnymi składnikami układu inaktywującego wolne rodniki tlenowe w organizmie. Znane są 3 typy tych dysmutaz: cytoplazmatyczna SOD-1 zawierająca miedź i cynk, mitochondrialna SOD-2 zawierająca mangan, a także wydzielana na zewnątrz komórek SOD-3 również zawierająca Cu i Zn. SOD-1 jest dimerem o masie cząsteczkowej 32 kDa. Każdy z monomerów zawiera atom Zn który pełni funkcję strukturalną (i odpowiada za szczególnie wysoką termooporność tego białka), atom Cu determinujący jego aktywność katalityczną, oraz mostek dwusiarczkowy.

Wykrycie związku pomiędzy fALS a mutacją w genie *SOD-1* nasunęło przypuszczenie, że patomechanizm ALS może być związany albo z niedoborem aktywności, albo z nadmierną aktywnością SOD-1. Jednak wyłączenie ekspresji SOD-1 u myszy *knock-out* nie powoduje objawów paraliżu, a jedynie zaburzenia rozrodu oraz częściową utratę zdolności do regeneracji aksonów, nadekspresja niezmutowanego („dzikiego”) białka SOD-1 prowadzi zaś co najwyżej do wystąpienia łagodnych objawów dysfunkcji motorycznej u starych zwierząt. Natomiast dodanie do genomu myszy lub szczurów ludzkiego zmutowanego genu SOD-1 powoduje postępującą wybiórczą degenerację motoneuronów rdzenia i neuronów kory ruchowej oraz narastanie objawów paraliżu pod wieloma względami przypominające rozwój ALS u ludzi i prowadzące nieuchronnie do śmierci. W związku z tym transgeniczne myszy bądź szczury, nosiciele zmutowanego ludzkiego genu *hmSOD-1*, są uważane za zwierzęce modele ALS [6]. Do ich wytworzenia wykorzystano różne zmutowane geny *SOD-1*, których związek z fALS stwierdzono w badaniach genetycznych. W większości przypadków były to geny ludzkie z punktowymi substytucjami (hG93A, hG85R, hG37R, hD90A), ale był także gen kodujący skrócone ludzkie białko SOD-1 i zmutowany gen mysiej SOD-1 [7].

Kiedy zmutowany allel *SOD-1* podlega ekspresji na bazie normalnego tła genetycznego, powoduje wystąpienie objawów choroby i skrócenie czasu przeżycia zwierząt. Zwierzęce transgeniczne modele ALS wykorzystuje się w trzech zasadniczych celach: (i) dla ustalenia podobieństw i różnic pomiędzy chorobą u tych zwierząt i ALS u ludzi, (ii) dla zrozumienia patomechanizmu schorzenia, oraz (iii) dla sprawdzenia skuteczności różnego rodzaju terapii. Zagadnienia te są pokrótce omówione poniżej.

1. Walidacja transgenicznych nosicieli *mSOD-1* jako modelu ALS u ludzi

Zwierzęcy model schorzenia ludzkiego powinien zostać poddany walidacji, czyli procesowi ustalenia stopnia jego odpowiedniości (trafności). Niezbędne jest m.in. ustalenie podobieństw i

różnic pomiędzy chorobą ludzką a jej modelem zwierzęcym. W tym przypadku (patrz Tabela 1) podobieństw znaleziono bardzo wiele, różnic zaś zaledwie kilka, a w dodatku mogą one być jedynie pozorne.

U transgenicznych zwierząt z ekspresją ludzkiego zmutowanego genu *SOD-1* opisano szczególny sposób degeneracji mitochondriów, zwany *Mitochondrial Vacuolation by Intermembrane Space Expansion* (MVICE) i polegający na ich przemianie w wodniczki poprzez ekspansję przestrzeni międzybłonowej [8]. Takiego sposobu degeneracji mitochondriów nie zaobserwowano u chorych na ALS – być może dlatego, że zjawisko takie zachodzi tylko we wczesnej, bezobjawowej fazie choroby (w której materiał autopsyjny jest niedostępny), a może również dlatego, że mitochondria są strukturami bardzo nietrwałymi po śmierci i rzadko badanymi w materiale ludzkim. Z kolei akumulacji endokannabinoidów, którą wykryto w rdzeniu kręgowym transgenicznych myszy [9], dotychczas nie poszukiwano w rdzeniach ludzi chorych na ALS.

