



Amiotrofična lateralna skleroza in frontotemporalna demenca

Boris Rogelj
boris.rogelj@ijs.si

Pregled predavanja



Kaj sta ALS in FTD

Opis bolezni in simptomi

Epidemiologija

Podobnosti med ALS in FTD

Patologija ALS

Izguba motoričnih nevronov

Akumulacija in agregacija toksičnih proteinov

Funkcionalno genetske raziskave pri ALS

TAR DNA vezavni protein (TDP-43)

Fused in Sarcoma (FUS)

C9orf72

Kaj je amiotrofična lateralna skleroza?

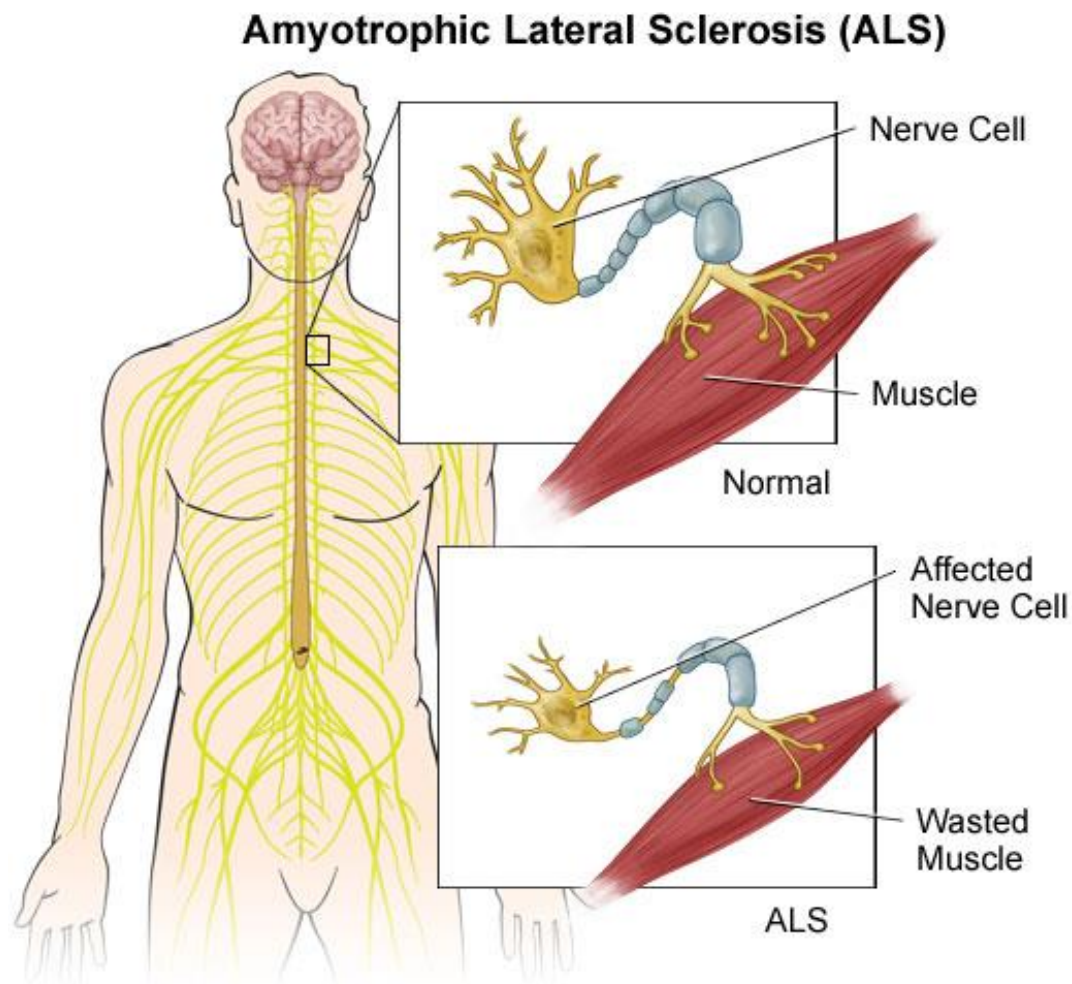
(oz. bolezen motoričnih nevronov, Lou Gehrigova ali Charcotova bolezen)

Degeneracije (propadanje) motoričnih nevronov, ki vodi do mišične atrofije.

Progresivna paraliza – bolniki ne morejo hoditi, govoriti, jesti,...

Ohranejena so čutila, zavedanje, gibanje oči, zadrževanje blata in vode...

Bolezen zaenkrat še ni ozdravljiva.



Iz česa izhaja ime ALS

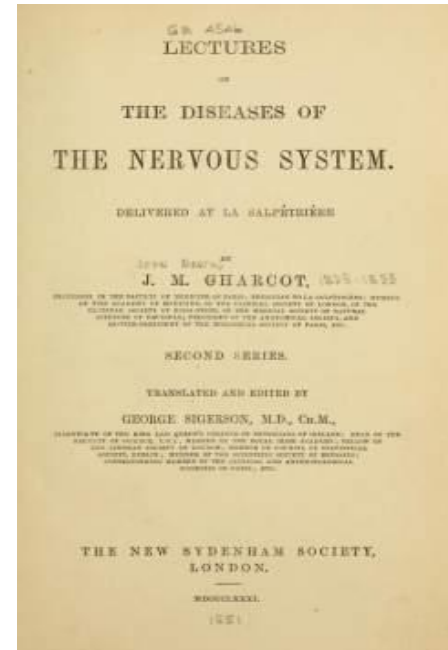
- A-mio-trofična je staro-grška beseda
- “A” = ne / ni
- “mio” = mišica
- “trofična” = prehranjevanje
- “Ni prehranjevanja mišic“

- Lateralna = lokacija nevronov, ki nadzorujejo mišice

- Skleroza = brazgotine v regiji, ki degenerira

Druga imena ALS

- Bolezen motoričnega nevrona
- Charcotova bolezen



- Lou Gehrigova bolezen



Epidemiologija in prognoza

Povprečna starost ob začetku je ~55 let.

Način prenosa:

Sporadično – 95 %

Dedno – 5 %

Razmerje M:Ž – 3:2

Incidenca 1-2,5 / 100.000

Prevalenca 6-8 / 100.000

Prognoza – ni enostavno določiti

50 % živi 3-4 ali več let

20 % živi 5 ali več let

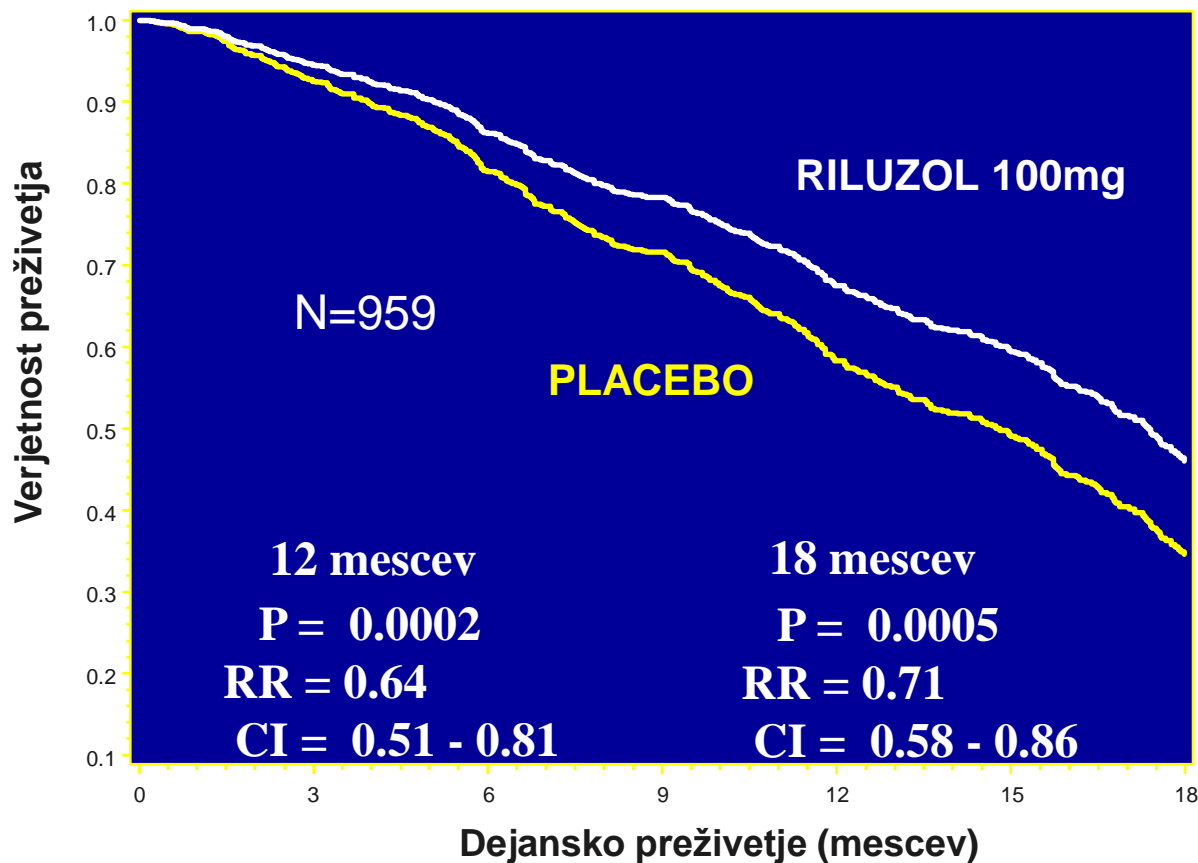
10 % živi 10 ali več let

Nekateri bolniki živijo tudi 20 let ali več.



