

Amiyotrofik Lateral Skleroz'un Moleküler Biyolojisi / Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Aslıhan Özoğuz, R. Mine Güzel, A. Nazlı Başak

Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İSTANBUL

ÖZET

Amiyotrofik Lateral Skleroz'un Moleküler Biyolojisi adlı derleme yazısı üç ana bölümden oluşmaktadır.

Birinci bölümde Amiyotrofik Lateral Skleroz'un (ALS) tarihçesi, kliniği ve genetiği tartışılmıştır. Amiyotrofik Lateral Skleroz hastalığı ailesel ve sporadik olmak üzere iki büyük gruba ayrılır. Ailesel ALS'de, hem dominant, hem resesif geçiş görülür. Burada tanımlanan genlere ilaveten özellikle sporadik ALS'de de rol oynadığı düşünülen yatkinlık genleri vardır. ALS araştırmalarında önemli bir dönüm noktası, genetik geçişli ALS olgularının %20'sine Süperoksit Dismutaz1 (SOD1) genindeki mutasyonların neden olduğunun anlaşılmasıdır. Ailesel ALS ve Sporadik ALS klinik ve patolojik özellikleri açısından benzerlik gösterdiği için, ALS patogenezinine yönelik çalışmalar, hastalıkta çok önemli bir rol oynadığı bilinen SOD1 proteini ve patolojisi üzerine yoğunlaşmıştır.

İkinci bölümde SOD1 geni ve proteini üzerine yapılan çalışmalar ve özellikle de moleküler patogenezdaki olası mekanizmalar açıklanmıştır.

Üçüncü bölümde ise, ALS araştırmalarındaki güncel durum tartışılmıştır.

Özet olarak, ALS'de tedavi olanakları halen genetik ve patojenik mekanizmalardaki ilerlemeye oranla her ne kadar geri kalmışsa da, RNA Interference ve kök hücre gibi son gelişmeler iyimser olma nedenleridir.

ABSTRACT

Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis

This review paper on the Molecular Biology of Amyotrophic Lateral Sclerosis consists of three main parts.

In the first part, history, clinical features and genetics of ALS have been discussed. ALS can be considered under two main groups: familial and sporadic ALS. Familial ALS, in turn, is classified into two main groups according to its inheritance pattern, dominant FALS and recessive SALS. In addition to the genes which give rise to FALS, also in SALS patients, several genes have been identified. A landmark discovery in ALS research is the identification of mutations in the Superoxide Dismutase1 (SOD1) gene as the primary cause of 20% of instances of familial ALS. Since FALS and SALS are clinically indistinguishable and pathologically very similar, research on the molecular pathogenesis of ALS has concentrated on the SOD1 protein and its pathology.

In the second part of this review, research on SOD1 gene and protein has been compiled, with a special emphasis on the possible mechanisms playing a role in the molecular pathogenesis.

In the third part of this review, state-of-the-art research on ALS has been discussed.

In summary, although therapy development is currently lagging behind the elucidation of the genetic and pathogenic mechanisms involved in ALS, there is enough reason to be optimistic. RNA Interference and stem cell research are promising new approaches in the creation of effective therapies for ALS.

Anahtar Kelimeler: ALS, SOD1 geni, SOD1 proteini, moleküler patogenez

Yazışma Adresi: Prof. Dr. A. Nazlı Başak
Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve
Genetik Bölümü, Bebek, İSTANBUL
Tel: 0212 359 66 79 basak@boun.edu.tr

Keywords: ALS, SOD1 gene, SOD1 protein, molecular pathogenesis

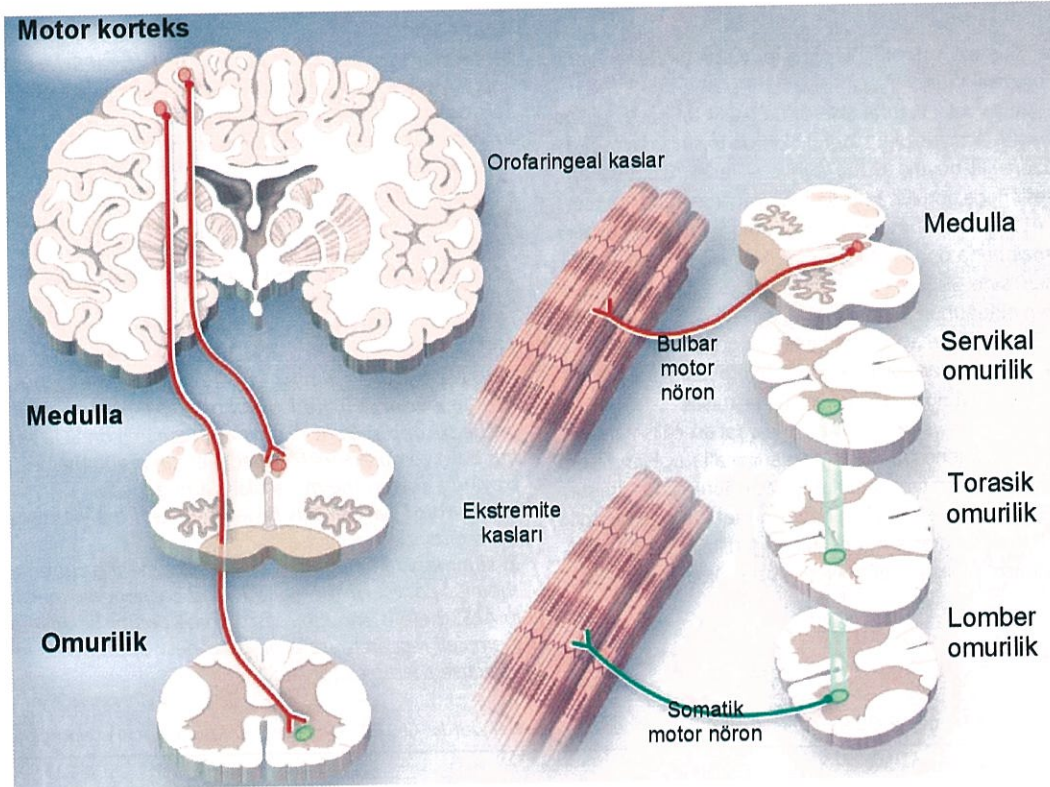
GİRİŞ

İlk olarak 1869'da Fransız nörobiyolog ve hekim Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanmış olan **Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS)** yetişkinlerde en sık görülen motor nöron hastalığıdır.^(1,2) Kaslarda ortaya çıkan körelme ve zayıflama, ve de otopsi sırasında palpasyonda görülen omuriliğin lateral kolonlarındaki sertleşme hastalığa adını vermiştir. * ABD, Avrupa'nın geneli ve tüm Fransızca konuşulan ülkelerde ALS ismi tercih edilmekle beraber, başta İngiltere olmak üzere bazı ülkelerde **Motor Nöron Hastalığı** terminolojisi de kullanılmaktadır.⁽³⁾ Amerika'da 1930'larda bu hastalığa yakalanan efsanevi beyzbol oyuncusu Lou Gehrig'e ithafen **Lou Gehrig Hastalığı** olarak da anılan ALS, ülkemizde de ünlü bir futbolcunun ALS tanısı almasıyla daha fazla bilinir hale gelmiştir.

Nobel ödüllü astrofizikçi Stephen Hawking'in uzun yıllardır çok yavaş ilerleyen bir türüyle mücadele ettiği ALS,

*Amyotrophic Lateral Sclerosis:
• A = absence of,
• myo = muscle,
• trophic = nourishment,
• lateral = side (of spinal cord),
• sclerosis = hardening or scarring

korteks, beyin sapı ve omurilikteki motor nöronların selektif ölümüyle tanımlanır (beyin sapındaki okulomotor çekirdekler ve omurilikteki Onuf çekirdekleri hariç,⁽⁴⁾ Resim 1). Hastalığın tanısı "El Escorial Kriterleri"ne uygun olarak yapılır⁽⁵⁾ (Tablo 1). Sözkonusu bölgelerdeki motor nöronların ölümü, istemli kaslarda hızlı bir yıkıma neden olur. Genellikle el, ayak, yutak veya dilde başlayan ve progresif bir şekilde yayılan bu kas zayıflamalarına duyu kaybı eşlik etmez. Ayrıca hastanın entellektüel işlevlerinde de (kognitif işlevler ve bellek) azalma olmaz, bununla beraber hastalarda görülme sıklığı %3-5 arasındadır. İskelet kaslarının ilerleyici ve yaygın felcine neden olan, konuşma ve yutma güçlüğüne yol açan ALS, genellikle solunum kasları ve diyaframın denervasyonu neticesinde ölüme sonlanır. Ortalama 1-5 yıl içinde ölüme götüren bu terminal hastalığın genel popülasyonda görülme sıklığı 2-6/100.000'dir. Hastalık başlangıç yaşı 50-60 olarak kabul edilmekle beraber juvenil olgularla da karşılaşmaktadır.^(2,6-10) Dünya'da ~60-70.000, Türkiye'de ise ~3500-5000 ALS hastası olduğu tahmin edilmektedir.⁽¹¹⁾



Resim 1. ALS'de özgün olarak etkilenen motor nöronlar. Motor korteksteki motor nöronların dejenerasyonu belirgin yukarı motor nöron bozukluğuna neden olur: aşırı aktif tendon refleksleri, Hoffmann ve Babinski belirtileri ve klonus. Beyin sapı ve omurilikteki aşağı motor nöronların dejenerasyonu ise, kas atrofisi, kas güçsüzlüğü, faskülasyon ve tendon reflekslerinin kaybına yol açar.⁽³⁾

Tablo 1. Yenilenmiş El Escorial Kriterleri

Klinik olarak kesin ALS	- En az üç farklı bölgede klinik YMN ve AMN belirtileri
Klinik olarak muhtemel ALS	- En az iki farklı bölgede klinik YMN ve AMN belirtileri (Bazı YMN belirtilerinin AMN belirtilerine göre daha rostral olması şartıyla)
Laboratuvar destekli, muhtemel ALS	- Bir bölgede klinik YMN ve AMN belirtilerine ek olarak, iki veya daha fazla bölgede AMN belirtilerinin elektrofizyolojik tespiti - Bir bölgede klinik YMN belirtilerine ek olarak, iki veya daha fazla bölgede AMN belirtilerinin elektrofizyolojik tespiti
Olası ALS	- Sadece bir bölgede klinik YMN ve AMN belirtileri - En az iki farklı bölgede klinik YMN belirtileri - YMN belirtilerine göre rostral AMN belirtileri (Başka bölgelerde elektrofizyolojik AMN bulguları olmaması şartıyla)

YMN: yukarı motor nöron; AMN: aşağı motor nöron

ALS'de hem yukarı, hem aşağı motor nöronların tutulumu görülürken, Primer Lateral Skleroz'da (PLS) sadece yukarı motor nöron bozukluğu, Progresif Müsküler Atrofi'de (PMA) ise yalnız aşağı motor nöronların dejenerasyonu söz konusudur. Bu sendromlar yine de ALS'nin bir türü olarak kabul edilir, zira otopside hem yukarı, hem aşağı motor nöron anomalisi vardır. PLS ve PMA tüm geç-başlangıçlı motor nöron hastalıklarının ancak %10'unu oluşturur. Olguların %95'inde ALS tanısı doğru konmakla birlikte, yine de özgün bir tanı testi bulunmadığı için, ALS'yi diğer motor nöron hastalıklarından, özellikle de Hareket Bozukluğu ve CAG Tekrarı Hastalıkları kategorisine dahil edilen Spino-Bulbar Müsküler Atrofi'den (SBMA) ayırdetmek zor olabilir.^(3,10)

ALS'İN MOLEKÜLER PATOLOJİSİ

Motor işlevlerinin kaybına ek olarak, hastalıktan etkilenen beyin bölgeleri ve omurilikteki motor nöronlar birçok patolojik değişim de gösterirler.⁽¹²⁾ ALS'ye özgü bu patolojik bulgular, fare modelinde (SOD1^{Gly93Ala}) gözlenen kas zayıflamasına göre dört ana evreye ayrılır: i. kas zayıflamasından önceki evre (PMW: *pre-muscle weakness*: kas gücü normal); ii. hızlı yıkım evresi (RD: *rapid decline*: %50 kas yıkımı); iii. yavaş yıkım evresi (SD: *slow decline*: becerilerde azalma); iv. paraliz evresi (Para: *paralysis*). RD ve SD evrelerinde motor aksonlarının büyük kısmı halen korunmuştur, en büyük yıkım paraliz evresinde olur. Yine RD evresinde motor aksonlar gibi motor nöronların da büyük kısmı halen korunmuştur. Motor nöronların sayısı paraliz evresine doğru hızla azalır, paralizde ise tamamen yıkıma uğrarlar. Kas gücünün azalmaya başlamasından önceki (PMW evresi) en önemli değişiklik mitokondrielerde görülen anomalilerdir.