Niejakim zaskoczeniem jest jednak zupełnie inny wzorzec ekspresji kinaz, fosfataz i fosfoprotein w rdzeniu kręgowym osób zmarłych na ALS i w mózgu transgenicznych myszy z mutacją *SOD-1*^{G93A} [10, 11]. W interpretacji tych wyników należy jednak wziąć pod uwagę, że zmiany pośmiertne zachodzące w ludzkim materiale autopsyjnym muszą w bardzo znacznym stopniu zniekształcać biochemiczny obraz tkanek pobranych z ośrodkowego układu nerwowego, w szczególności w zakresie fosforylacji białek, procesu bezpośrednio sprzężonego z poziomem ATP w komórkach.

2. Pierwsza przyczyna choroby: „zyskanie funkcji” czy „zyskanie zdolności do oddziaływań”?

W transgenicznych modelach ALS czynnikiem inicjującym chorobę jest bez wątpienia ekspresja zmutowanego enzymu *SOD-1*. Wysunięto szereg hipotez mających na celu wyjaśnienie, w jaki sposób dodatkowa obecność zmutowanej dysmutazy prowadzi do śmierci motoneuronów i postępującego paraliżu. Te, które są obecnie najistotniejsze, można podzielić na dwa typy: (i) hipotezy zakładające „zyskanie funkcji” (*gain of function*), oraz (ii) hipotezy zakładające „zyskanie zdolności do nowych oddziaływań” (*gain of interaction*) przez zmutowane białko *SOD-1* [12].

Zgodnie z hipotezami pierwszego typu winę za rozwój choroby ponoszą nowe własności katalityczne zmutowanej dysmutazy, spowodowane zmianami struktury trzeciorzędowej tego białka. Tymi nowymi własnościami mogą być zdolność do wytwarzania rodników

Tabela 1. Ludzkie ALS i zwierzęce transgeniczne modele tej choroby, niektóre podobieństwa i różnice

Poziom obserwacji	Podobieństwa	Różnice
Funkcjonowanie organizmu	Początek w średnim wieku Skrócony czas przeżycia Hipermetabolizm (u ludzi); nadekspresja białek UCP w mitochondriach mięśni szkieletowych	
Neurologia i neuropatologia	Postępujący zanik NAA w obszarach zawierających neurony ruchowe w rdzeniu i korze mózgowej Odnerwienie i degeneracja mięśni szkieletowych Aktywacja mikrogleju i astrocytów Fragmentacja aparatu Golgiego Sferoidy aksonalne Hialinowe wtręty przypominające ciała Levy'ego zawierające ubikwitynę i ufosforylowane neurofilamenty	Przemiana mitochondriów w wodniczki (tylko u zwierząt?)
Neurochemia	Ekscytotoksyczność Stres oksydacyjny i nitrozacyjny Akumulacja sfingomieliny, ceramidów i estrów cholesterolu Akumulacja filamentów pośrednich (IF) w aksonach Umiarkowana akumulacja białek szoku cieplnego (hsp) Gromadzenie agresomów Ekspresja kinaz zależnych od cyklin (Cdk5, p38MAPK) Nadekspresja APE/Ref-1 i PARP (w astrogleju); aktywacja mechanizmu reperacji DNA	Odmienne obraz stanu fosforylacji białek (u ludzi zmiany <i>post mortem</i> ?) Akumulacja endokannabinoidów (tylko u zwierząt?)

hydroksylowych (zamiast nadtlenu wodoru), zdolność katalizowania reakcji peroksydacji, bądź zdolność do przyłączania grup NO do reszt tyrozyny innych białek [13]. Ponieważ mutacje SOD-1 związane z fALS są „porozrzucane” wzdłuż łańcucha białkowego, a niektóre polegają wręcz na jego skróceniu [14], wysunięto przypuszczenie, że zmiany własności katalitycznych zmutowanej SOD-1 są skutkiem „rozluźnienia” konformacji enzymu i utraty specyficzności substratowej. Hipotezy typu *gain of function* są dosyć powszechnie akceptowane, dyskontując wiele dowodów na obecność stresu oksydacyjnego i uszkodzeń wolnorodnikowych zarówno u pacjentów z ALS, jak i u transgenicznych nosicieli zmutowanej SOD-1, oraz szeroko znaną i akceptowaną toksyczność wolnych rodników tlenowych i azotowych.