Stephen Hawking

>100 preizkušenih zdravil – deluje samo riluzol



Riluzol (Rilutek) podaljša življenje za **3 mesece**.

Bolniki z ALS



Najbolj pogosti vzrok za povpraševanje o evtanaziji.

Nizozemska: 60 % pacientov razmišljajo o evtanaziji in 25 % jo izpelje.

Film o ALS

- <http://vimeo.com/27944955>

Zakaj pri bolnikih nastane paraliza?



Piramidalni motorični nevroni v frontalni možganski skorji propadajo in umirajo, pri čemer povzročajo močno spastičnost in rahlo šibkost.



Motorični nevroni v hrbtenjači propadajo in umirajo, pri čem povzročajo usahlost mišic in močno šibkost.

Degeneracija se širi, dokler niso zajeti skoraj vsi motorični nevroni, kar posledično vodi do popolne paralize mišic.

Anatomske spremembe pri ALS



- Konjski rep (cauda equina).
Tanjše anteriorne korenine živcev in bolj temne.
- Atrofija precentralnega girusa, kjer se nahaja motorični korteks.
- Tudi frontalni del je atrofiran – pacient je najbrž imel FTLD/ALS

Atrofija mišičnih vlaken pri ALS

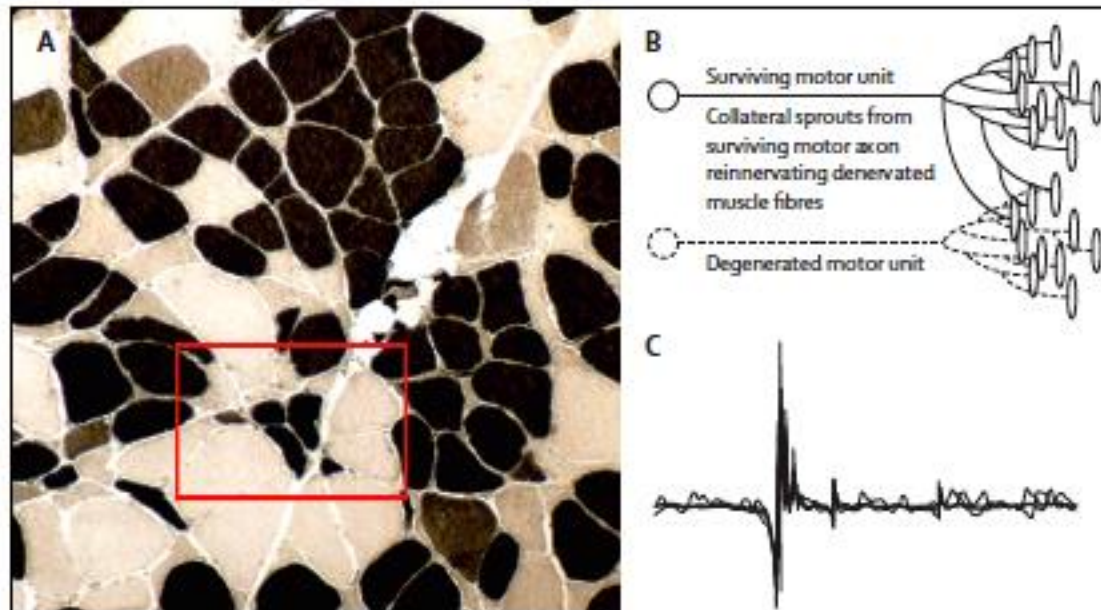


Figure 4: Investigation findings in ALS

(A) Biopsy sample of the left vastus lateralis muscle from a patient with ALS, stained with ATPase pH 9.4. The biopsy sample highlights grouped atrophic fibres with both type I and type II fibres (mixed-type fibres, encompassed by red box). (B) Pathophysiology of motor unit degeneration and reinnervation; with superimposition (C) of ten traces demonstrating the typically large, polyphasic, unstable (complex) motor units observed in established ALS (sweep duration 50 ms), with late components, indicating some re-innervation. ALS= amyotrophic lateral sclerosis.

Atrofija mišic pri ALS

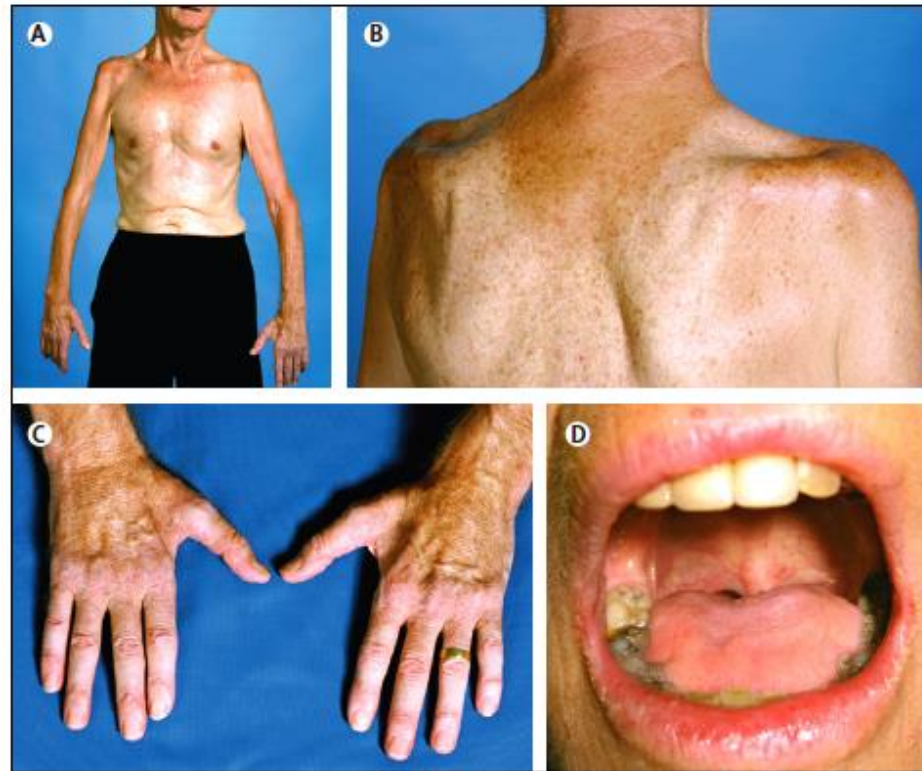


Figure 1: Clinical features of muscle wasting in a patient with ALS

Proximal and symmetrical upper limb wasting (A) results in an inability to lift arms against gravity ("man-in-the-barrel" or flail-arm variant ALS). Note the recessions above and below the scapular spine (B), indicating wasting of supraspinatus and infraspinatus muscles, as well as substantial loss of deltoid muscle. As a consequence, the glenohumeral joint becomes prominent, and prone to subluxation. (C) Disproportionate wasting of the thenar muscles combined with the first dorsal interossei, the so-called "split-hand", is a typical feature in ALS.¹⁷ Although the mechanisms underlying this disproportionate wasting of hand muscles are unclear, a corticomotoneuronal origin has been proposed.¹⁷ Specifically, the thenar muscles and first dorsal interossei receive more extensive corticospinal connections and thereby might be prone to glutamate-mediated excitotoxicity.¹⁸ (D) Substantial wasting of the tongue muscles in bulbar-onset ALS. Note the absence of palatal elevation present on vocalisation. Difficulty with mouth opening and dysphagia might require supplementary feeding through a percutaneous endoscopic gastrostomy. In further support of a corticomotoneuronal hypothesis, the tongue is often disproportionately affected in comparison to other oropharyngeal musculature in patients with bulbar-onset ALS. As with the thenar muscles in the hand, the tongue receives more extensive cortical input than other muscle groups in the oropharyngeal area. ALS=amyotrophic lateral sclerosis.

Simptomi ALS

Zgodnji znaki:

1. Trzanje (fascikulacije), okornost, krči.
2. Šibkost rok in nog, zato se bolniki pogosto spotikajo na neravnih tleh ali imajo težave s hojo po stopnicah. Šibkost rok lahko pripelje, na primer, do težav pri prijemanju ali držanju skodelice, ali izgubo koordinacije v prstih.
3. Redkeje, šibkost mišic v ustih. Bolnik vse težje žveči, pogoltne in govori.