Mitokondri morfolojisindeki bu anomaliler, genişlemiş ya da disorganize olmuş mitokondri kristalleri, mitokondri dış membranının sızdırmaya başlaması ve zamanla yapısının tamamen bozulması, ve de mitokondri kalıntıları taşıyan erken vakuollerin oluşumu şeklindedir. Aksonlardaki vakuollerin yakınında nörofilament birikimleri görülür, bu da yavaş aksonal transporttaki bozulmanın RD evresi öncesi başladığını gösterir. Diğer taraftan, vakuol oluşumu geçici bir süreçtir: kas güçsüzlüğü ile birlikte başlar, ama vakuol oluşumu son evreye doğru gittikçe azalır ve boyutları küçülür.⁽¹³⁾

ALS olgularında görülen diğer bir önemli histopatolojik değişiklik ise nöronal Golgi kompleksinin fragmentasyonudur.⁽¹⁴⁾ SOD1^{Gly93Ala} transgenik farelerde yapılan güncel deneyler, Golgi kompleksinin fragmentasyonunun ve protein agregat oluşumunun RD evresinden önce başladığını göstermektedir.⁽¹⁵⁾

ALS'İN GENETİĞİ

ALS olgularının %90-95'i sporadiktir (Sporadik ALS "SALS"). Hastalığın geri kalan %5-10'luk bölümü ise genetik geçişli, ya da aileseldir (Familial ALS "FALS").⁽¹⁶⁾ Bu ailesel geçiş otozomal dominant veya otozomal resesif, ya da X'e bağlı olabilir (Tablo 2). FALS olgularının çoğunluğu otozomal dominant geçişlidir. SALS ile FALS'ın klinikteki görüntüsü birbirine çok benzemektedir, bununla beraber birtakım farklılıklar vardır: i. FALS'ta hastalık başlangıç yaşı yaklaşık 10 yıl daha erkendir. ii. FALS'ta kadın:erkek oranı 1:1, SALS'ta ise 1:1.7'dir.⁽¹⁷⁾ Ama SALS'taki bu oran ilerleyen yaşla birlikte değişir ve 70 yaşından sonra 1:1'e ulaşır. iii. Bazı FALS hastalarının prognozu SALS hastalarına göre daha kötü, bazılarının ise daha iyidir.⁽¹⁸⁾

Tablo 2. Ailesel Amiyotrofik Lateral Skleroza neden olan Genler

Sınıflandırma	Kromozom Bölgesi	Gen Ürünü	Kalıtım Şekli	Hastalık Başlangıcı
ALS-1	21q22.1	SOD1	OD/OR(Asp90Ala)	yetişkin
ALS-2	2q33	Alsin	OR	jüvenil
ALS-3	18q21	bilinmiyor	OD	yetişkin
ALS-4	9q34	Senataksin	OD	jüvenil
ALS-5	15q15.1-q21.1	bilinmiyor	OR	jüvenil
ALS-6	16q12	bilinmiyor	OD	yetişkin
ALS-7	20p13	bilinmiyor	OD	yetişkin
ALS-8	20q13.3	VAPB	OD	yetişkin
ALS-FTD	9q21-q22	bilinmiyor	OD	yetişkin
ALS-Dem/Park	17q21.1	TAU	OD	yetişkin
ALS-X	Xp11-q12	bilinmiyor	XD	yetişkin

Ailesel geçiş gösteren ALS tipleri dominant ve resesif FALS olarak iki büyük gruba ayrılırlar.

Dominant FALS

• ALS-1:

Siddique ve arkadaşlarının ailesel ALS olgularının bir kısmının 21. kromozoma bağlantı gösterdiğini tanımlamasından dört yıl sonra, hastalığın üzerindeki sır perdesi yine aynı grubun, sorumlu genin, Cu-Zn,Süperoksit Dismutaz (SOD1) enzimini kodladığını ve gen üzerindeki mutasyonların ailesel ALS'ye neden olduğunu göstermesiyle kısmen aralanmıştır.^(19,20,21) ALS'nin Charcot tarafından tarif edilmesinden 124 yıl sonra elde edilen bu bulgu, hastalık mekanizmasının anlaşılması ve uygun tedavi şemaları geliştirilmesi açısından önemli bir dönüm noktasıdır.

• ALS-3:

ALS-3, ailesel Amiyotrofik Lateral Skleroz'un yetişkin yaşlarda başlayan otozomal dominant geçişli bir formudur. 18. kromozomdaki bir gende meydana gelen mutasyonun hastalığa neden olduğu geniş bir Avrupalı ailede gösterilmiştir.⁽²²⁾ Gen ve mutasyon hala tam olarak tanımlanamamıştır.

• ALS-4:

Bir başka otozomal dominant geçiş gösteren FALS tipi ise ender görülen ALS-4'tür. Jüvenil dönemde başlayan bu hastalığın ilerlemesi yavaştır ve bulbar etkilenme yoktur. ALS olgularının çoğunun aksine bu tipteki hastalar daha normal bir yaşam sürerler. Her ne kadar sonunda tekerli sandalyeye mahkum olsalar da, nefes alıp-verme ve yutkunma yeteneklerini kaybetmezler. Hastalığın bu formundan sorumlu olan bölgenin, 9. kromozomdaki "SETX" geni ve üzerindeki üç *missense* mutasyon olduğu

gösterilmiştir. SETX geni, 302.8 kDa büyüklüğünde, "senataksin" adı verilen bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin görevi tam olarak bilinmemekle beraber DNA/RNA-helikaz enzimatik aktivitesine sahip bir bölgesi olduğu gösterilmiştir. Mutasyonlar sonucu proteinde meydana gelen değişimlerin (Thr311e; Leu389Ser; Arg2136His), helikaz aktivitesini ya da *RNA editing*'deki diğer aşamaları bozarak nöronal dejenerasyona yol açtığı düşünülmektedir.^(23,24)

• ALS-6:

Ailesel geçişli ALS tanısı alan fakat SOD1 mutasyonu taşımayan bazı ailelerin incelenmesiyle, 16. kromozomda yeni bir ALS lokusu bulunmuştur. Bu bölgedeki bir genin mutasyona uğramasıyla ortaya çıkan ve ALS-6 olarak adlandırılan bu FALS tipi, yetişkin yaşlarda başlamakta ve otozomal dominant bir kalıtım göstermektedir.^(25,26,27) Gen ve mutasyon halen bilinmemektedir.

• ALS-7:

Yine SOD1 mutasyonu taşımayan FALS'lı ailelerin incelenmesiyle bir başka ALS lokusu daha tanımlanmıştır. 20. kromozomda bulunan bir gendeki mutasyonların ALS-7 adı verilen bu FALS tipine yol açtığı düşünülmektedir. ALS'nin bu formu da yetişkin dönemde ortaya çıkmakta ve otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır.⁽²⁷⁾ Henüz gen ve mutasyon belirlenmemiştir.

• ALS-8:

ALS-8 aynı zamanda "Atipik Amiyotrofik Lateral Skleroz" olarak da adlandırılır. Brezilyalı büyük bir ailede, FALS'ın bu atipik formu için yeni bir gen lokusu 20. kromozoma haritalanmıştır. Bu bölgede aday genlerin araştırılması, "veziküle-bağlı membran proteini/sinaptobrevine-bağlı membran proteini B" (VAPB) geninde yeni bir *missense*

mutasyon tanımlanmasını sağlamış ve ALS-8'e yol açan genin mutant VAPB olduğu anlaşılmıştır.^(28,29)

• ALS-X:

FALS'ın dominant bir başka tipi de X kromozomuna bağlantılı bulunmuştur. Yetişkin dönemde ortaya çıkan ve yavaş ilerleyen bu hastalıkla ilgili klinik ve moleküler bilgiler henüz çok azdır.⁽³⁰⁾

• ALS-FTD:

Yukarıda tarif edilen saf FALS'ların yanında, ailesel ALS zaman zaman çok sistemli bir nörodejenerasyonun parçası olarak da karşımıza çıkabilir. Bu örneklerden biri olan "ALS-Frontotemporal Demans Kompleksi" (ALS-FTD) 9. kromozoma haritalanmıştır. Bu hastalarda/ailelerde ALS ve demans birlikte görülür. ALS belirtilerine ek olarak, beynin frontotemporal bölgesinde atrofi meydana gelir. Hastalık yetişkin dönemde başlar ve otozomal dominant ailesel geçiş gösterir; sporadik olarak ortaya çıktığı olgular da vardır.⁽³¹⁾

• ALS ve Demans/Parkinsonizm:

Bazı durumlarda, motor nöron kayıplarına, 17. kromozoma lokalize edilmiş olan demans-parkinsonizm-amiyotrofi kompleksinin bir parçası olarak da rastlanabilir. Bu bölgede "tau" geni vardır, ve tau genindeki mutasyonların ailesel frontotemporal demansa yol açtığı bilinmektedir. Ama ALS ve frontotemporal demans birlikteliğinin görüldüğü ailelerin hiçbirinde bugüne kadar tanımlanmış tau mutasyonlarına

rastlanmamıştır. Epidemiyolojik bulgular ALS hastalarının yakınlarında ailesel demans ve parkinsonizm birlikteliğinin sık olduğunu göstermiştir; ALS, demans ve parkinsonizmin ailesel agregasyonu her üç hastalıkta ortak genetik faktörlerin etkili olduğunu ortaya koymaktadır, bu da yaygın bir nörodejenerasyona olan ailesel yatkınlık göstergesi olarak kabul edilebilir.^(32,33,34)

• Bulbar ALS (Bulbar başlangıç, hafif seyir ve Bunina cisimcikleri):

Nispeten hafif seyreden bu hastalık, şimdiye kadar bir Japon ailede gösterilmiştir; otozomal dominant geçişlidir. Gen lokusu belli değildir.⁽³⁵⁾

Resesif FALS

• ALS-1:

SOD1 genindeki Asp90Ala mutasyonu otozomal dominant FALS olgularında tanımlanmış bir mutasyondur. Ancak, İskandinav kökenli bazı ailelerde hastalığın sadece Asp90Ala homozigot bireylerde gözlenmesi, bu mutasyonun resesif olarak da kalıtılabildiğini ortaya koymuştur.^(36,37,38,39) Dolayısıyla Asp90Ala değişiminin hem resesif, hem de dominant bir geçiş özelliği gösterebildiği anlaşılmıştır (Bkz. SOD1 Geni ve SOD1 Proteini).