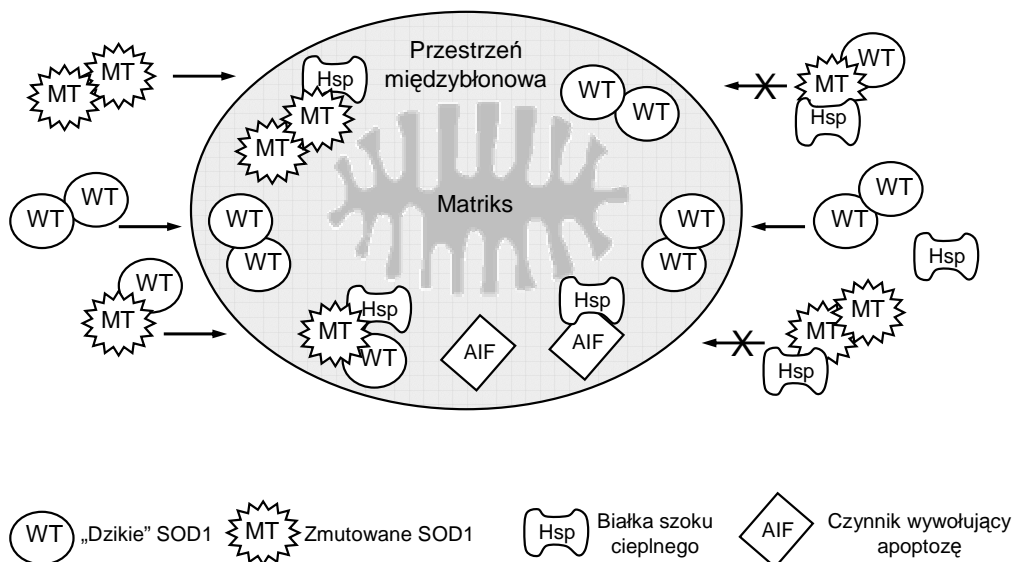
Jednak nie wszystkie obserwacje poczynione na transgenicznych modelach ALS dają się wyjaśnić nowymi funkcjami katalitycznymi zmutowanego enzymu SOD-1. Jest on metaloproteiną złożoną z części białkowej (apoenzymu) i katalitycznej grupy prostetycznej (niebiałkowej) w postaci atomu miedzi, które razem tworzą holoenzym. Wydaje się oczywiste, że aby zmutowany enzym zyskał nową, toksyczną funkcję, musi posiadać centrum aktywne zdolne do przeprowadzania reakcji redoks – to zaś warunkowane jest obecnością Cu. Synteza łańcuchów białkowych SOD-1 następuje na rybosomach, następnie są one transportowane do cytoplazmy, gdzie tworzą dimeryczny apoenzym, do którego na końcu tego procesu dodawany jest atom miedzi. Ponieważ miedź jest toksyczna, wewnątrz komórek jest sekwestrowana przez odpowiednie białka. Do apoenzymu SOD-1 miedź jest dostarczana przez wyspecjalizowane białko „towarzyszące” określane skrótem CSS (*Copper Chaperone for SOD*). Okazało się, że objawy choroby motoneuronów rozwijają zarówno transgeniczne myszy-nosiciele zmutowanej SOD-1 będące jednocześnie *knock-out*'ami pozbawionymi CSS, jak i transgeniczne myszy-nosiciele podwójnej mutacji enzymu SOD-1, która uniemożliwia wiązanie Cu z centrum aktywnym dysmutazy (jest to mutacja H48Q/H46R) [15].