Pozni znaki:

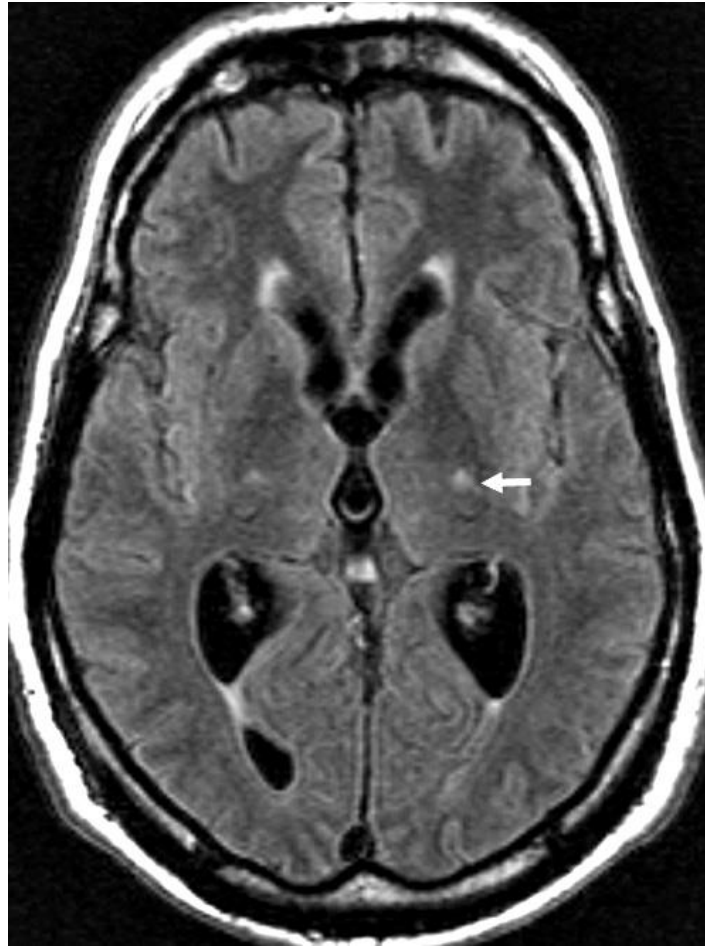
Napredovanja bolezni je povezano z izgubo telesne teže, utrujenostjo, povečanih refleksov in zmanjšano koordinacijo. Na koncu bolniki ne morejo hoditi, stati, jesti, ali dihati brez pomoči. Povečana občutljivost za pljučnico in odpovedjo dihanja v treh letih povzroči smrt pri polovici bolnikov.

Vendar pa se ohranijo mišice, ki nadzoruje gibanje oči in zapiralke sečil.

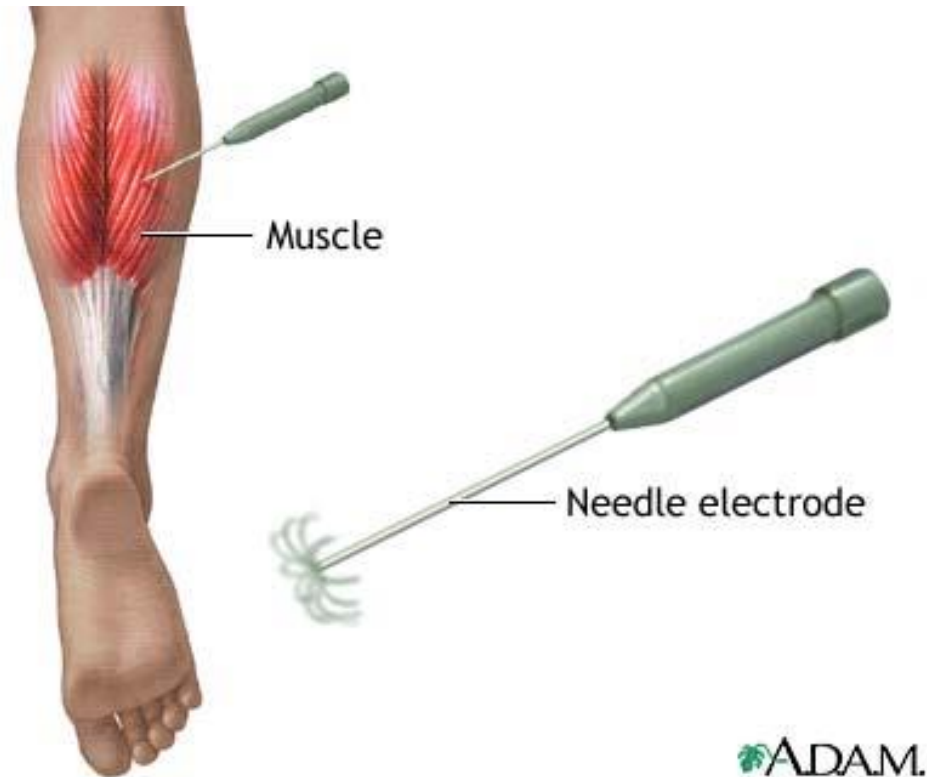
Diagnoza ALS

- Diagnostični marker še ni odkrit.
- Serija klinični in nevrološki pregledov.
- MRI
- Mielogram vratne hrbtenice (rentgenska analiza, ki omogoča zaznavanje sprememb v izbranem delu hrbtenjače).
- Biopsija mišic in / ali živčevja.
- Elektromiografija (EMG) in hitrost prevodnosti živcev (NCV), za merjenje mišičnega odziva na stimulacijo živcev.

MRI pri ALS



Electromiografija (EMG)



Igla elektrode se vstavi skozi kožo v mišico. Vsako mišično vlakno, ki se skrči, bo imelo akcijski potencial. Prisotnost, velikost in oblika vala akcijskega potenciala na osciloskopu, podaja informacije o zmožnosti mišice da se odzove na stimulacijo.

Frontotemporalna demenca

Klinične, patološke in genetske raziskave kažejo na prekrivanje med ALS in FTD.

Bolezen z opazno atrofijo frontalnega in temporalnega korteksa, kar vodi do izgube osebnosti in zavedanja.

“FTD je zrcalna slika Alzheimerjeve bolezni, kjer so na začetku izraziti vedenjski problemi, težave s spominom nastopijo šele kasneje”.

FTD predstavlja 3-20 % vseh demenc.

Pogost vzrok za demenco pri mlajši populaciji!

Veliko socialno breme za družbo, ker pacienti potrebujejo oskrbo in zaradi visokih stroškov zdravljenja.



FTD epidemiologija

- Povprečna starost nastopa bolezni: 52.8 (Ratnavalli et al. Neurology 2002).
- Pri enih raziskava je več moških (14:3) pri drugi pa ne (M=Ž).
- Prevalenca FTD v starostni skupini 45-64 je enaka AB (15:100.000).
- Pogost vzrok demence v mlajši populaciji.
- Na ta račun velik pritisk na skrbnike in visoka cena zdravstvene oskrbe.

Vedenjske spremembe pri ALS in FTD

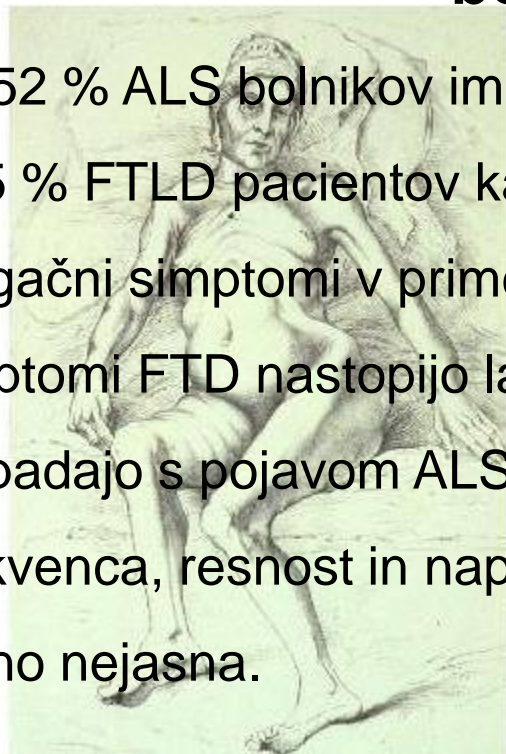
- Razlikujejo se glede na prizadete nevroanatomske poti
- Najpogostejši skupni simptomi:
 - Apatija
 - Duševna togost
 - Perseverativno vedenje
 - Inertnost
 - Iritabilnost
- Dodatne vedenjski simptomi lahko vključujejo:
 - Dezinhibicija
 - Izguba fokusiranja
 - Družbeno neprimerno vedenje
 - Pomanjkanje empatije
 - Ritualistično vedenje

Klinične posledice kognitivnih motenj pri ALS

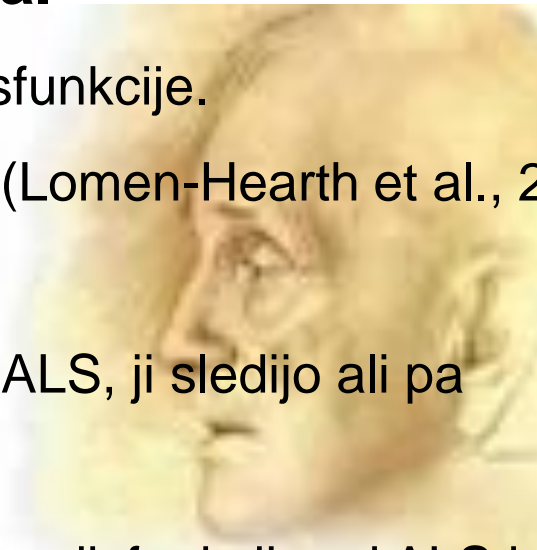
- Poslabšanje presoje, pozornosti, zadržanosti in govora lahko povzroči dodatno obremenitev pri načrtovanju oskrbe bolnikov.
- Lahko je zmanjšana sposobnost odločanja.
- Zmanjšana pobuda
- Ogroženo je lahko zavedanje o varnosti.
- Prispeva k dodatnemu stresu, ki ga doživljajo skrbniki/svojci.