• ALS-2:

Otozomal resesif bir kalıtım gösteren ALS-2, juvenil dönemde başlayan bir ALS tipidir. Ortaya çıkış sebebinin, 2. kromozomda bulunan ve "alsin" adlı proteini kodlayan "ALS-

Tablo 3. Sporadik ALSye neden olduğu düşünülen genler ve yatkınlık genleri

Gen / Gen Ürünü	Kromozom Bölgesi	Olası mekanizma	
NF-H	Nörofilament ağır zinciri	22q12.2	NF bütünlüğünün bozulması
NF-L	Nörofilament hafif zinciri	8p21	NF bütünlüğünün bozulması
PRPH	Periferin	12q12-q13	NF bütünlüğünün bozulması
EAAT2	Glutamat taşıyıcısı	11p13	Azalmış ekspresyon
AMPA	Glutamat reseptörü	4q32-q33	RNA editing hataları
mtDNA	Mitokondri proteinleri	mtDNA	Mutasyonlar
COX 1	Sitokrom C oksidaz alt ünitesi-1	mtDNA	Mutasyonlar
SOD2	Manganez süperoksit dismutaz	6q25.3	Enzim düzeyinde azalma ??
ApoE	Apolipoprotein E	19q13.2	e4 aleli
APEX	Apürinik apirimidinik endonükleaz	4q12	Enzim düzeyinde azalma
CYP2D6	Sitokrom P450 debrisoekin hidroksilaz	22q13.1	Polimorfik değişimler
CNTF	Siliar nörotrofik faktör	11q12.2	Azalmış ekspresyon
SMN2	SMN proteini	5q12.2-q13.3	Kopya sayısının eksilmesi
LIF	Lösemi inhibitor faktör	22q12.1-q12.2	Mutasyonlar
PSEN1	Presenilin-1	14q24.3	Alel 2
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü	6p12	Promotor polimorfizmleri
HFE	Hfe (Hemakromatoz proteini)	6p21.3	Mutasyonlar

2" genindeki mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. Bu genin ürünü olan alsin, bir "GTPaz regülatörü"dür. ALS-2 olgularında hastalık çoğunlukla on yaşından erken başlar ve çok yavaş bir seyir izler.^(40,41)

• ALS-5:

Otozomal resesif juvenil ALS'ye diğer bir örnek de ALS-5'tir. Resesif kalıtım gösteren ALS'ler arasında en sık rastlanan tip olan ALS-5, 15. kromozomda bulunan bir gendeki mutasyonlarla ortaya çıkmaktadır.⁽⁴²⁾ Yavaş bir ilerleme gösteren ALS-5 ile ilgili olan gen ve mutasyon henüz belirlenmemiştir.

SPORADİK ALS'DE GENETİĞİN ROLÜ

Sporadik ALS olgularının patogenezinde, birçok başka faktörün yanında hastanın genetik yapısının da katkısı olduğundan şüphelenilmektedir. SALS olgularının bir kısmında, hastalığa yol açan veya hastalığa yatkınlığı belirleyen birtakım genler bildirilmiştir (Tablo 3).

• SOD1 mutasyonları ve SALS:

SALS hastalarının bir kısmında da SOD1 geninde mutasyonlar bildirilmiştir. Fakat bu olgular aslında "görünüşte" sporadik olarak değerlendirilirler, çünkü birçok hastada ya aile öyküsü tam değildir, ya da ebeveynler erken ölmüşlerdir.⁽⁴³⁾ Bazı araştırmacılar ise SALS'ın, SOD1 genindeki mutasyonlardan ziyade, protein düzeyindeki modifikasyonlar sonucu ortaya çıktığını ileri sürmektedirler, ama henüz bu hipotezi doğrulayan veriler yoktur.⁽⁴⁴⁾

• Nörofilament genleri:

Motor nöron hücrelerinin gövdeleri ve aksonlarındaki aşırı ara filament (*intermediate filament*) birikimi ALS'nin genel patolojik belirtilerinden biri olduğu için, nörofilament organizasyonundaki anormalliklerin ALS patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. NF-L, NF-M ve NF-H olmak üzere üç alt birimden oluşan nörofilamentler, motor nöronlarda bulunan temel ara filament tipidir.⁽⁴⁵⁾ 22. kromozomdaki NF-H alt ünitesini kodlayan gende mutasyon taşıyan ALS hastaları (SALS, FALS) bildirilmiştir. Ayrıca, *in situ hibridizasyon* yöntemi ile, ALS hastalarının dejeneren motor nöronlarında NF-L mRNA düzeyinin önemli ölçüde düştüğü gösterilmiştir.⁽⁴⁶⁾

Bir başka ara filament tipi olan periferin ise, ALS'li hastaların dejeneren motor nöronlarındaki aksonal sferoidler ile bağlantılı bulunmuştur.⁽⁴⁷⁾ Motor nöronlarında periferini aşırı düzeyde sentezleyen transgenik farelerin, geç başlayan

motor nöron hastalığı geliştirdikleri görülmüştür.⁽⁴⁸⁾ Ayrıca ALS hastalarında yapılan çalışmalarda, periferin geni üzerinde ALS ile ilgili olabileceği düşünülen bazı mutasyonlar da tanımlanmıştır.⁽⁴⁹⁾

• Eksitotoksisite genleri:

Eksitotoksik mekanizmalar da ALS patogenezinde rol oynadığı düşünülen faktörlerdendir. Bunu kanıtlayan gözlemler mevcuttur: ALS hastalarında, motor nöron sistemindeki temel eksitator nörotransmitter olan glutamat miktarı serebrospinal sıvılarda artmış, buna karşılık beyin ve omurilikteki glutamat taşınması azalmıştır. Glutamat taşıyıcılarından *Eksitator Aminoasit Taşıyıcısı 2 (EAAT2)* ve glutamat reseptörlerinden *α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksalol propionik asit (AMPA)*, bu durumdan sorumlu olduğu düşünülen moleküllerdir.^(50,51,52,53)

• Mitokondri Metabolizması:

Kalıtılmış ya da sonradan kazanılmış mitokondri işlev bozukluğunun ALS patogenezinde önemli bir rolü olduğuna dair bulgular gün geçtikçe artmaktadır. SALS hastalarının kas biyopsilerinde mitokondriyel işlev bozuklukları tespit edilmiştir.⁽⁵⁴⁾ Buna ek olarak, ALS hastalarında mitokondri DNA'sı (mtDNA) ve mtDNA tarafından kodlanan *Sitokrom C Oksidaz Alt Ünitesi-1 (COX1)* enziminin geni üzerinde mutasyonlar bildirilmiştir.^(55,56) Mitokondri işlev bozukluğunun ayrıca mitokondride görevli *Manganez Süperoksit Dismutaz (SOD2)* enziminin düzeyindeki azalmalar sonucu olabileceği de düşünülmüştür. Bazı SALS hastalarında, bu mitokondriyel enzimin nükleer genom tarafından kodlanan geninde mutasyonlar da bildirilmiş olmasına rağmen, son araştırmalar ALS patogenezi ile SOD2 arasında ilişki bulunmadığı yönündedir.^(57,58,59,60)

Yatkınlık genleri (Genetik risk faktörleri)

• ApoE (Apolipoprotein E):

ApoE alellerinin (ε2, ε3, ε4) ALS popülasyonundaki dağılımını inceleyen birçok çalışma olmasına rağmen, sonuçlar çelişkilidir. Bazı araştırmacılar bulbar başlangıçlı ALS hastalarında ε4 alelinin daha fazla bulunduğunu göstermişlerdir. Buna karşın, başka gruplar ApoE alellerinin hastalığın başlangıç yaşı, başlangıç bölgesi, veya süresi üzerinde bir etkisini bulamamışlardır. Bugün ApoE'nin ALS patogenezindeki rolünün ancak sınırlı olduğu düşünülmektedir.^(61,62,63)

• APEX (Apürinik apirimidinik endonükleaz):

DNA tamir enzimlerinden *Apürinik Apirimidinik Endonükleaz (APEX endonükleaz)* düzeyinin, ALS'li hastaların frontal

korteksinde azalmış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, APEX endonükleazın ALS için bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir. ALS'de, APEX enzim miktarının ve aktivitesinin azalmasına yol açan APEX geni mutasyonları bildiren çalışmalar mevcuttur. Her ne kadar APEX mutasyonları ALS'nin büyük bir kısmı için geçerli olmasa da, DNA hasarının ALS etiolojisindeki rolü önemli olabilir.^(64,65)

• **CYP2D6 (Sitokrom P450 debrisokin hidroksilaz):**

Sitokrom P450 Debrisokin Hidroksilaz (CYP2D6) genindeki polimorfizmler, eksojen toksinlerin metabolize edilmesindeki aksaklıklardan sorumlu tutulmaktadır. Bazı araştırma sonuçları, CYP2D6 "b alelini" ALS için bir risk faktörü olarak işaret etmektedir.⁽⁶⁶⁾

• **CNTF (Siliar Nörotrofik Faktör):**

Spinal motor nöronlarda önemli bir nörotrofik faktör (*survival factor*) olan CNTF'nin azalmasının ALS oluşumuna katkısı olabileceği düşünülmektedir. Bunu kanıtlar nitelikte araştırma sonuçları mevcuttur. ALS hastalarının kortikospinal nöronlarındaki CNTF düzeyinde azalma tespit edilmiştir.⁽⁶⁷⁾ Ayrıca *knock-out* farelerde CNTF geninin ekspresyonunun ortadan kaldırılmasının ilerleyici motor nöron dejenerasyonuna yol açtığı görülmüştür.⁽⁶⁸⁾ SALS olgularında da CNTF'i ortadan kaldıran homozigot bir mutasyonun sıklığının az da olsa arttığı belirlenmiştir.⁽⁶⁹⁾

• **SMN Proteini (Survival Motor Nöron):**

Survival Motor Neuron (SMN) geninin ürünü de ALS'deki motor nöron dejenerasyonunda rol oynadığı düşünülen önemli adaylardan biridir. Bazı araştırmacılar, hızla ilerleyen aşağı motor nöron sendromuna sahip birtakım hastalarda, SMN geninin sentromerik tipinin (SMN2) delesyonlarının çok yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. SALS hastalarında da SMN2 delesyonlarının sık olduğu gösterilmiştir. Bu delesyonların yatkınlık nedeni olabileceği düşünülmektedir. SMN2 geninin ekspresyonunu arttırmanın, motor nöron hastalıkları için bir tedavi stratejisi olması olasıdır.^(70,71)

• **LIF (Lösemi İnhibitör Faktörü):**

Motor nöronlarda *in vitro* ve *in vivo* olarak etki eden güçlü bir başka nörotrofik faktör de (*survival factor*) LIF'tir. LIF geninden yoksun transgenik farelerde motor nöron dejenerasyonu gelişmemekle birlikte, LIF geni mutasyonu başka bir genetik defektle (CNTF geninin inaktivasyonu gibi) beraber görüldüğünde, motor nöron hastalığı ortaya çıkar. Bu durum, diğer genetik yatkınlık faktörleri ile birlikte

olduğunda LIF'in, motor nöron hastalığına neden olan modifiye edici bir gen olarak davranabileceğini göstermektedir. Yapılan bir araştırmada da, ALS hastalarının LIF geninde kontrollerde bulunmayan bir nokta mutasyonu (Val64Met) tanımlanmıştır.⁽⁷²⁾ LIF mutasyonlarının ALS patogenezindeki etkisini netleştirecek çalışmalar yapılmaktadır.