Dla wyjaśnienia mechanizmu rozwoju choroby mimo braku możliwości katalizowania przez zmutowaną SOD-1 reakcji redoks zakłada się, że toksyczność tego białka jest związana nie z uzyskaniem nowej funkcji katalitycznej, lecz z uzyskaniem nowych możliwości interakcji z cząsteczkami białek. U podstaw tego założenia leży spostrzeżenie, że SOD-1 zawiera strukturę która, jeśli nie zostanie prawidłowo sfałdowana, przybiera postać tzw. β -kardki (*β -sheet*) zdolnej tworzyć, przez przyłączenie innych molekuł białkowych, oligomery, fibrylle i agregaty.

Hipotezy zakładające uzyskanie przez zmutowaną SOD-1 zdolności do patologicznych oddziaływań z białkami są dosyć różnorodne. Jedne zakładają, że procesem decydującym o rozwoju choroby jest tworzenie przez zmutowane SOD-1 oligomerów bądź agregatów białkowych, podobnie jak ma to miejsce np. w chorobie Alzheimera czy w chorobach

prionowych [16]. W innych przyjmuje się, że zmutowane molekuly SOD-1 przybierają nieprawidłową konformację, w wyniku czego tworzą kompleksy z komórkowymi białkami opiekuńczymi (chaperonami), które nie ulegają sprawnej degradacji przez proteasomy i odkładają się w komórkach w postaci nierozpuszczalnych inkluzji (agresomów).

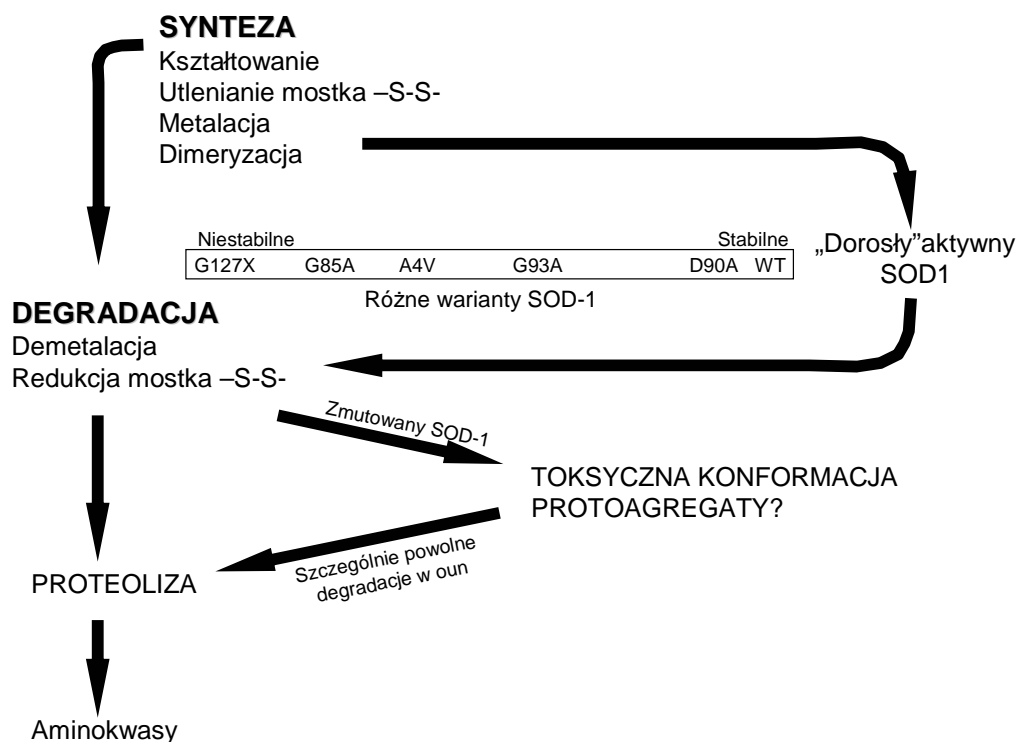
Interesującą hipotezę tego rodzaju (Ryc. 1) przedstawili Ayako Okado-Matsumoto i Irvin Fridovich z Duke Medical Center w Durham (Północna Karolina, USA) [17]. Zaproponowali oni, że nieprawidłowa konformacja (*misfolding*) zmutowanego SOD-1 wymusza jego wiązanie z białkiem szoku cieplnego hsp70. To ostatnie spełnia jednak w komórkach inne istotne role, w szczególności inaktywuje czynnik indukujący apoptozę AIF. Jeśli jest ono nadmiernie zużywane, jego zapas ulegnie wyczerpaniu, czego skutkiem jest m.in. uwolnienie czynnika AIF i aktywacja apoptozy.