ALS in FTD: Dve ločeni bolezni ali dva prikaza enega fenotipskega spektra?

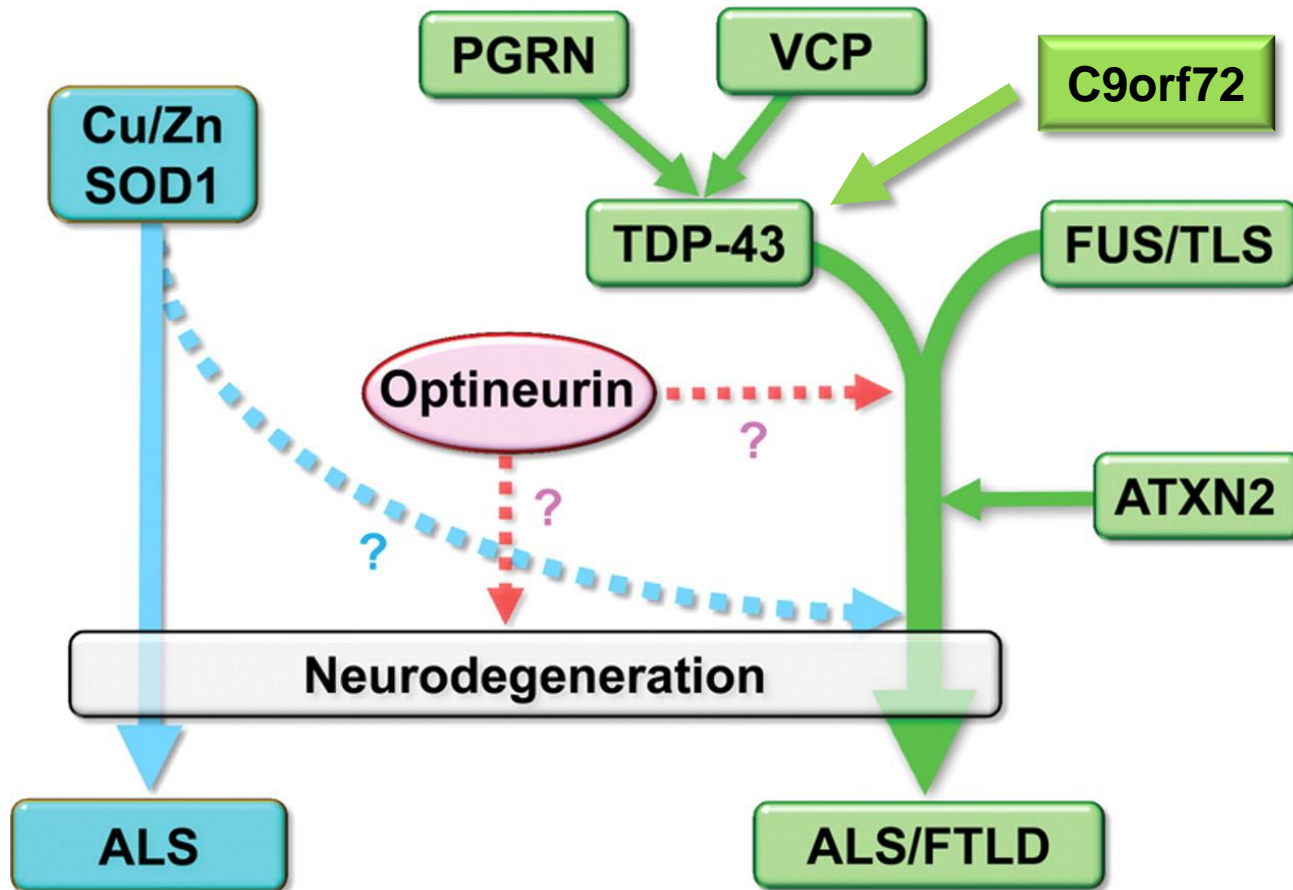
Klinične, patološke in genetske raziskave kažejo, da se bolezni prekrivata.



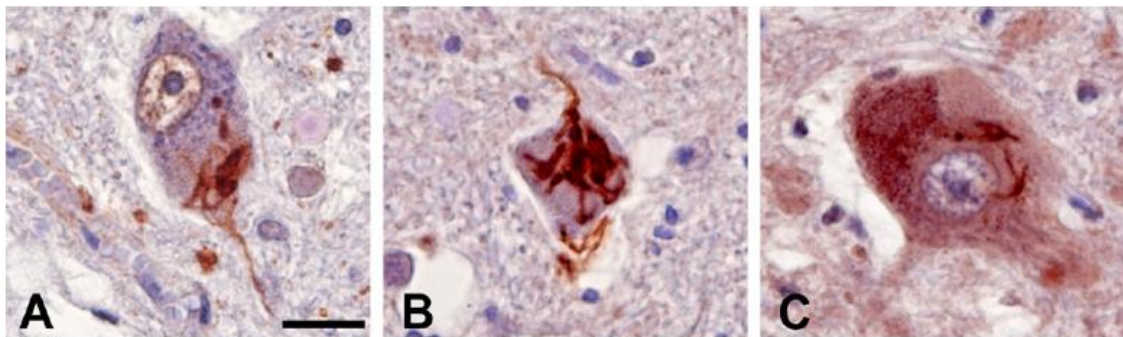
- 2 – 52 % ALS bolnikov ima tudi kognitivne disfunkcije.
- 5-15 % FTLD pacientov kaže simptome ALS (Lomen-Hearth et al., 2002).
- Drugačni simptomi v primerjavi z AB.
- Simptomi FTD nastopijo lahko pred pojavom ALS, ji sledijo ali pa sovpadajo s pojavom ALS.
- Frekvenca, resnost in napredovanje kognitivne disfunkcije pri ALS je še vedno nejasna.



ALS in FTD: Dve ločeni bolezni ali dva prikaza enega fenotipskega spektra?

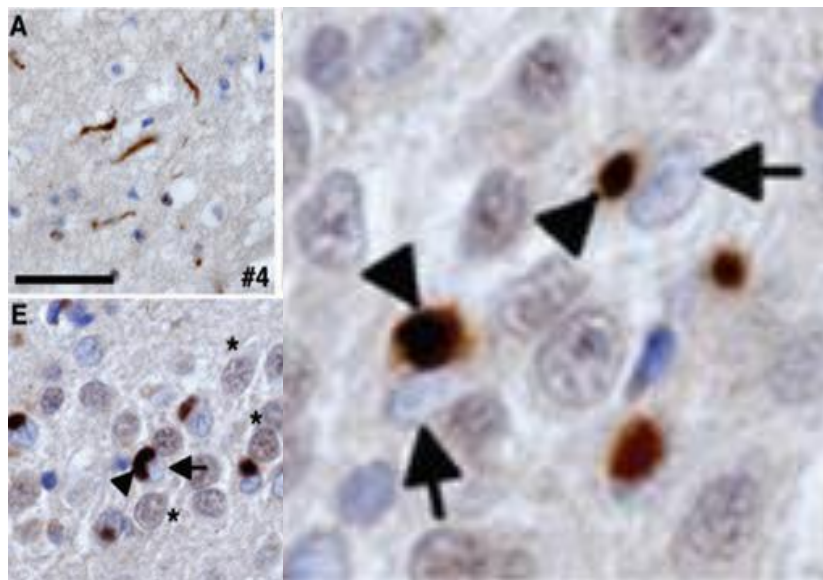


Zakaj motorični nevroni degenerirajo?



V 95% primerov ALS se protein TDP-43 akumulira v motoričnem nevronu.

TDP-43 je običajno v jedru celice, kjer sodeluje pri procesiranju prepisov z genov.



TDP-43 se tudi kopiči v nevronih možganske skorje pri 60% pacientov s fronto-temporalno demenco (FTD).

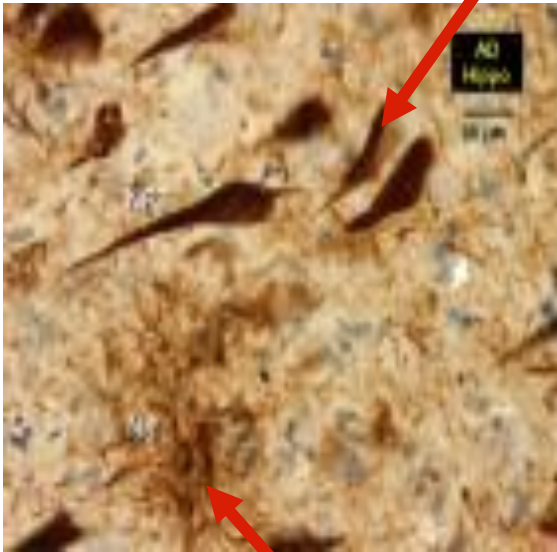
TDP-43 pozitivnim ALS in FTD pravimo **proteinopatije TDP-43**.

Bolezen nastaja zaradi **toksičnosti agregatov v citoplazmi** ali **izgube funkcije v jedru**.