• **PSEN-1 (Presenilin-1):**

ALS patogenezinin araştırılmasında incelenen bir diğer gen Presenilin-1 (PSEN-1) genidir. Alzheimer Hastalığının bazı tiplerinde rol oynayan bir transmembran proteini olan Presenilin-1'in apoptozda işlevi olduğu öne sürülmüştür. PSEN-1 intron8 polimorfizmini ALS hastaları ve sağlıklı kontrollerde inceleyen araştırmacılar, özellikle bir alelin (alel2) homozigot olma durumunda ALS geliştirme riskini arttırdığını bulmuşlardır. PSEN-1 (alel2) geninin ALS patogeneziyle olan muhtemel ilgisini kesinleştirmek için farklı toplumlarda çalışmalar yapılmaktadır.⁽⁷³⁾

• **VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü):**

Yakın zamanda dikkat çeken aday risk faktörlerinden biri VEGF genidir. VEGF geninin promotor bölgesindeki *Hypoxia-response element'i knock-out* edilmiş farelerde (Vegfa^{Δ/a}), azalmış VEGF ekspresyonuna bağlı olarak ALS'ye benzer motor nöron dejenerasyonu ortaya çıktığı gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan araştırmalarda da VEGF geninin promotor bölgesinde, bazı haplotipler için ("-2578A/-1154A/-634G" ve "-2578A/-1154G/-634G") homozigot olan bireylerin 1.8 kat daha fazla ALS riski taşıdıkları bulunmuştur. Ayrıca, ALS hastalarında ve söz konusu riskli genotipe (AAG/AAG veya AGG/AGG) sahip sağlıklı bireylerde, VEGF plazma düzeylerinin önemli ölçüde düştüğü görülmüştür. Bunlar ve benzeri birçok çalışma göstermektedir ki, VEGF yalnızca anjiyogenik bir faktör değil, insanlarda ve farelerde motor nöron dejenerasyonunda rol oynayan önemli bir etkendir (*modifier gene*). Bu bulgu, VEGF'nin ALS'de tedavi edici bir potansiyeli olabileceğini de desteklemektedir.^(74,75)

• **HFE (Hemokromatoz):**

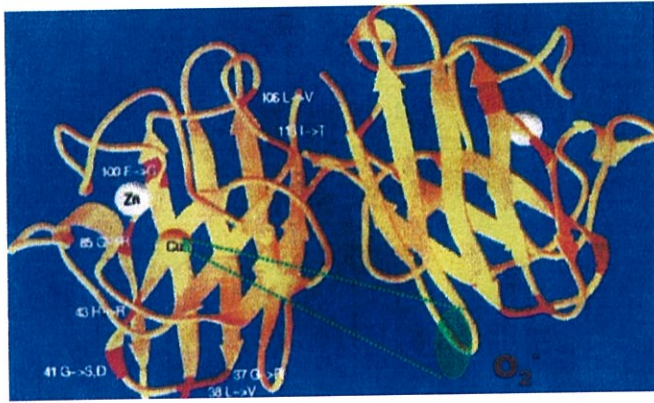
SOD1 genindeki mutasyonlar, oksidatif stresin ALS patogenezinde rol oynadığını öne süren teorileri gündeme getirmiştir. Oksidatif stresin temel nedenlerinden biri, hücre-içi demir homeostazındaki aksaklıklardır. Oksidatif stres ve hücre-içi demir kullanımındaki bozukluklar birçok nörodegeneratif hastalıkla ilgili bulunmuştur. Hfe geninde mutasyon oluşumu, hücrelerin demir düzeylerini düzgün bir şekilde kontrol edememelerine neden olan mekanizmalardan biridir. Hfe genindeki mutasyonların aşırı

demir yüküne, dolayısıyla hemakromatoz hastalığına yol açtığı bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan bir araştırma ise, Hfe mutasyonlarının (özellikle His63Asp) ALS hastalarında, sağlıklı bireylere göre daha yüksek oranda bulunduğunu ortaya koymuştur. Hfe mutasyonlarının hücredeki etkilerini belirlemek amacıyla, insan nöronal hücre suşları Hfe mutasyonu taşıyan genlerle transfekte edilmiştir. Sonuçlar, Hfe mutasyonunun, tubulin, aktin (ALS'de görülen aksonal transport bozukluğu) ve SOD1 ekspresyonunu azalttığı yönündedir. Bu bulgular, Hfe mutasyonlarının ALS oluşumuna katkıda bulunduğuna ve ALS için önemli bir risk faktörü oluşturduğuna dair önemli göstergelerdir.⁽⁷⁶⁾

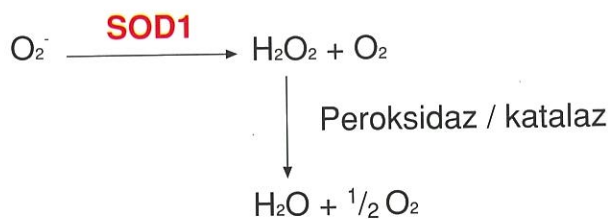
SOD1 GENİ VE SOD1 PROTEİNİ

Ailesel ALS ve Sporadik ALS klinik ve patolojik özellikleri açısından benzerlik gösterdiği için, ALS patogeneziye yönelik çalışmalar, hastalıkta çok önemli bir rol oynadığı bilinen SOD1 proteini ve patolojisi üzerine yoğunlaşmıştır.

Süperoksit Dismutaz1 (SOD1), beş eksonun kodladığı 153 aminoasitten oluşan ve 16 kDa ağırlığında küçük bir enzimdir.^(6,77) SOD1, iki eş altbirimden oluşan bir homodimerdir; dimerler arası hidrofobik bağlar bu yapıyı sağlamlaştırır (Resim 2). Oyuk şeklindeki enzim aktif



Resim 2. SOD1 proteini ve hipotetik kanal yapısı: O_2^- , Lys122, Lys136 ve Arg143 tarafından oluşturulan pozitif yüklü hipotetik kanal vasıtasıyla Cu^{+2} 'nin bulunduğu aktif bölgeye yönlendirilir. Ekson3 ve ekson5 tarafından kodlanan 21 aminoasit de bu kanal yapısına katkıda bulunur. Kanal, kademeli olarak 24A'dan 10A'a doğru daralır; bu şekilde, aktif bölgenin bulunduğu dar alana optimal bir ulaşım sağlanır.



Resim 3. SOD1 proteininin dismutaz aktivitesi.

Tablo 4. Sık görülen ALS mutasyonları ve özellikleri

Mutasyon	Özellik
Ala4Val	En sık rastlanan mutasyon Hızlı başlangıç ve ilerleme (1 yıl) Genelde sadece aşağı motor nöron belirtileri mtSOD1 proteininin yapısı normal SOD1'den daha az stabil Motor nöronlarda intrasitoplazmik hiyalin inklüzyonları
His46Arg	SOD1'in Cu bağlama bölgesinde Geç başlangıç ve yavaş ilerleme (17 yıl) Başlama noktası alt ekstremitelerde Bulbar başlangıç nadir
Leu84Val	Yalnız aşağı motor nöron etkilenimi Hızlı ilerleme (1.5 yıl) Erkeklerde daha erken başlangıç ??
Asp90Ala	Başlangıç 20-90 yaş; alt ekstremitelerde Erken fazda: bacak krampları, miyalji, ağrılı parestezi Mesanede işlev bozukluğu (Homozigot Asp90Ala mutasyonunda) İlerleme: yavaş, alt ekstremitelerde → üst ekstremitelerde Dominant/heterozigot: tipik ALS seyri Resesif/homozigot: yavaş ilerleme (İskandinav ırkında %2.5 sağlıklı taşıyıcı)
Ile104Phe	Aile-içi değişiklik gösteren klinik özellikler Başlangıç ekstremitelerde Bulbar belirtiler: 2-14 yıl sonra
Ile113Thr	Sporadik ALS olgularında ?? Oldukça sık Geç başlangıç: ~59 yaş Hızlı ilerleme Motor nöronlarda intrasitoplazmik hiyalin inklüzyonları
Glu100Gly	ALS-Demens tipi Dentate granül inklüzyonları ve frontal lobta gliyoz
Leu126delTT	TT delesyonu Hızlı ilerleme

bölgelerinde bulunan Cu^{+2} 'nin enzimatik, Zn^{+2} 'nin yapısal işlevleri vardır. Süperoksit radikali (O_2^-) hipotetik bir kanal vasıtasıyla enzimin aktif bölgesine yönlendirilir. SOD1 enziminin en belirgin işlevi, hücre için ölümcül olan süperoksit molekülünü, O_2 ve H_2O_2 'ye katalizlemektir. Daha sonra H_2O_2 'den peroksidaz enzimi ile H_2O elde edilir (Resim 3).

Bugüne kadar SOD1 geninde, çoğunluğu ekson4 ve ekson5 üzerinde yoğunlaşan, 100'e yakın mutasyon tanımlanmıştır (Tablo 4). Mutasyonların hepsi nokta mutasyonu sınıfına giren yanlış anlamlı (*missense*) mutasyonlar ve küçük delesyon/insersiyonlardır.⁽⁷⁸⁾ Bunların penetransı yaşa bağımlıdır: genelde, ALS mutasyonu taşıyıcılarının %90'ının ≤ 70 yaşında etkilendiği söylenebilir. Bazı mutasyonlar erken başlangıçlı hastalığa neden olur (Leu38Val, Gly37Ser); bazıları ise ya çok hızlı (Ala4Val), ya da oldukça yavaş

ilerleyen (Asp100Gly) ALS ile ilişkilendirilir. İlginç olan, değişik mutasyon grupları arasında belirgin fenotipik farklılıklar gözlenmemesidir.⁽⁷⁹⁾ FALS olgularında en sık rastlanan mutasyon, Ala4Val mutasyonudur.⁽⁷⁷⁾ (Resim 4).