Ryc. 1. Patogeneza ALS. Pierwszy przykład hipotezy typu *gain of function* – hipoteza Okado-Matsumoto i Fridovich’a.

Jesienią ubiegłego roku duńsko-szwedzka grupa pod kierunkiem Stefana Marklunda z Umea University przedstawiła inną, nowatorską hipotezę patomechanizmu ALS [18]. Autorzy ci wykryli u pacjenta z fALS nową mutację *SOD-1* (mutację G127X), która charakteryzuje się tym, że zmutowane białko SOD-1 w ogóle nie wykazuje aktywności katalitycznej. Co więcej, w ośrodkowym układzie nerwowym to zmutowane białko podlega szybkiej degradacji, i jego zawartość w tkankach mózgu i rdzenia jest nawet sto razy mniejsza niż w przypadku innych zmutowanych form SOD-1. Jednakże transgeniczne myszy-nosiciele tego zmutowanego genu

rozwijają objawy choroby motoneuronów przypominającej ludzki ALS. Obserwacje te doprowadziły do wniosku, że w fALS stabilność molekuł zmutowanego białka SOD-1 nie ma znaczenia, gdyż chorobę powodują szczególnie toksyczne cząsteczki białka stanowiące subfrakcję pojawiającą się podczas jego degradacji (Ryc. 2).



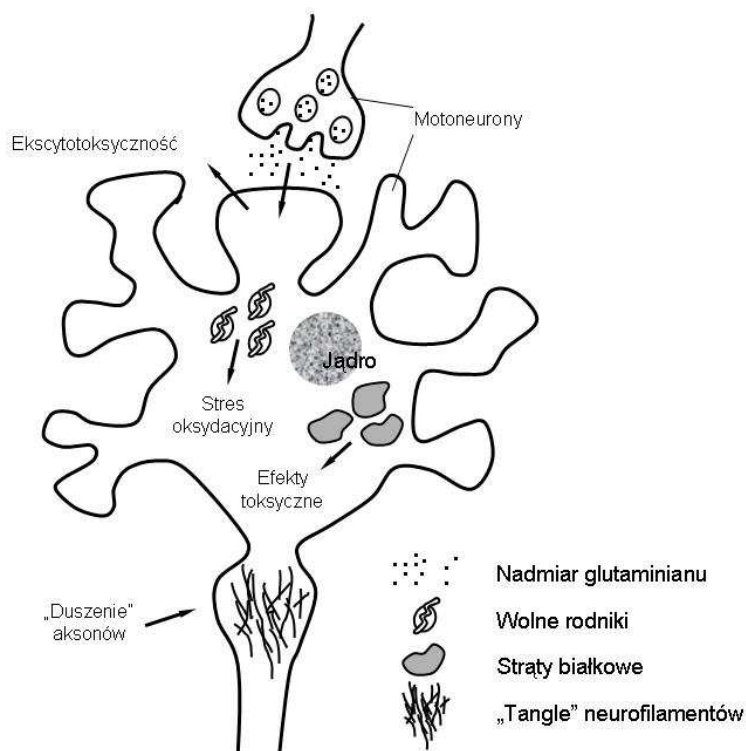
Ryc. 2. Patogeneza ALS. Drugi przykład hipotezy typu *gain of function* – hipoteza Jonssona i wsp.

3. Patomechanizm degeneracji motoneuronów w transgenicznym modelu ALS

Na Ryc. 3 w schematyczny sposób przedstawiono główne rodzaje patologii komórkowych występujące w motoneuronach w rozwoju ALS. W jaki sposób toksyczność zmutowanej SOD-1 je powoduje? Gdyby pierwotną przyczyną choroby było „zyskanie nowych funkcji katalitycznych” przez zmutowany enzym, jej patomechanizm byłby prosty do wyjaśnienia.