ALS in FTD sta podobna drugim nevrodegeneracijam

Alzheimerjeva bolezen

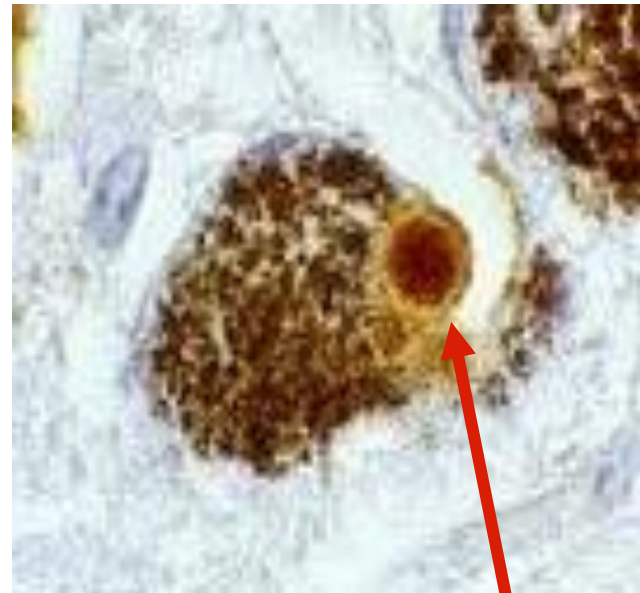
Nevrofibrilarne pentlje



Amiloidni plaki

Nevroni možganske skorje

Parkinsonova bolezen

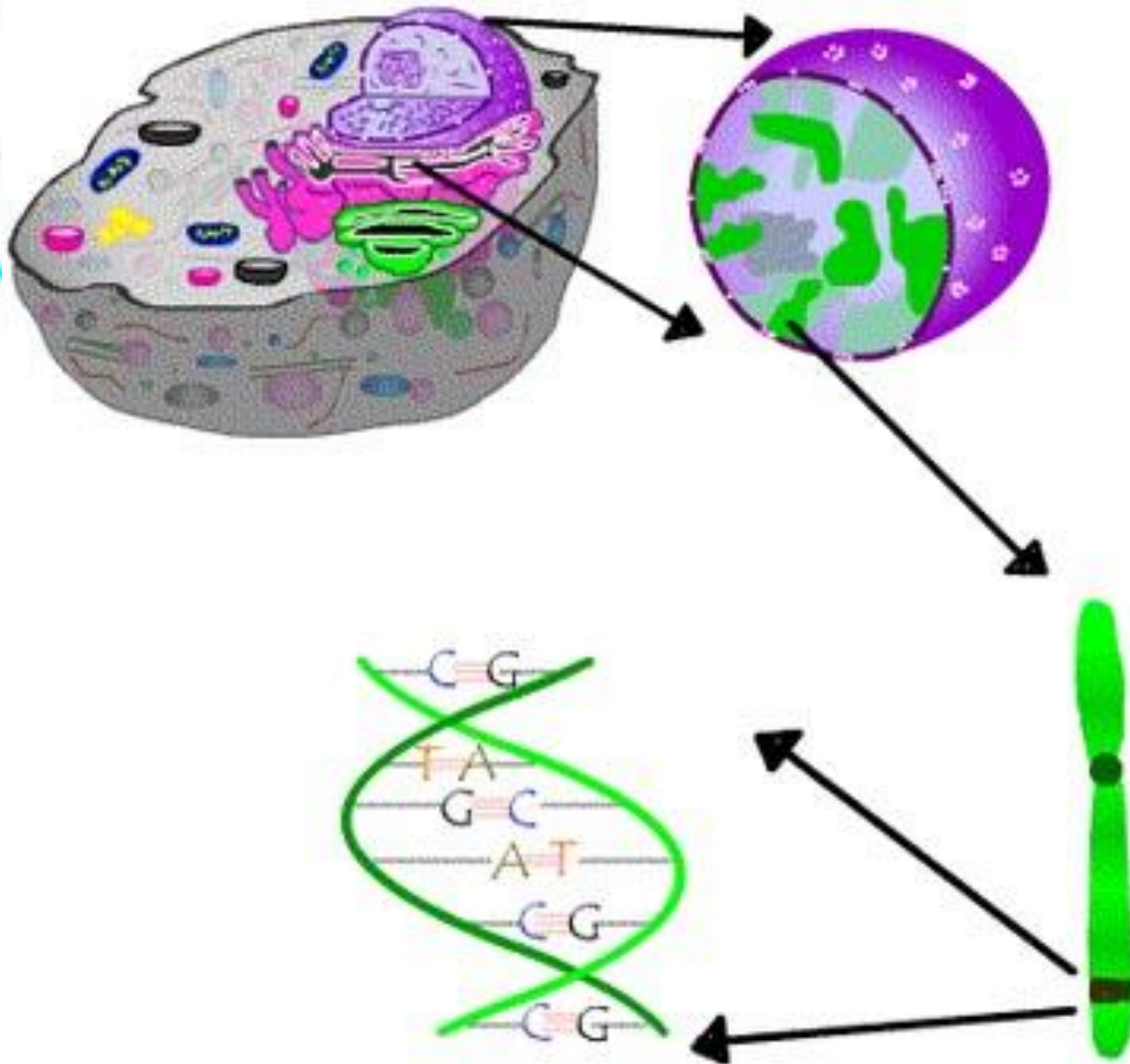


Lewyjeva telesca

Nevroni v možganskem deblu

Agregacija proteinov je vzrok večine nevrodegenerativnih bolezni.

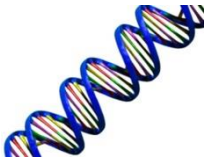
Genetika ALS



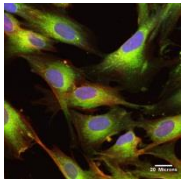
Vertikalnost raziskave



- Pacient: klinična slika, DNA, celice (fibroblasti, limfoblastoidi), kri, cerebrospinalna tekočina, donirani posmrtni možgani in hrbtenjača (možganska banka).



- Molekularni nivo: DNA analiza, biokemija, strukturna biologija, RNA biologija, tehnologije visoke zmogljivosti.



- Modeli: bakterija, kvasovka, matične celice, vinska mušica, navadna cebrica, miške, podgane.



- PM analiza: kaj se vidi v živčnem tkivu bolnikov, ki so donirali svoje živčevje v raziskovalne namene?



- Pacienti: Končni cilj! Testiranje zdravil in **zdravljenje!!!!**

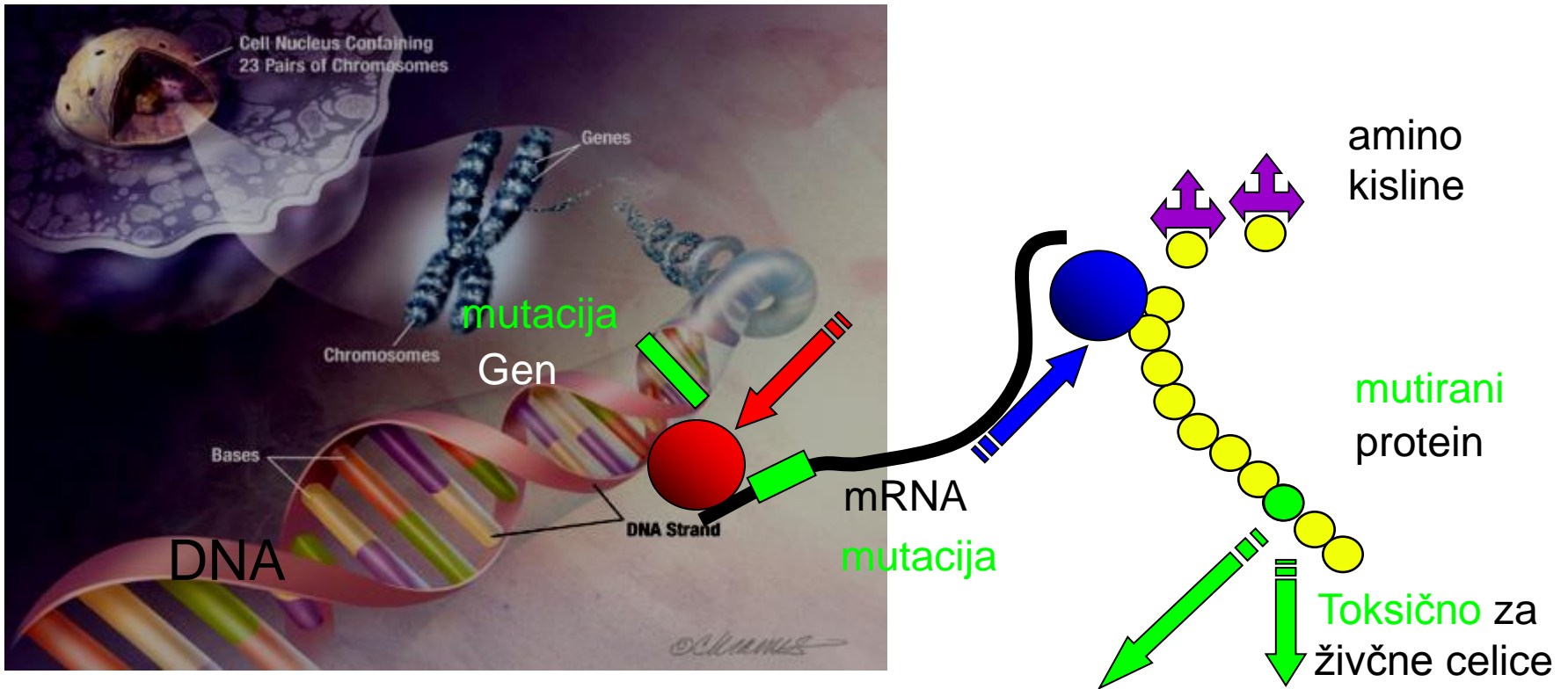


Zakaj genetske raziskave?