SOD1 genindeki tüm mutasyonlar otozomal dominant geçiş gösterir. Asp90Ala mutasyonunun bu açıdan ilginç bir özelliği vardır. Asp90Ala, hem dominant hem resesif bir mutasyon gibi davranır. Bu mutasyon, genelde diğer SOD1 mutasyonları gibi dominant geçiş gösterirken, İskandinav'da durum farklıdır; İsveç ve Finlandiya'da nüfusun %2.5'i Asp90Ala'yı heterozigot olarak taşır, ama ALS geliştirmez. Diğer taraftan, bu mutasyon basit bir polimorfizm de değildir, çünkü homozigot olarak kalıtıldığında bu toplumlarda da ALS gelişir. Ama İskandinav'daki Asp90Ala homozigot bireylerde ALS, İskandinav olmayan toplumlara oranla hem daha hafif ve yavaş bir seyir gösterir, hem de penetransı düşüktür.⁽⁸⁰⁾ Belçika, Fransa, Kuzey Amerika, İngiltere ve Avustralya'yı kapsayan geniş bir haplotip analizinde, Asp90Ala mutasyonunun 43 nesil öncesinde tek bir atadan geldiği ve göç yoluyla tüm dünyaya yayıldığı gösterilmiştir.⁽⁸¹⁾ Tüm toplumlardaki Asp90Ala mutasyonunun kökeni aynı olduğuna göre, bu mutasyonun yıkıcı etkilerinin İskandinav toplumuna özgü ek bir koruyucu faktörle (*cis-acting disease modifier*) kompanse edildiği düşünülmektedir.⁽⁷⁷⁾ Böyle bir koruyucu faktörün tanımlanması, hastalığa karşı etkin moleküler tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde büyük önem taşıyacaktır.⁽⁴³⁾

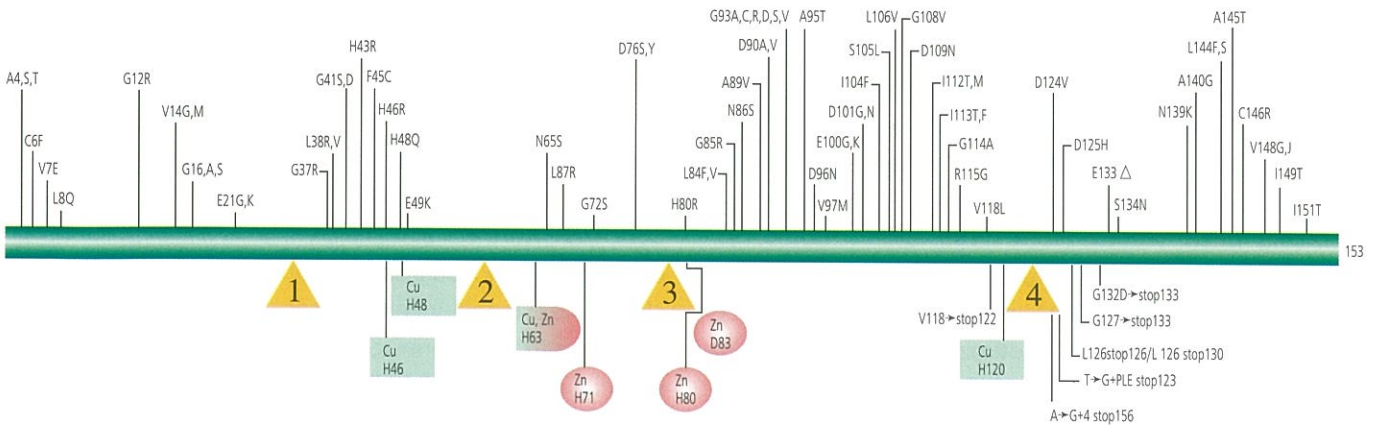
Sporadik ALS olgularında en sık gözlenen mutasyon Ile113Thr mutasyonudur. Bu mutasyon düşük penetrans gösterir ve çeşitli klinik fenotipleri vardır.

ALS PATOGENEZİNDE ETKİN OLABİLECEK OLASI MEKANİZMALAR

SOD1 geni üzerindeki mutasyonlar, yapısal kararsızlığa neden olmak suretiyle enzim aktivitesinde sağlıklı SOD1 genine oranla %30-70 azalmaya neden olur. Bu azalmaya, mutant ve intakt monomerler arasında rastgele meydana gelen dimerizasyonların neden olduğu düşünülmektedir. Enzim aktivitesini etkileyen diğer bir mekanizma da, mutant SOD1 proteininin yarı ömrünün kısalmasıdır. Yapısal kararsızlıktan kaynaklanan bu durumda, normalde 30 saat olan enzim yarı ömrü, Ala4Val mutasyonu taşıyan SOD1 proteini için 7 saat civarındadır.^(77,78)

Ancak, transgenik ve knock-out farelerde yapılan çalışmalar, FALS ve SALS'taki etkili mekanizmanın azalan dismutaz aktivitesi olmadığını göstermiştir: Ala4Val ve Gly85Arg mutasyonları SOD1 aktivitesinde azalmaya neden olurken, Gly37Arg veya Gly93Ala mutasyonu bulunan SOD1 proteininin aktivitesi azalmamaktadır.⁽⁸²⁾ Ayrıca, klinik fenotip ile SOD1 dismutaz aktivitesi arasında direkt bir bağlantı bulunamamıştır. SOD1 geni knock-out edilmiş farelerde ALS gözlenmezken, mutant SOD1 proteinini sentezleyen transgenik farelerde progresif motor nöron ölümü görülür. Benzer şekilde, normal yapıdaki SOD1 proteininin aşırı ekspresyonu fenotipte bir değişime neden olmazken, mutant SOD1 proteininin aşırı sentezi paralizle sonuçlanmaktadır.⁽⁸³⁾ Bu sonuçlar, mutant SOD1'e bağlı gelişen hastalık tablosunun, SOD1enzim aktivitesindeki kayıptan değil, kazanılan yeni ve toksik bir işlevden kaynaklandığını göstermektedir (*toxic gain-of-function*).

ALS'ye neden olduğu düşünülen olası moleküler süreçler beş ana grup altında incelenebilir:

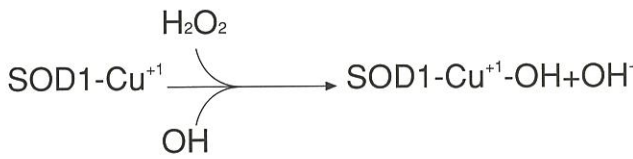


Resim 4. ALS'ye neden olan bazı SOD1 mutasyonlarının protein üzerindeki dağılımları. Aminoasit değişimleri/pozisyonları tek harfli semboller ile gösterilmiştir. Proteine Cu^{+2} bağlanması dört His ile (H46, H48, H63, H120), Zn^{+2} bağlanması üç His (H63, H71, H80) ve bir Asp (D83) ile koordine edilmektedir. Proteinin aktif bölgelerini hedef alan mutasyonlar, SOD1 proteininin yapısını bozarlar ve katalitik işlevini değiştirirler. Δ : SOD1 genindeki kodlayıcı ekson bölgelerinin bitiş noktalarını göstermektedir.⁽²⁾

1. Oksidatif Hasar

Oksidatif hasar, hücrenin aşırı miktarda reaktif oksijen ürünlerinin birikimi sonucu dejenere olmasıdır. ALS patogenezi açıklanmada oksidatif hasarla ilişkili iki hipotez vardır.

1.1. Peroksidaz Hipotezi: SOD1'in süperoksit dismutaz aktivitesinin yanı sıra, bir de peroksidaz aktivitesi vardır. Bu tepkimede, H_2O_2 substrat olarak kullanılır ve hidroksil radikali oluşur. Hidroksil radikalleri oldukça reaktif moleküllerdir. Belli koşullar altında, SOD1 peroksidaz aktivitesini kullanarak prooksidan olarak etki gösterebilir. Ancak, sağlıklı hücrede bu durum kontrol altındadır; kısa bir süre içinde, yeni üretilen hidroksil iyonları enzimin hem dismutaz, hem de peroksidaz aktivitesini durdurur^(84,85) (Resim 5).



Resim 5. SOD1'in peroksidaz aktivitesinin şematik gösterimi.

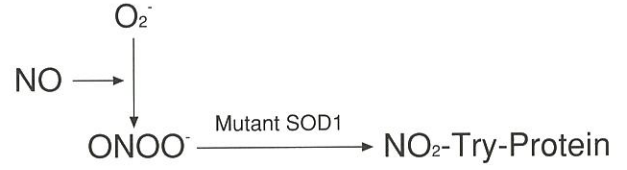
Birçok SOD1 mutasyonu artmış peroksidaz aktivitesine neden olur. Bu mutasyonlar, SOD1 geninin alt birimlerini bir arada tutan kritik bağlantı noktalarında konformasyon değişiklikleri oluşturur. Bu değişimler, Zn^{+2} 'nin bağlanma kapasitesini etkileyerek, proteinin yapısını destabilize eder. Sonuçta, aktif Cu^{+2} bölgesi H_2O_2 ile daha kolay etkileşebilir hale gelir. Bu da, hidroksil radikallerinin sayıca artmasına neden olur. DNA, protein ve lipid membran için zararlı olan bu radikallerin varlığı ise, SALS ve FALS hastalarının sinir dokusunda gözlenen oksidatif hasarı açıklar.⁽⁸⁶⁾

1.2. Peroksinitrat Hipotezi: Oksidatif strese bağlı motor nöron ölümlerine ilişkin diğer bir hipotez de peroksinitrat hipotezidir. Bazı SOD1 mutasyonları Cu^{+2} 'nin aktif bölgeye gevşek bağlanmasına neden olur.⁽⁸⁷⁾ Bu durumda, süperoksit molekülü nitrik oksitle (NO) daha kolay etkileşerek peroksinitriti (ONOO-) oluşturur. Bir sonraki aşamada, peroksinitritin mutant SOD1 enzimi tarafından katalize edilmesi sonucu, hücre içi 3-nitrotirozin miktarı artar (Resim 6, Resim 7).⁽⁸⁸⁾

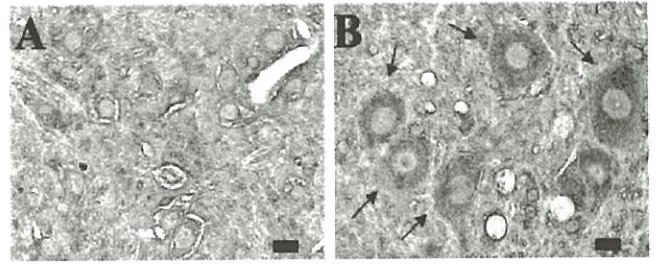
2. Glutamat Eksitotoksitesisi

ALS ve nörodejenerasyon patogeneziinde rol oynadığı düşünülen diğer bir faktör de glutamat eksitotoksitesisidir.

Glutamat, merkezi sinir sistemindeki en önemli eksitator nörotransmitterlerden biridir.⁽⁸⁹⁾ Presinaptik nörondan



Resim 6. SOD1 enziminin peroksinitrat aktivitesinin şematik gösterimi.