Niekontrolowane reakcje wolnorodnikowe powodować będą różnego rodzaju zaburzenia strukturalne i funkcjonalne w komórkach. Dość łatwo wyobrazić więc sobie mechanizmy, przy pomocy których wolnorodnikowe uszkodzenia białek błonowych wychwytyjących glutaminian z przestrzeni pozakomórkowych doprowadzą do przewlekłej ekscytotoksyczności,

uszkodzenia białek neurofilamentów doprowadzą do powstania tzw. „tangli” które zablokują przepływ aksonalny i spowodują tzw. „uduszenie aksonów” (*axonal strangulation*), itp.



Ryc. 3. Główne rodzaje zmian patologicznych występujące w motoneuronach w przebiegu ALS.

Nieco trudniejsze byłoby wyjaśnienie związku wspomnianych patologii komórkowych z „zyskaniem nowych możliwości interakcji” przez cząteczki zmutowanej dysmutazy. Tymczasem, jak wspomniano powyżej, coraz więcej danych wskazuje, że zasadniczą rolę w rozwoju ALS odgrywa nieprawidłowa konformacja zmutowanego SOD-1 powodująca utratę kontroli nad oddziaływaniami międzybiałkowymi i tworzenie nierozpuszczalnych złogów (agresomów) w komórkach. Możliwe, że zasadniczą rolę odgrywają translokacje agregatów białkowych tworzonych z udziałem zmutowanej SOD-1 do mitochondriów (jak to założyli Okudo-Matsumoto i Fridovich). Warto ponadto zauważyć, że hipotezy typu *gain of function* i *gain of interaction* nie muszą się wykluczać, a wręcz mogą się uzupełniać, gdyż mechanizmy wolnorodnikowy i konformacyjny mogą się wzajemnie wzmacniać. Jak wykazano ostatnio, w transgenicznym modelu ALS nitracja białek upośledza nie tylko ich funkcje, ale także procesy ich degradacji [21]. Z drugiej strony wielu badaczy przypuszcza, że amyloid- β (charakterystyczny składnik złogów występujących w mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera) może generować wolne rodniki lub

uczulać komórki na ich toksyczność – nie jest więc wykluczone, że podobne zjawiska mają miejsce w ALS.

Fundamentalnym dla interpretacji wielu (jeśli nie większości) zjawisk obserwowanych w rdzeniach i mózgach transgenicznych zwierząt-modeli ALS jest pytanie, czy są one źródłem toksyczności, czy też odwrotnie, odzwierciedleniem (zapewne nie do końca skutecznej) obrony komórek przed rozwijającym się procesem chorobowym. Czy indukcja białek rozsprzęgających fosforylację (UCP) i powodowane nią rozsprzęgnięcie mitochondriów i hipermetabolizm jest w ALS objawem niekorzystnym, czy może pełni rolę neuroprotekcyjną, podobnie jak ma to miejsce w urazach rdzenia [19]? Czy tworzenie się i gromadzenie agregatów białkowych zawierających cząsteczki zmutowanej SOD-1 jest związane z niewydolnością proteasomów, czy też – jak to niedawno zasugerowano – zjawiskiem uzależnionym od ich funkcji [20]? Czy szkodliwe dla komórek są wytracone agregaty białkowe, czy przeciwnie – ich pojawienie się oznacza zneutralizowanie śmiertelnie niebezpiecznych rozpuszczalnych białkowych fibryli i protoagregatów? Należy żywić nadzieję, że stopniowe wyjaśnianie patomechanizmu ALS pomagać będzie w poszukiwaniach skutecznych metod terapii tej choroby.

4. Czy można skutecznie leczyć transgenicznych nosicieli zmutowanej SOD-1 i co z tego wynika?

Ze względu na niezbyt dużą częstość występowania choroby i rozproszenie terytorialne pacjentów kliniczna ocena farmakoterapii SLA jest logistycznie trudna i bardzo kosztowna. Transgeniczne modele SLA umożliwiają wstępną, przedkliniczną ocenę skuteczności leczenia. Zwierzęta-nosiciele ludzkiego zmutowanego genu poddawane są leczeniu (aktywnemu bądź kontrolnemu), które jest zwykle rozpoczynane tuż przed pojawieniem się symptomów choroby. Punktami końcowymi eksperymentu są zwykle czas do wystąpienia objawów upośledzenia motorycznego, oraz czas przeżycia. Ocenę statystyczną przeprowadza się metodą Kaplana-Meyera. Dla porównywalności wyników wydłużenie czasu przeżycia wyraża się w procentach (Ryc. 4).