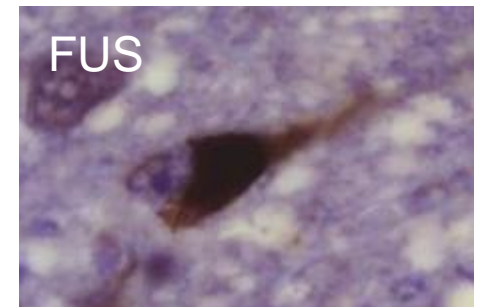
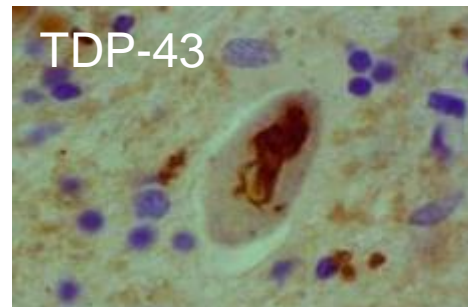
Genetske raziskave omogočajo razumevanje vzrokov ALS ter razvoj orodij za modeliranje bolezni.

Samo, ko bomo razumeli mehanizme bolezni, bomo lahko odkrili tudi zdravila.

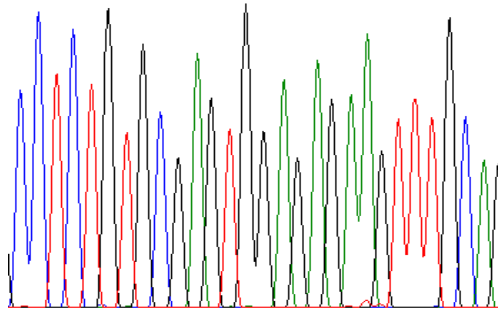
DNA, geni, RNA, proteini in ALS



Mutirani ali poškodovani **proteini se kopičijo** znotraj motoričnih nevronov in povzročajo njihovo degeneracijo.



Napredki določanja zaporedja DNA spreminjajo genetiko



2000

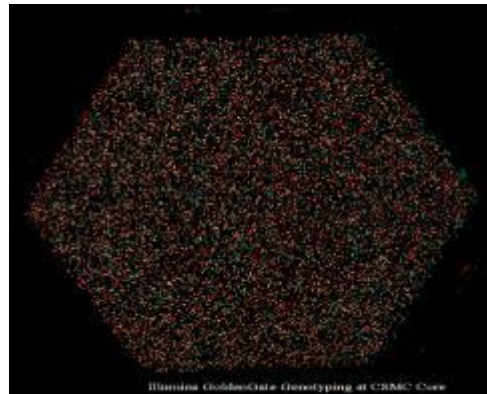
Sanger sekvenciranje

ABI 3100

Genom ene osebe

15 let

€250.000.000



2012

Sekvenciranje s sintezo

Illumina HiSeq 2000

Genom ene osebe

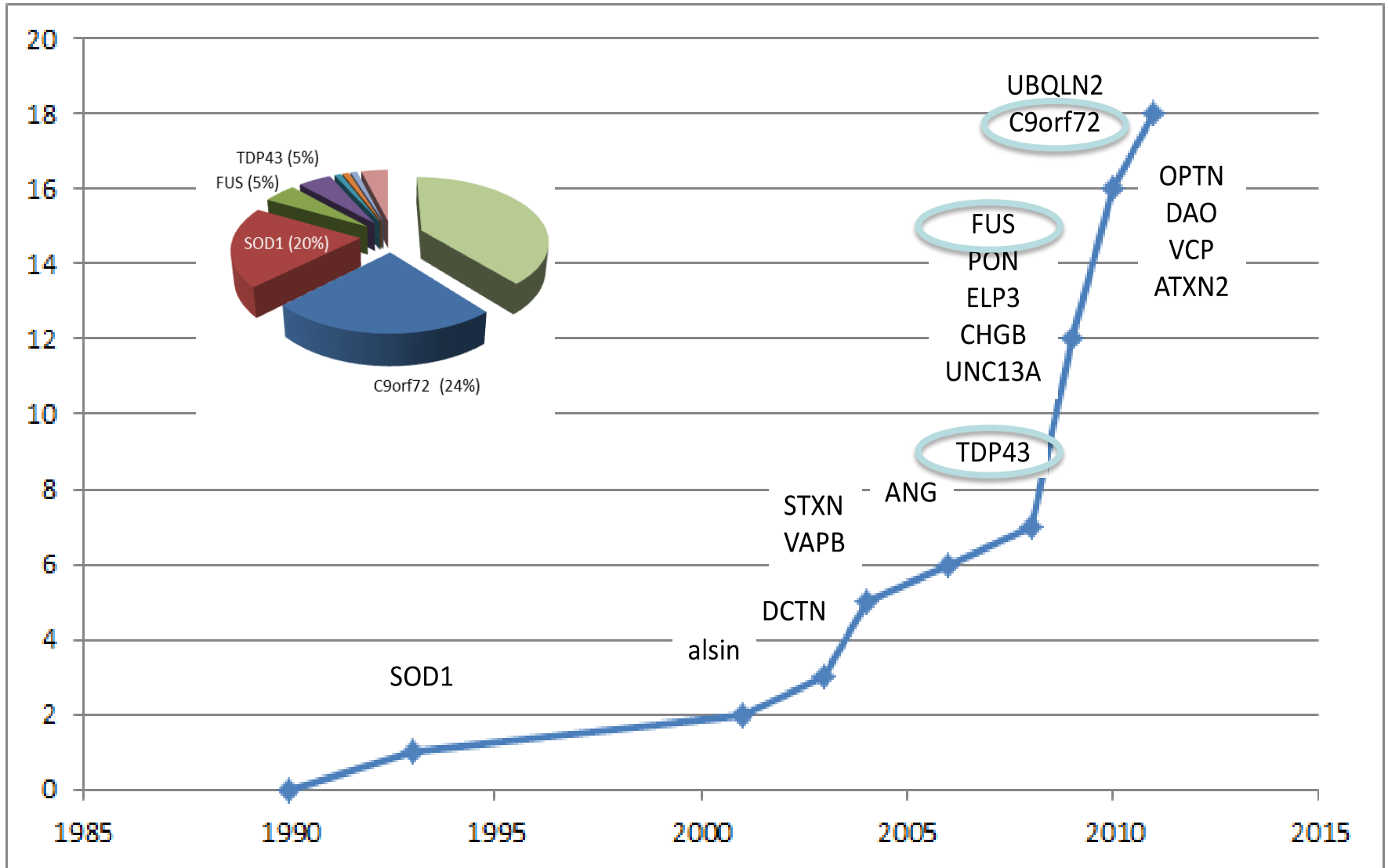
1 teden

€2.500

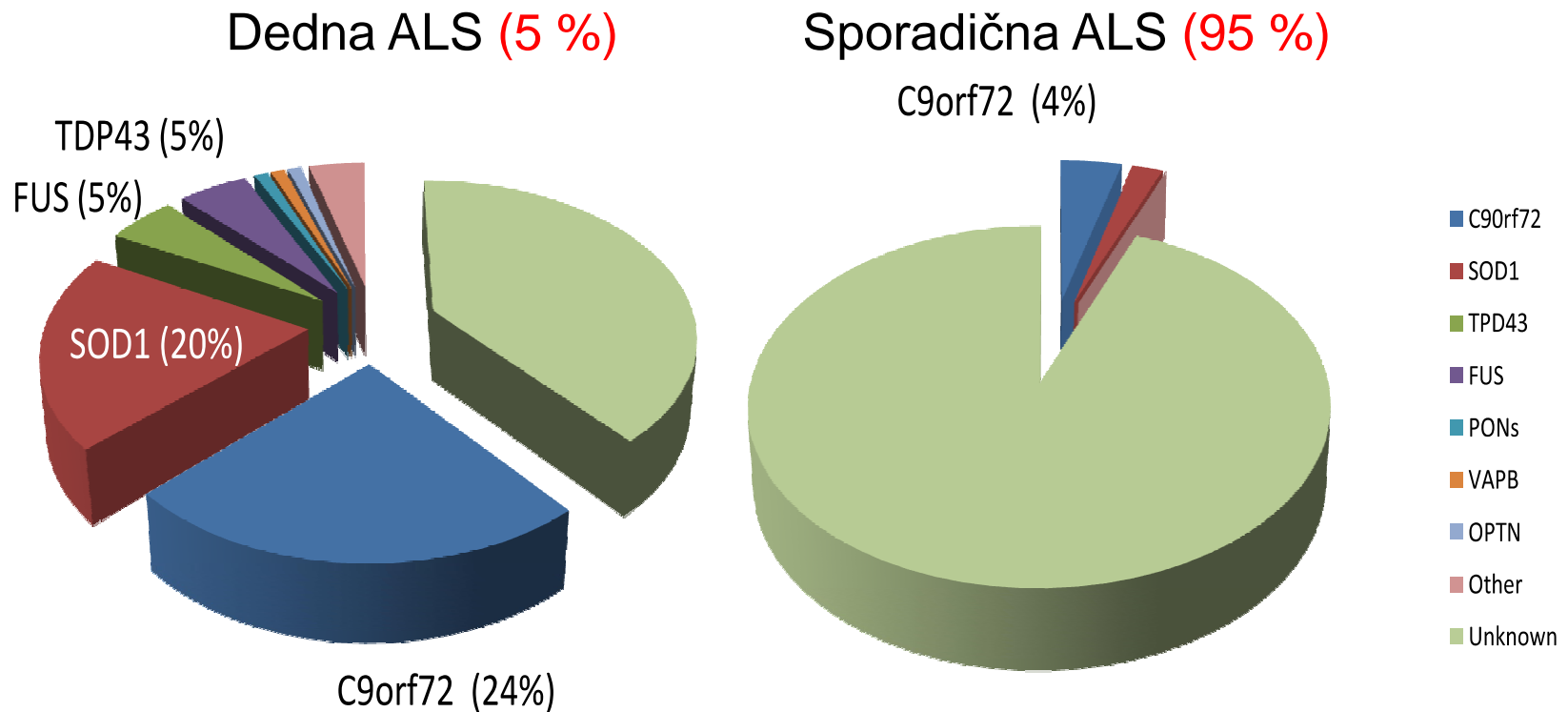
Danes je določanje zaporedja DNA **1.000 krat hitrejše** in **100.000 krat cenejše**.