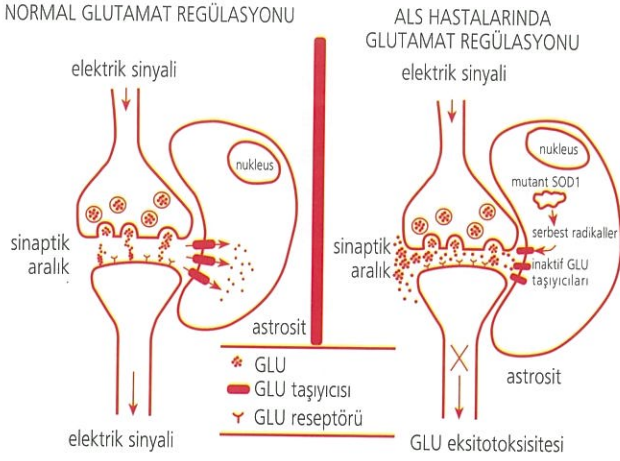


Resim 7. A. sağlıklı, B. SOD1^{Gly93Ala} mutant farelerinin omurilik kesitlerinin immünokimyasal analizi. SOD1^{Gly93Ala} transgenik farelerinin omurilik kesitleri üzerinde yapılan immünokimyasal analizler, hızla biriken 3-nitrotirozin oluşumlarının hücreyi apoptoza götürdüğünü göstermiştir.

salınımını, postsinaptik membran üzerindeki reseptörlere bağlanması izler. Bağlanma sonrası açılan iyon kanalları hücre içine Na^+ ve H_2O girişini sağlar. Membran depolarizasyonu, bir sonraki aşamada Na^+-Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu sonucunda, hücre içi Ca^{+2} alınımı ve postsinaptik nöronun eksitasyonu ile sonuçlanır (Resim 8).⁽⁹⁾

Glutamatın postsinaptik nöron üzerindeki etkisi başlıca iki mekanizma ile kontrol edilir: reseptör inaktivasyonu ve glutamatın sinaptik aralıktan Eksitator Aminoasit Taşıyıcıları (EAATs) tarafından uzaklaştırılması.⁽⁹⁾

Glutamat taşıyıcıları beş ana gruba ayrılır (EAAT1-5). Yapılan çalışmalarda, çoğu SALS hastalarında ALS'nin özellikle etkilediği motor korteks ve omurilik bölgelerindeki EAAT2 protein seviyelerinde %35-95 oranında azalma gözlenmiştir.⁽⁸⁾ İlginç olan, Northern Blot analizleri, EAAT2 RNA'sının normal düzeylerde ve boyutlarda olduğunu göstermiştir.⁽⁹⁰⁾ Ancak, cDNA düzeyindeki incelemelerde, ekson kaybı ve ekson-intron kriptik bölgelerini içeren anormal transkriptler tespit edilmiştir. Bu da, EAAT2 proteinindeki selektif kaybın, beyin belli bölgelerinde EAAT2 premRNA'sının kırılmasındaki hatadan kaynaklandığını gösterir.⁽⁹¹⁾ Sinaptik aralıktaki hücrelerde bulunan EAAT2 taşıyıcı protein miktarının azalması, görevini tamamlamış veya herhangi

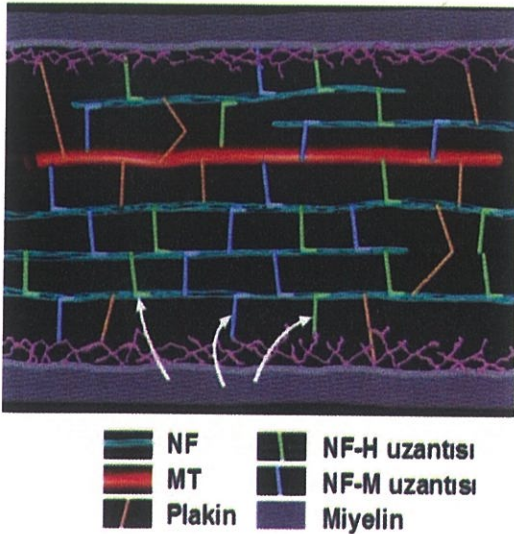


Resim 8. Sağlıklı hücrede ve ALS olgularında glutamat salınım mekanizması.

bir sebeple aşırı miktarda salınmış glutamatın sinaptik aralıktan uzaklaştırılamaması ile sonuçlanır. Biriken glutamatın motor nöronu sürekli uyarması, hücre içi Ca^{+2} birikimi, ve dolayısıyla uzun süreli eksitasyon sonucu motor nöron ölümüne neden olur.⁽⁹⁾

3. Nörofilament Oluşumları

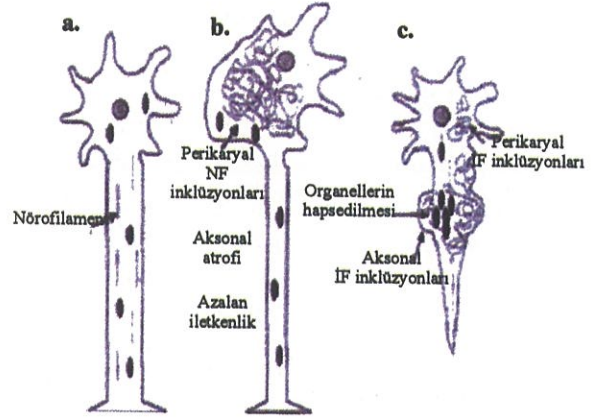
SALS ve FALS olgularında gözlenen diğer bir önemli patolojik bulgu da motor nöronlardaki nörofilament birikimleridir. Nörofilamentler, nöron iskeletinin ana yapısını oluştururlar ve NF-H (115 kD), NF-M (90 kD) ve NF-L (61 kD) olarak üç ana gruba ayrılırlar (Resim 9).⁽⁹²⁾



Resim 9. Nörofilamente-bağımlı akson büyümesinin radyal modeli. Aksonda, aksoplazmın değişik komponentleri çapraz bağlar ile kuvvetlendirilmiş üç boyutlu bir yapı halindedirler. NF'nin ana oluşumu, NF-L'dir. NF-M ve NF-H'nin uzantıları NF'den radyal ekseninde yayılarak, komşu nörofilament, mikrotübül (MT) ve kortikal aktin filamentleri (KAF) ile ek bağlar kuran kollar oluştururlar. NF, MT ve KAF aynı zamanda plaklin ailesine dahil proteinlerle de bağlar oluştururlar.⁽⁹³⁾

In situ hibridizasyon çalışmalarında ALS hastalarının NF-L mRNA seviyelerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu durumda, NF-M ve NF-H alt birimleri normal nörofilament yapısını oluşturamazlar, disorganize filamentler hücre gövdesi ve proksimal aksonlarda birikir. Saç yumağını andıran bu oluşum, gerek hücredeki organelleri hapsedmek, gerekse aksonal transportu engellemek suretiyle motor nöronların ölümüne neden olur (Resim 10).

NF-H, NF-M ve NF-L knock-out fareler klinik fenotip ve gelişim açısından normal olmakla birlikte, herhangi bir nörofilamentin aşırı ekspresyonunu barındıran farelerde



Resim 10. Nörofilament yapılarının a. normal motor protein, b. NF-H'nin aşırı ekspresyonu ve c. mutant NF-L varlığında oluşumu ve etkileri.⁽⁹⁾

perikaryal nörofilament inklüzyonları, aksonal atrofi ve azalan iletkenlik gözlenir.⁽⁴⁵⁾ Diğer yandan, NF-L knock-out farelerde, NF-H'nin aşırı ekspresyonun yaşam süresini %65 oranında arttırdığı görülmüştür; perikaryal inklüzyonlar halen mevcuttur fakat hücre tarafından kolaylıkla tolere edilirler, hatta koruyucu etki yaratırlar.⁽⁴⁸⁾ Bu durum iki şekilde açıklanabilir: birinci hipoteze göre nörofilamentler Ca^{+2} kompleksleyici olarak görev yaparlar; nörofilamentlerde birçok Ca^{+2} bağlama bölgeleri bulunmaktadır. Örneğin glutamat eksitotoksitesisi sonucu hücre içinde biriken aşırı miktardaki Ca^{+2} 'yi bağlayarak motor nöronları korurlar.⁽⁸⁾ İkinci hipotez ise, nörofilamentlerin reaktif oksijen türevleri için bir gider oluşturarak, bu toksik maddelerin yıkıcı etkilerini ortadan kaldırmak suretiyle motor nöronları koruduğunu kabul eder.⁽⁹⁴⁾

4. Protein Agregatları

ALS patogenezinde önemli olabileceği düşünülen diğer bir neden de protein agregatlarıdır. Birçok nörodejeneratif hastalık için de tipik olan bu yapılar, daha hastalığın klinik bulguları ortaya çıkmadan oluşmaya başlar, hastalığın

gelişimi süresince miktarları hızla artar ve sonunda hücre ölümüne neden olurlar.

Protein agregatlarının neden olduğu toksik etki ise iki hipotez ile açıklanmaktadır: protein agregatları aksonal transport yoluyla motor nörona ulaştırılması gereken maddelerin (büyüme faktörleri, v.s.) hücreye ulaşmasını engellerler.⁽⁹⁾ İkinci olası etkileri ise motor nöronların normal işlevi için gerekli olan hücre içi moleküllerin bu agregatlarla birlikte presipite olarak ortamdan çekilmeleridir. Nitekim, in vitro hücre modellerinde, stres koşullarında aktive olan şaperon protein HSP70'in miktarı arttırıldığında, protein agregat oluşumlarında azalma gözlenmiştir.⁽⁹⁾

5. Mitokondri Hasarı

ALS'de gözlenen motor nöron ölümleri, mitokondrideki enerji üretim kapasitesindeki azalma ile de ilişkilendirilmiştir. Mitokondri, hücrenin enerji kaynağıdır. Motor nöronlar aksiyon potansiyeli oluşturabilmek için sürekli enerjiye, yani ATP'ye, ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla, enerji mekanizmasında meydana gelebilecek herhangi bir değişimden en çok etkilenen hücre gruplarından biri motor nöronlardır.^(59, 60)

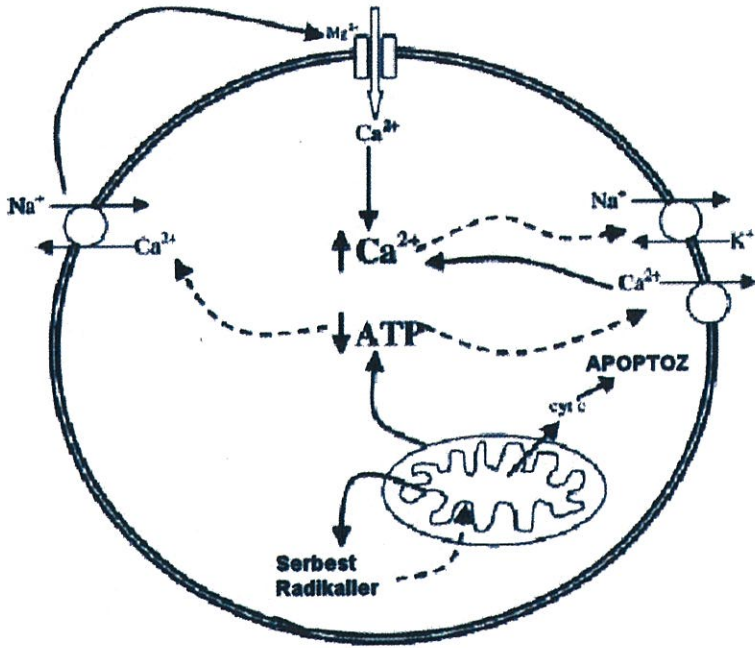
Mitokondrinin ALS patogenezindeki rolü, organelde meydana gelen morfolojik ve işlevsel değişimlerle açıklanabilir.⁽⁵⁵⁾ Öngörülen hipoteze göre, organelin enerji

üretim kapasitesindeki azalma motor nöronların glutamata duyarlılığını arttırır ve belli bir seviyeden sonra glutamat eksitotoksik etki yaratmaya başlar (Resim 11). Hızla azalan ATP düzeyi, ATP'ye bağımlı çalışan iyon kanallarının efektif çalışmasını engelleyeceği için hücre membran potansiyelini koruyamaz hale gelir. Depolarizasyon sonucu aşırı miktardaki glutamatın NMDA reseptörlerini aktive etmesi, hücre içine Na^+ ve Ca^{2+} girişine neden olur. Bu iyon akışının birkaç önemli sonucu vardır: Öncelikle, hücre membranı daha da depolarize olur. Diğer taraftan, fazla miktardaki Ca^{2+} hücrede toksik etki yaratacağı için tekrar dışarı atılmalıdır; ancak, Na^+ 'un hücre içine girişi, Na^+ - Ca^{2+} kanallarını etkisiz hale getirir. Dolayısıyla, Ca^{2+} sadece ATP'ye bağımlı taşıyıcılar tarafından hücre dışına atılabilir ki, bu da azalan ATP miktarını daha da azaltacaktır.⁽⁶⁰⁾ Artan Ca^{2+} ile birlikte, serbest radikal oluşumu hızlanır, proteazlar ve endonükleazlar aktive olur ve motor nöron ölümü kaçınılmaz hale gelir.