W wielu badaniach na transgenicznych mysich modelach SLA stwierdzano wydłużenie czasu do pojawienia się objawów chorobowych i/lub wydłużenie czasu przeżycia [23] (zestawienie przykładowych wyników - patrz tabela 2). Interesujące wyniki uzyskano dla dwóch leków antyeksytotoksycznych, riluzolu i gabapentinu. W doświadczeniach na modelach transgenicznych podawanie riluzolu wydłużało przeżycie zwierząt o 16%, a podawanie

gabapentinu o 8%. Riluzol w eksperymentach klinicznych w niewielkim, lecz statystycznie istotnym stopniu wydłużał przeżycie pacjentów z SLA, podczas gdy gabapentin w ocenie klinicznej nie przynosił statystycznie istotnych efektów. Być może na sprawdzenie w warunkach klinicznych zasługiwać więc będą leki (lub ich kombinacje), które wydłużają czas przeżycia transgenicznych zwierząt o >10%.

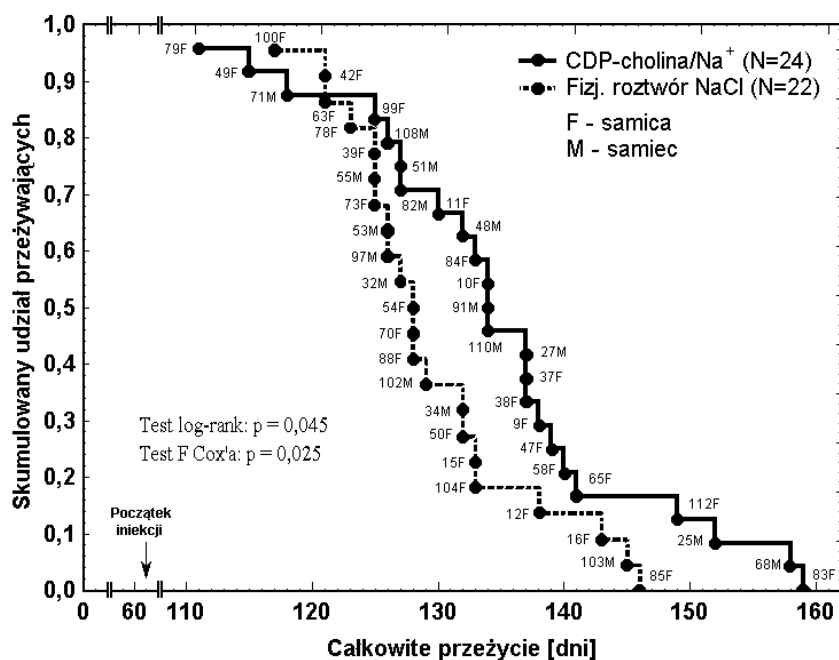
Tabela 2. Przykładowe wyniki farmakoterapii w mysich modelach ALS.

Testowana substancja	Sposób działania	Wpływ leczenia na czas przeżycia
Koenzym Q	wymiatacz wolnych rodników	+4,6%
N-acetylocysteina	wymiatacz wolnych rodników	0; +9,6%
Kwas liponowy	wymiatacz wolnych rodników	+6%
Karboksyfulleren	wymiatacz wolnych rodników	+6,4%
Katalaza-poliamina	enzym antyoksydacyjny	+10,8%
EUK-8	mimik SOD/katalazy	+7,7%
EUK-134	mimik SOD/katalazy	+10,4%
Riluzol	antyekscytotoksyna	+12%
Gabapentin	antyekscytotoksyna	+6%
Wyciąg z <i>Panax quinquefolium</i>	bioaktywne substancje amerykańskiego żeń-szenia	+5,3%
WHI-p13	inhibitor Janus-kinazy 3	+49%
Winkrystyna	cytostatyk	+12%
Arimocloamol	koinduktor hsp	+25%

Od ponad roku prowadzimy w IMDiK PAN hodowlę transgenicznych szczurów-nosicieli mutacji hSOD-1^{G93A}. Jest to szczep udostępniony nam przez Davida S. Howlanda i firmę Wyeth (USA).