Nove metode bodo omogočile **odkritje vseh genov ALS** v naslednjih nekaj letih.

Odkrivanje novih genov ALS



Delež ALS pacientov z znanimi mutacijami

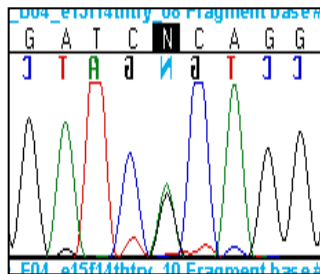
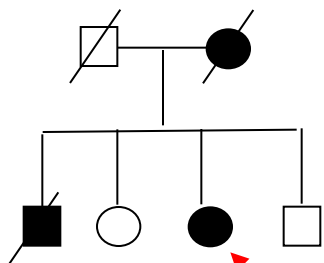


Mutirani geni so znani že pri **60 %** dedne ALS in **5 %** sporadične ALS.

Lahko se uporabijo pri **diagnostiki** pacientov ter **testiranju sorodnikov**.

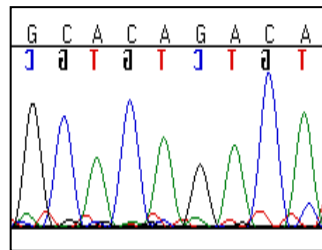
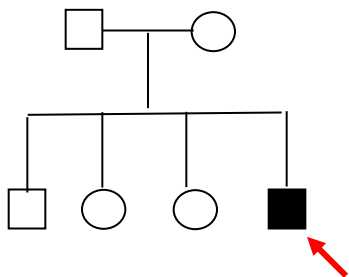
Kako lahko gensko testiranje pomaga pacientom?

Dedna ALS

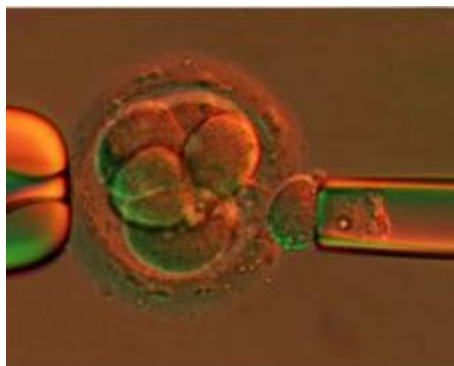


Z genskim testiranjem lahko ugotovimo **vzrok bolezni**.

Sporadična ALS



Izključitev prisotnosti mutacij je lahko za sorodnike/otroke zelo **pomirjevalno**.



Lahko ustavimo prenos mutirnega gena na **otroke in naslednje generacije**.

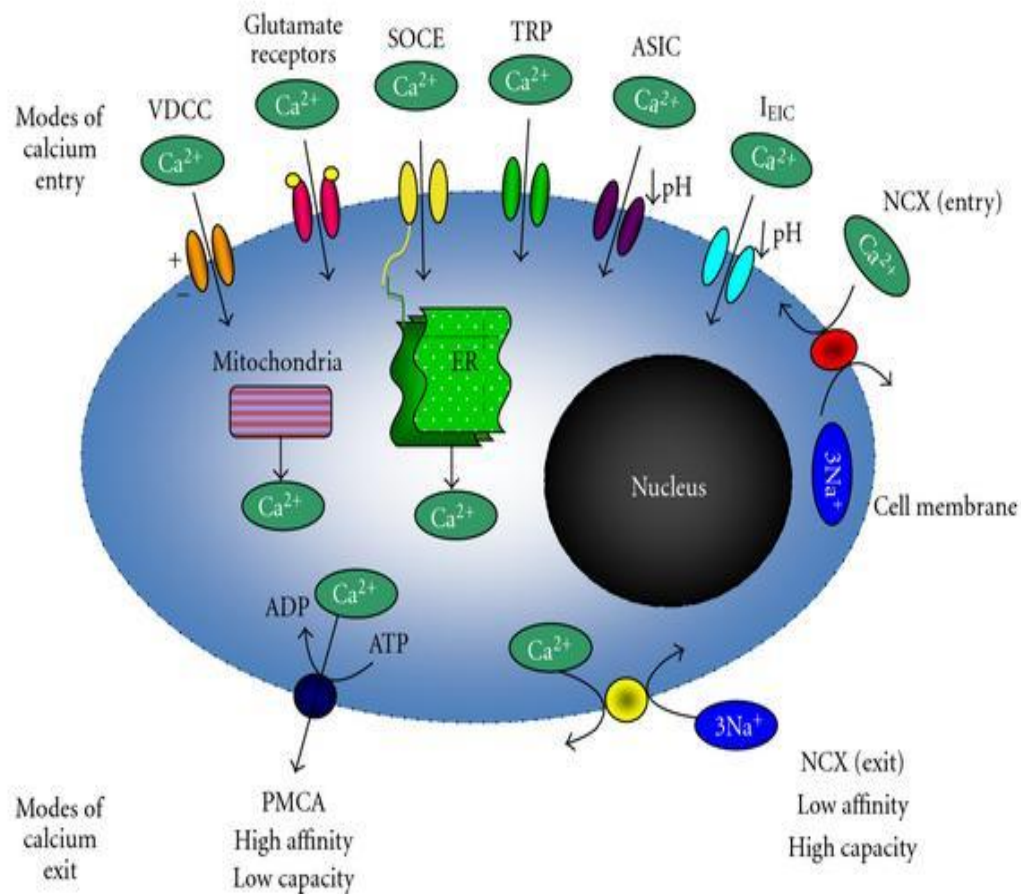
- Prenatalna diagnostika
- Preimplantacijska diagnostika (IVF in gensko testiranje).

Vzroki za ALS

- Mutacije v SOD1, TARDBP, FUS in C9orf 72 so odkrite pri dedni ALS.
- Nekateri raziskave kažejo, da naj bi se ALS začela v skeletnih mišicah in ne v motoričnih nevronih (Marcuzzo et al., 2011).
- **Imunološki** vzroki so še vedno predmet raziskav, vendar pa trenutne raziskave ugotavljajo, da imajo ALS bolniki protitelesa, ki kot tujke prepoznajo različne nevronske proteine, kot so receptorji za kalcij.

Vdor kalcija

- Našli so IgG protitelesa proti kalcijevim (Ca^{2+}) kanalčkom (Gonzalez, et al., 2011)
- Protitelesa se vežejo na kanalčke in omogočajo dotok kalcija v celico. Kalcij vstopi v mitohondrije, povzroča stres in sproži apoptozo.



SOD1 - prva mutacija pri ALS

LETTERS TO NATURE

Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis

Daniel R. Rosen*, **Teepu Siddique†**, **David Patterson‡**,
Denise A. Figlewicz§, **Peter Sapp*||**, **Afif Hentati†**,
Deirdre Donaldson‡, **Jun Goto§**,
Jeremiah P. O'Regan*||, **Han-Xiang Deng†**,
Zohra Rahmani‡, **Aldis Krizus§**,
Diane McKenna-Yasek*, **Annarueber Cayabyab†**,
Sandra M. Gaston*¶, **Ralph Berger‡**,
Rudolph E. Tanzi¶, **John J. Halperin***, **Brian Herzfeldt†**,
Raymond Van den Bergh**, **Wu-Yen Hung†**,
Thomas Bird††, **Gang Deng†**, **Donald W. Mulder‡‡**,
Celestine Smyth†, **Nigel G. Laing§§**, **Edwin Soriano†**,
Margaret A. Pericak-Vance|||, **Jonathan Haines¶¶**,
Guy A. Rouleau§, **James S. Gusella¶¶**,
H. Robert Horvitz|| & **Robert H. Brown Jr* ##**

TABLE 1 Linkage analysis of FALS pedigrees with SOD1 marker D21S223 (DB1)

| | θ | Lod score | | | | | | |
|-------------------------|----------|-----------|------|------|------|------|------|------|
| | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
| All families* | | $-\infty$ | 3.83 | 4.25 | 4.05 | 3.55 | 2.87 | 2.11 |
| Ch. 21-linked families† | | 6.80 | 6.05 | 5.26 | 4.44 | 3.61 | 2.77 | 1.93 |

* Data are tabulated from an analysis of 12 families in the Boston arm of the FALS collaborative study^{8,12}.