6. Diğer Olası Faktörler

a. Çevresel Faktörler: ALS patogenezinde ağır metallerin (alüminyum, civa) önemli olabileceği anlaşılmıştır. Güney Pasifik'teki Guam adasında yaşayan Chomorr toplumunun *cycad* bitkisine dayalı beslenme alışkanlığı, o yörede PD-ALS insidansının çok yüksek olmasıyla dikkat çekmiştir. Beslenme alışkanlıklarının değiştirilmesiyle hastalık insidansının azalması genetik etkiden ziyade etkin çevresel ve beslenme özelliklerine dikkat çekmektedir.⁽⁹⁵⁾

b. Otoimmünite: ALS hastalarının omuriliklerinde aktive olmuş mikroglia ve T hücreleri ile beraber motor nöronlara karşı antikor oluşumu görülmüştür. Benzer şekilde, sporadik ALS hastalarında voltaj-kapılı Ca^{2+} kanallarına karşı gelişen antikorlar, kanal aktivitesini etkileyerek hücre-içi Ca^{2+} girişini arttırır. Ancak, ALS hastaları üzerinde yapılan immünoterapi çalışmalarında başarı sağlanamamıştır.⁽¹⁸⁾ Viral Enfeksiyonlar: Kronik viral enfeksiyonlar, özellikle sporadik ALS olgularının etiolojisinde önemli olduğu düşünülen bir faktördür.⁽³⁾ Bazı ALS hastalarının omuriliklerinde enterovirus RNA'sına rastlanmıştır fakat bu bulgular daha sonra doğrulanmamıştır. Yakın zamanda, çok duyarlı bir teknikle ALS hastalarının omuriliklerinde sağlıklı bireylere oranla yüksek miktarlarda enterovirus RNA'sı olduğu tespit edilmiştir (%88'e karşı %3). Ancak, viral enfeksiyonların, ALS



Resim 11. Glutamat eksitotoksitesinde mitokondrinin rolü. Kalın oklar aktivasyon etkisini, kesik oklar inhibisyon etkisini gösterir.⁽⁶⁰⁾

patogenezinde önemini göstermek için daha ileri düzeyde çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antero-latéraux de la moelle épinière. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.* 1869;2:744-754
2. Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering Selective Motor neuron Death in ALS. *Nature* 2001;2:806-819
3. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 2001;344(22):1688-1700
4. Milonas I. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Introduction. *Journal of Neurology* 1998;245(suppl 2):S1-S3
5. Belsh JM. ALS Diagnostic Criteria of El Escorial Revisited: Do They Meet The Needs of Clinicians as Well as Researchers? *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 2000;Suppl 1:57-60
6. Cleveland DW. From Charcot to SOD1: Mechanisms of Selective Motor Neuron Death in ALS. *Neuron* 1999;24:515-520
7. Bendotti C, Carri MT. Lessons from Models of SOD1-Linked Familial ALS. *Trends in Molecular Medicine* 2004;10(8):393-400
8. Cluskey S, Ramsden DB. Mechanisms of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Pathology* 2001;54:386-392
9. Julien JP. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Unfolding the Toxicity of the Misfolded. *Cell* 2001;104:581-591
10. Howard RS, Orrell RW. Management of Motor Neurone Disease. *Postgraduate Medical Journal* 2002;78:736-741
11. Tan E. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Actual Medicine* 2001;May:66-69
12. Morrison BM, Shu IW, Wilcox AL, Gordon JW, Morrison JH. Early and Selective Pathology of Light Chain Neurofilament in the Spinal Cord and Sciatic Nerve of G86R Mutant Superoxide Dismutase Transgenic Mice. *Experimental Neurology* 2000;165(2):207-220
13. Kong J, Xu Z. Massive Mitochondrial Degeneration in Motor Neurons Triggers the Onset of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice Expressing a Mutant SOD1. *The Journal of Neuroscience* 1998;18(9):3241-3250
14. Stieber A, Gonatas JO, Collard J, Meier J, Julien J, Schweitzer P, Gonatas NK. The Neuronal Golgi Apparatus is Fragmented in Transgenic Mice Expressing a Mutant Human SOD1, but not in Mice Expressing the Human NF-H Gene. *Journal of the Neurological Sciences* 2000;173(1):63-72
15. Valentine JS. Do Oxidatively Modified Protein Cause ALS?. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;33:1314-1320
16. Brown RH. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Recent Insights from Genetics and Transgenic Mice. *Cell* 1995;80:687-692
17. Veldink JH, Bar PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH. Sexual Differences in Onset of Disease and Response to Exercise in a Transgenic Model of ALS. *Neuromuscular Disorders* 2003;13(9):737-743
18. Hand CK, Rouleau GA. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Muscle and Nerve* 2002;25(2):135-159
19. Siddique T, Pericak-Vance MA, Brooks BR, Roos RP, Hung WY, Antel JP, Munsat TL, Phillips K, Warner K, Speer M, Bias WB, Siddique NA, Roses AD. Linkage Analysis in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology* 1989;39:919-925
20. Siddique T, Figlewicz DA, Pericak-Vance MA, Haines JL, Rouleau G, Jeffers AJ, Sapp P, Hung WY, Bebout J, McKenna-Yasek D, Deng G, Horvitz HR, Gusella JF, Brown RH, Roses AD, Roos RP, Williams DB, Mulder DW, Watkins PC, Noore FR, Nicholson G, Reed R, Brooks BR, Festoff B, Antel JP, Munsat TL, Laing NG, Halperin JJ, Norris FH, Van Den Bergh R, Swerts L, Tanzi RE, Jubelt B, Matthews KD, Bosch EP. Linkage of a Gene Causing Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis to Chromosome 21 and Evidence of Genetic-Locus Heterogeneity. *The New England Journal of Medicine* 1991;324:1381-1384.
21. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH Jr. Mutations in Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62
22. Hand CK, Khoris J, Salachas F, Gros-Louis F, Simoes Lopes AA, Mayeux-Portas V, Brewer CG, Brown RH Jr, Meining V, Camu W, Rouleau GA. A Novel Locus for Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, on Chromosome 18q. *American Journal of Human Genetics* 2002;70:251-256.
23. Chance PF, Rabin BA, Ryan SG, Ding Y, Scavina M, Crain B, Griffin JW, Cornblath DR. Linkage of the Gene for an Autosomal Dominant Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis to Chromosome 9q34. *American Journal of Human Genetics* 1998;62:633-640
24. Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin BA, Nicholson GA, Auer-Grumbach M, Wagner K, De Jonghe P, Griffin JW, Fischbeck KH, Timmerman V, Cornblath DR, Chance PF. DNA/RNA Helicase Gene Mutations in a Form of Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS4). *American Journal of Human Genetics* 2004;74:1128-1135
25. Abalkhail H, Mitchell J, Habgood J, Orrell R, de Belleruche J. A New Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Locus on Chromosome 16q12.1-16q12.2. *American Journal of Human Genetics* 2003;73:383-389
26. Ruddy DM, Parton MJ, Al-Chalabi A, Lewis CM, Vance C, Smith BN, Leigh PN, Powell JF, Siddique T, Meyjes EP, Baas F, De Jong V, Shaw CE. Two Families with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis are Linked to a Novel Locus on Chromosome 16q. *American Journal of Human Genetics* 2003;73:390-396
27. Sapp PC, Hosler BA, McKenna-Yasek D, Chin W, Gann A, Genise H, Gorenstein J, Huang M, Sailer W, Scheffler M, Valesky M, Haines JL, Pericak-Vance M, Siddique T, Horvitz HR, Brown RH Jr. Identification of Two Novel Loci for Dominantly Inherited Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Human Genetics* 2003;73:397-403
28. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA, Oliveira JRM, Vainzof M, Zatz M. A Novel Locus for Late Onset Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neurone Disease Variant at 20q13. *Journal of Medical Genetics* 2004;41:315-320
29. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JRM, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M. A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Human Genetics* 2004;75:822-831
30. Siddique T, Hong S-T, Brooks BR, Hung WY, Siddique NA, Rimmler J, Kaplan JP, Haines JL, Brown RH Jr, Pericak-Vance MA. X-Linked Dominant Locus for Late-Onset Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Human Genetics* 1998;63(4):A308
31. Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, Daube JR, Nance M, Fan C, Kaplan J, Hung W-Y, McKenna-Yasek D, Haines JL, Pericak-Vance MA, Horvitz HR, Brown RH Jr. Linkage of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with Frontotemporal Dementia to Chromosome 9q21-q22. *The Journal of the American Medical Association* 2000;284:1664-1669
32. Wilhelmsen KC, Lynch T, Pavlou E, Higgins M, Nygaard TG. Localization of Disinhibition-Dementia-Parkinsonism Amyotrophy Complex to 17q21-22. *American Journal of Human Genetics* 1994;55:1159-1165
33. Wilhelmsen KC, Forman MS, Rosen HJ, Alving LI, Goldman J, Feiger J, Lee JV, Segall SK, Kramer JH, Lomen-Hoerth C, Rankin KP, Johnson J, Feiler HS, Weiner MW, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Miller BL. 17q-linked Frontotemporal Dementia-Amyotrophic Lateral Sclerosis without Tau Mutations with Tau and Alpha-Synuclein Inclusions. *Archives of Neurology* 2004;61:398-406
34. Motor Neuron Disease. Editör Ralph W Kuncel; WB Saunders 2002:75-95
35. Tsuchiya K, Shintani S, Nakabayashi H, Kikugawa K, Nakano R, Haga C,