Wynik jednego z wykonanych przez nas eksperymentów przedstawiony jest na ryc. 4. Uważamy go za ważny z tego powodu, że użyta przez nas substancja, citikolina (CDP-cholina) jest naturalnym składnikiem ustroju, wykazuje aktywność neuroprotekcijną m.in. w udarach mózgu i w chorobie Alzheimera, a także jest bardzo mało toksyczna [25]. Co prawda wydłużenie czasu przeżycia było niewielkie (średnio ok. 4%), ale przypuszczamy, że wyjaśnienie

mechanizmu tego efektu może stać się inspiracją do nowego podejścia do farmakologicznej terapii ludzkiego ALS.



Ryc. 4. Krzywe przeżycia transgeniczných szczurów-носicieli mutacji G83A ludzkiego *SOD-1* leczonych citikoliną (CDP-choliną) jako przykład metody określania skuteczności farmakoterapii zwierzęcego modelu ALS (Materiał Zakładu Farmakologii Doświadczalnej IMDiK PAN, dane nie publikowane).

Piśmiennictwo

1. Haverkamp LJ i wsp. (1995) Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain* 118:707-19.
2. Yoshida S i wsp. (1986) Follow-up study on amyotrophic lateral sclerosis in Rochester, Minn., 1925 through 1984. *Neuroepidemiology* 5:61-70.
3. Rosen DR i wsp. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
4. Hough MA i wsp. (2004) Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: structures of motor neuron disease mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5976-81.

5. Grieb P (2004) Transgenic models of amyotrophic lateral sclerosis. *Folia Neuropathol* 42:239-48.
6. Hand CK i wsp. (2002) A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. *Am J Hum Genet* 70:251-6.
7. Kunst CB i wsp. (2000) Genetic mapping of a mouse modifier gene that can prevent ALS onset. *Genomics* 70:181-9.
8. Xu Z i wsp. (2004) Mitochondrial degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Bioenerg Biomembr* 36:395-9.
9. Witting A i wsp. (2004) Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1 G93A transgenic mice. *J Neurochem* 89:1555-7.
10. Hu JH i wsp. (2003a) Protein kinase and protein phosphatase expression in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *J Neurochem* 85:432-42.
11. Hu JH i wsp. (2003b) Protein kinase and protein phosphatase expression in the central nervous system of G93A mSOD over-expressing mice. *J Neurochem* 85:422-31.
12. Cleveland DW i Liu J (2000) Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS? *Nat Med* 6:1320-1.
13. Elliott JL (2001) Zinc and copper in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:1169-85.
14. Zu JS i wsp. (1997) Exon 5 encoded domain is not required for the toxic function of mutant SOD1 but essential for the dismutase activity: identification and characterization of two new SOD1 mutations associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurogenetics* 1:65-71.
15. Valentine JS i Hart PJ (2003) Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3617-22.
16. Ross CA i Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl:S10-7.
17. Okado-Matsumoto A i Fridovich I (2002) Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9010-4.
18. Jonsson PA i wsp. (2004) Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 127:73-88.
19. Jin Y i wsp. (2004) The mitochondrial uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial function, attenuates oxidative damage, and increases white matter sparing in the contused spinal cord. *J Neurotrauma* 21:1396-404.

20. Puttaparthi K i wsp. (2003) Aggregate formation in the spinal cord of mutant SOD1 transgenic mice is reversible and mediated by proteasomes. *J Neurochem* 87:851-60.
21. Casoni F i wsp. (2005) Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: Possible multifunctional role in the pathogenesis. *J Biol Chem* Feb 7 [Epub ahead of print].
22. Behl C (2005) Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. *Subcell Biochem* 38:65-78.
23. Dib M (2003) Amyotrophic lateral sclerosis: progress and prospects for treatment. *Drugs* 63:289-310.
24. Howland DS i wsp. (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 USA* 99:1604-9.
25. Adibhatla RM i Hatcher JF (2005) Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. *Neurochem Res* 30:15-23.