† A subset of six families with a high (>80%) posterior probability of linkage to D21S223 as defined using the program HOMOG (ref. 14). Some of the 11 mutations described in Table 3 were detected in DNA from members of FALS families too small for significant linkage analysis. Such families could not be included in the linkage data summarized here.

study (Table 1). Using the program HOMOG^{13,14}, we have identified a subset of six of these FALS families in which the disease displays no recombination with D21S223 (Table 1; $z = 6.8$ at $\theta = 0$) and is likely to be tightly linked to SOD1; nine families of the Chicago group also display significant linkage to the SOD1 region of chromosome 21 (data not shown).

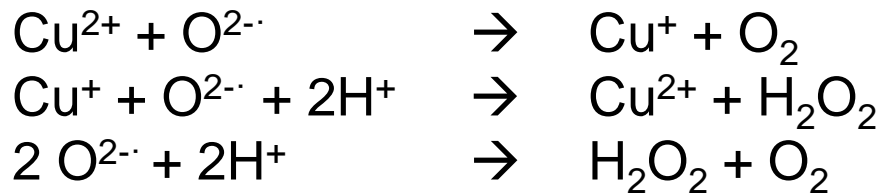
To determine whether FALS is associated with mutations in the SOD1 gene, we designed PCR primers for two of the five SOD1 exons based on the published sequence for human

Superoksid dismutaza 1

SOD1 je citosolni protein.

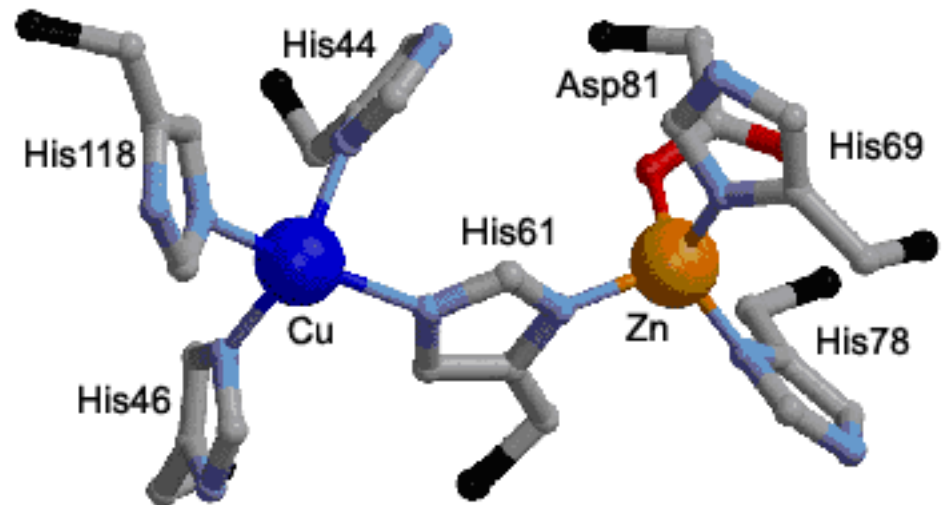
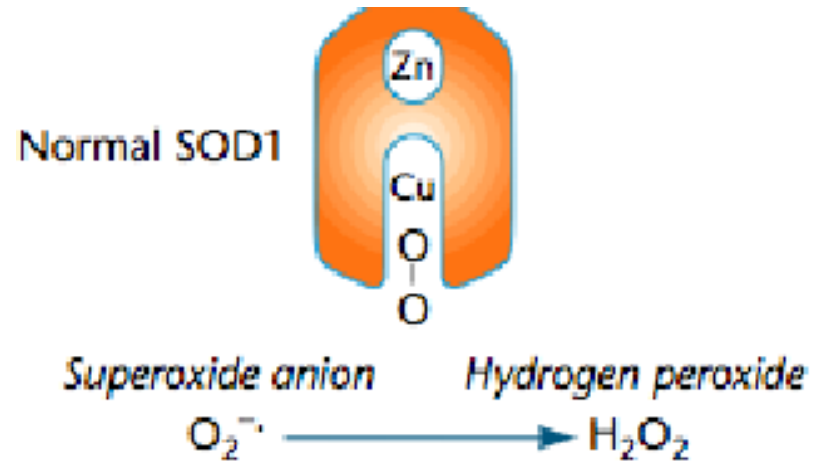
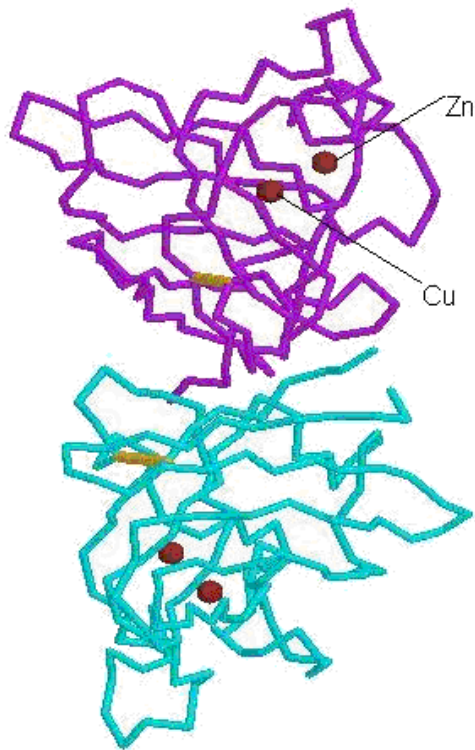
153 ak in približno 16 kDa. Deluje kot homodimer

Vsak monomer veže Cu^{++} in Zn^{++} ion. SOD1 sodeluje pri redukciji Cu^{++} v Cu^+ . Katalizira dimutacijo superoksidnega iona $\text{O}_2^{\cdot-}$ v vodikov peroksid H_2O_2



Katalaze nato reducirajo vodikov peroksid v vodo.

Struktura SOD1: homodimer



SOD1 in dedna ALS (FALS)

- Mutacije v SOD1 so bile odkrite leta 1993.
- Sedaj je znanih več kot 125 mutacij. 114 jih je povezanih z ALS. Večina od njih so kodirajoče, le 12 je nesmiselnih mutacij ali delecij.
- Večina mutacij zmanjša aktivnost dismutaze, vendar nekatere mutacije ne vplivajo na funkcijo in a so kljub temu povezane z ALS. Ni jasne povezave med encimsko aktivnostjo in napredovanjem bolezni.
- KO SOD1 ne povzroča bolezni, čezmerno izražanje pa jo.

Najbolj pogoste mutacije SOD1 v FALS

| | | |
|-------------|---|--------------------|
| A4V | This is the most severe and aggressive form of SOD1 mutation, early onset, short survival (about 1 year) and limited upper neuron involvement. Most common in the U.S. | Extremely unstable |
| D90A | Benign polymorphism in Scandinavian heterozygous , but not homozygous patients, who show low progressive disease and have prolonged survival (over a decade) | Very unstable |
| G37R | Dismutase activity as in wild-type | Very unstable |
| G85R | Expression of low copies of the mutated gene in the animal model leads to reproducibility of typical human ALS phenotype late onset, extremely fast progression to death. | Very unstable |
| G93A | Typical onset and progression of the disease. First animal model created. In the mouse, the phenotype is comparable to human ALS. | Very unstable |

Možne vloge mutiranega SOD1 pri FALS

Izguba fiziološke funkcije: neaktiven encim.

Pridobivanje toksične funkcije:

- 1) Napačna redoks reakcija;** verjetno zaradi spremembe konformacije SOD1, ko se spremeni oblika kanala (del molekule, ki sprejema superoksidni ion), tako da lahko sprejme večje molekule. To lahko vodi do peroksidacije, tirozin nitrozilacije in katalize v nasprotno smer (zaradi nepravilne vezave Zn^{2+} iona, ki vodi do nastanka superoksidnih ionov). **Ni značilno za vse SOD1 mutacije.**
- 2) Nestabilnost proteina in agregacija - lastnost vseh mutant.**

G85R SOD1 nematoda

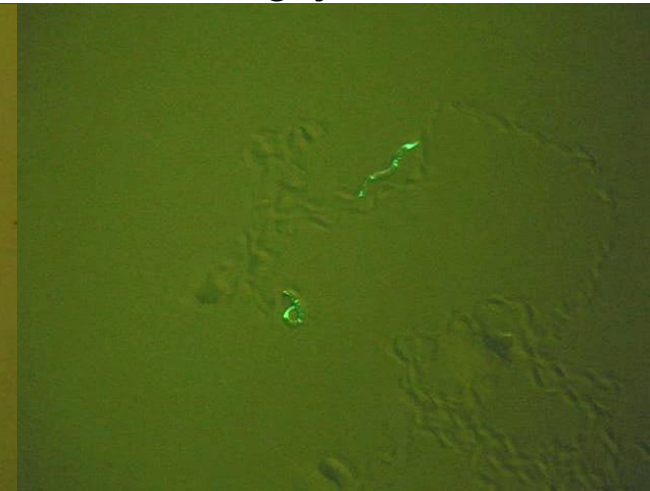
Premetavanje
normalne nematode



Premetavanje G85R
SOD1 Tg nematode



Gibanje nematod na
gojišču



SOD1 miška



Inhibicija kanalčka presledkovnega stika (Gap Junction Hemichannel) upočasni napredovanje bolezni v mišjem modelu ALS