- Nakano I, Ikeda K, Tsuji S. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with Onset in Bulbar Sign, Benign Clinical Course, and Bunina Bodies: A Clinical, Genetic, and Pathological Study of a Japanese Family. *Acta Neuropathologica* 2000;100:603-607
36. Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL. Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with Homozygosity for an Asp90A1a Mutation in CuZn-Superoxide Dismutase. *Nature Genetics* 1995;10:61-66
 37. Andersen PM, Forsgren L, Binzer M, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keranen ML, Bergmark L, Saarinen A, Haltia T, Tarvainen I, Kinnunen E, Udd B, Marklund SL. Autosomal Recessive Adult-Onset Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with Homozygosity for Asp90Ala CuZn-Superoxide Dismutase Mutations. A Clinical and Genealogical Study of 36 Patients. *Brain* 1996;119:1153-1172
 38. Andersen PM, Nilsson P, Keranen ML, Forsgren L, Hagglund J, Karlsborg M, Ronnevi LO, Gredal O, Marklund SL. Phenotypic Heterogeneity in Motor Neuron Disease Patients with CuZn-Superoxide Dismutase Mutations in Scandinavia. *Brain* 1997;120:1723-1737
 39. Robberecht W, Aguirre T, Van den Bosch L, Tilkin P, Cassiman JJ, Matthijs G. D90A Heterozygosity in the SOD1 Gene is Associated with Familial and Apparently Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology* 1996;47:1336-1339
 40. Yang Y, Hentati A, Deng H-X, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung W-Y, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. The Gene Encoding Alsin, a Protein with Three Guanine-Nucleotide Exchange Factor Domains, is Mutated in a Form of Recessive Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nature Genetics* 2001;29:160-165
 41. Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE. A Gene Encoding a Putative GTPase Regulator is Mutated in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis 2. *Nature Genetics* 2001;29:166-173
 42. Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, Nijhawan D, Ahmad A, Yang Y, Rimmer J, Hung W-Y, Schlotter B, Ahmed A, Ben Hamida M, Hentati F, Siddique T. Linkage of a Commoner Form of Recessive Amyotrophic Lateral Sclerosis to Chromosome 15q15-q22 Markers. *Neurogenetics* 1998;2:55-60
 43. Robberecht W. Genetic Markers of ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and other Motor Neuron Disorders* 2000;suppl 2:557-559
 44. Bredesen DE, Ellerby LM, Hart PJ, Wiedau-Pazos M, Valentine JS. Do posttranslational modifications of CuZnSOD lead to sporadic amyotrophic lateral sclerosis? *Annals of Neurology* 1997;42:135-137.
 45. Julien JP. Neurofilament Functions in Health and Disease. *Current Opinion in Neurobiology* 1999;9:554-560
 46. Majoor-Krakauer D, Willems PJ, Hofman A. Genetic Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clinical Genetics* 2003;63:83-101
 47. Corbo M, Hays AP. Peripherin and Neurofilament Protein Coexist in Spinal Spheroids of Motor Neuron Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1992;51:531-537
 48. Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. Late Onset Death of Motor Neurons in Mice Overexpressing Wild-Type Peripherin. *The Journal of Cell Biology* 1999;147:531-544
 49. Gros-Louis F, Larivière R, Gowing G, Laurent S, Camu W, Bouchard JP, Meininger V, Rouleau GA, Julien JP. A Frameshift Deletion in Peripherin Gene Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279:45951-45956
 50. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. Abnormal Excitatory Amino Acid Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology* 1990;28:18-25
 51. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased Glutamate Transport by the Brain and Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 1992;326:1464-1468
 52. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S. Glutamate Receptors: RNA Editing and Death of Motor Neurons. *Nature* 2004;427:801
 53. Lipton SA. Sporadic ALS: Blame it on the Editor. *Nature Medicine* 2004;10:347
 54. Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS. Impairment of Mitochondrial Function in Skeletal Muscle of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 1998;156:65-72
 55. Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze HJ, Elger CE, Schubert W, Kunz WS. Mitochondrial DNA Abnormalities in Skeletal Muscle of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain* 2000;123:1339-1348
 56. Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman JW, Scarlato G. Cytochrome-C Oxidase Subunit-I Microdeletion in a Patient with Motor Neuron Disease. *Annals of Neurology* 1998;43:110-116
 57. Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Beckman G, Beckman L, Andersen PM. Manganese-Containing Superoxide Dismutase Signal Sequence Polymorphism Associated with Sporadic Motor Neuron Disease. *European Journal of Neurology* 1999;6:639-644
 58. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Proposed Mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:9010-9014
 59. Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowler ZM, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ. Mitochondrial Dysfunction in a Cell Culture Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain* 2002;125:1522-1533
 60. Menzies FM, Ince PG, Shaw PJ. Mitochondrial Involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurochemistry International* 2002;40:543-551
 61. Al-Chalabi A, Enayat ZE, Bakker MC, Sham PC, Ball DM, Shaw CE, Lloyd CM, Powell JF, Leigh PN. Association of Apolipoprotein E Epsilon 4 Allele with Bulbar-Onset Motor Neuron Disease. *Lancet* 1996;20:159-160
 62. Drory VE, Birnbaum M, Korczyn AD, Chapman J. Association of APOE Epsilon4 Allele with Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2001;190:17-20
 63. Lacomblez L, Doppler V, Beucher I, Costes G, Salachas F, Rissonnier A, Le Forestier N, Pradat PF, Bruckert E, Meininger V. APOE: A Potential Marker of Disease Progression in ALS. *Neurology* 2002;58:1112-1114
 64. Olkowski ZL. Mutant AP Endonuclease in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroreport* 1998;9:239-242
 65. Hayward C, Colville S, Swingler RJ, Brock DJ. Molecular Genetic Analysis of the APEX Nuclease Gene in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology* 1999;52:1899-1901
 66. Siddons MA, Pickering-Brown SM, Mann DM, Owen F, Cooper PN. Debrisoquine Hydroxylase Gene Polymorphism Frequencies in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroscience Letters* 1996;208:65-68
 67. Ono S, Imai T, Igarashi A, Shimizu N, Nakagawa H, Hu J. Decrease in the Ciliary Neurotrophic Factor of the Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *European Neurology* 1999;42:163-168
 68. Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. Disruption of the CNTF Gene Results in Motor Neuron Degeneration. *Nature* 1993;365:27-32
 69. Orrell RW, King AW, Lane RJ, de Belleruche JS. Investigation of a Null Mutation of the CNTF Gene in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 1995;132:126-128
 70. Moulard B, Salachas F, Chassande B, Briolotti V, Meininger V, Malafosse A, Camu W. Association Between Centromeric Deletions of the SMN Gene and Sporadic Adult-Onset Lower Motor Neuron Disease. *Annals of Neurology* 1998;43:640-644
 71. Veldink JH, van den Berg LH, Cobben JM, Stulp RP, De Jong JM, Vogels OJ, Baas F, Wokke JH, Scheffer H. Homozygous Deletion of the Survival Motor Neuron 2 Gene is a Prognostic Factor in Sporadic ALS. *Neurology* 2001;56:749-752

72. Giess R, Beck M, Goetz R, Nitsch RM, Toyka KV, Sendtner M. Potential Role of LIF as a Modifier Gene in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology* 2000;54:1003-1005
73. Panas M, Karadima G, Kalfakis N, Psarrou O, Floroskoufi P, Kladi A, Petersen MB, Vassilopoulos D. Genotyping of Presenilin-1 Polymorphism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neurology* 2000;247:940-942
74. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vlemminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciort R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. Deletion of the Hypoxia-Response Element in the Vascular Endothelial Growth Factor Promoter Causes Motor Neuron Degeneration. *Nature Genetics* 2001;28:131-138
75. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolffson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. VEGF is a Modifier of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice and Humans and Protects Motoneurons against Ischemic Death. *Nature Genetics* 2003;34(4):383-394
76. Wang XS, Lee S, Simmons Z, Boyer P, Scott K, Liu W, Connor J. Increased Incidence of the Hfe Mutation in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Related Cellular Consequences. *Journal of the Neurological Sciences* 2004;227:27-33
77. Siddique T, Nijhawan D, Hentati A. Molecular Genetic Basis of Familial ALS. *Neurology* 1996;47:27-35
78. Siddique T, Deng HX. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Human Molecular Genetics* 1996;5:1465-1470
79. Cole N, Siddique T. Genetic Disorders of Motor Neuron. *Seminars in Neurology* 1999;19:407-418
80. Sjalander A, Beckman G, Deng HX, Iqbal Z, Tainer JA, Siddique T. The D90A Mutation Results in a Polymorphism of Cu, Zn Superoxide Dismutase that is Prevalent in Northern Sweden and Finland. *Human Molecular Genetics* 1997;4:1105-1108
81. Al-Chalabi A, Andersen PM, Chioza B, Shaw C, Sham PC, Robberecht W, Matthijs G, Camu W, Marklund SL, Forsgren L, Rouleau G, Laing NG, Hulse PV, Siddique T, Leigh PN, Powell JF. Recessive Amyotrophic Lateral Sclerosis Families with the D90A SOD1 Mutation Share a Common Founder: Evidence for a Linked Protective Factor. *Human Molecular Genetics* 1998;7:2045-2050
82. Brown RH. SOD1 Aggregates in ALS: Cause, Correlate or Consequence?. *Nature Medicine* 1998;4:1362-1364
83. Elliott JL. Zinc and Copper in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Progress Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2001;25:1169-1185
84. Bär PR. Motor Neuron Disease in Vitro: The Use of Cultured Motor Neurons to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis. *European Journal of Pharmacology* 2000;405:285-295
85. Roe JA, Pazos MW, Moy VN, Goto JJ, Gralla EB, Valentine JS. In Vivo Peroxidative Activity of Fals-Mutant Human CuZnSODs Expressed in Yeast. *Free Radical Biology&Medicine* 2002;32:169-174
86. Yim MB, Kang JH, Yim HS, Kwak HS, Chock PB, Stadtman ER. A Gain-of-Function of an Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated Cu,Zn-Superoxide Dismutase Mutant: An Enhancement of Free Radical Formation due to a Decrease in Km for Hydrogen Peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:5709-5714
87. Estevez AG, Sampson JB, Zhuang YX, Spear N, Richardson G, Crow J, Tarpey MM, Barbeito L, Beckman J. Liposome-delivered Superoxide Dismutase Prevents Nitric Oxide-dependent Motor Neuron Death Induced by Trophic Factor Withdrawal. *Free Radical Biology&Medicine* 2000;28:437-446
88. Jung C, Rong Y, Doctrow S, Baudry M, Malfroy B, Xu Z. Synthetic Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics Reduce Oxidative Stress and Prolong Survival in a Mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Neuroscience Letters* 2001;304:157-160
89. Brown RH, Meininger V, Swash M. Amyotrophic Lateral Sclerosis. Martin Lunitz Publishing, United Kingdom.2000
90. Lin CLG, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. Aberrant RNA Processing in a Neurodegenerative Disease: the Cause of Absent EAAT2, a Glutamate Transporter, in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* 1998;20:589-599
91. Deitch, J, Alexander GM, Valle LD, Heinma-Patterson TD. GLT-1 Glutamate Transporter Levels are Unchanged in Mice Expressing G93A Human Mutant SOD1. *Journal of the Neurological Sciences* 2002;193:117-126
92. Julien JP, Beaulieu JM. Cytoskeletal Abnormalities in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Beneficial or Detrimental Effects?. *Journal of Neurological Sciences* 2000;180:7-14
93. Lariviere RC, Julien JP. Functions of Intermediate Filaments in Neuronal Development and Disease. *Journal of Neurobiology* 2003;58:131-148
94. Couillard-Després S, Zhu Q, Wong PC, Price DL, Cleveland DW, Julien JP. Protective Effect of Neurofilament Heavy Gene Overexpression in Motor Neuron Disease Induced by Mutant Superoxide Dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:9626-9630
95. Figlewicz DA, Garruto RM, Krizus A, Yanagihara R, Rouleau GA. The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. *Neuroreport* 1994;5:557-60
96. Ackerley S. Recent Developments in Models of Amyotrophy Lateral Sclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2004
97. Svendsen CN, Smith AG. New Prospects for Human Stem-cell Therapy in the Nervous System. *Trends in Neuroscience* 1999;22:357-364
98. Stevenson DS, Jarvis P. Chromatin Silencing: RNA in the Driving Seat. *Current Biology* 2003;13:R13-R15
99. Baum B, Craig G. RNAi in a Postmodern, Postgenomic Era. *Oncogen* 2004;23:8336-8339
100. Kunst CB. Complex Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *American Journal of Human Genetics* 2004;75:933-947
101. Kaspar BK, Lladó J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde Viral Delivery of IGF-1 Prolongs Survival in a Mouse ALS Model. *Science* 2003;301:839-842
102. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman S M, Carmeliet P, Mazarakis ND. VEGF Delivery with Retrogradely Transported Lentivector Prolongs Survival in a Mouse ALS Model. *Nature* 2004;429:413-417
103. Zheng C, Nennesmo I, Fadeel B, Henter JI. Vascular Endothelial Growth Factor Prolongs Survival in a Transgenic Mouse Model of ALS. *Annals of Neurology* 2004;56:564-567
104. Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, Pastore I, Marasso R, Madon E. Stem Cell Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Methodological Approach in Humans. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 2003;4:158-161