

## Het verband tussen amyotrofe lateraal sclerose en superoxide dismutase.



Door: Niek Weerink  
Studentnummer: s1857290  
Begeleider: prof. Dr. P.G.M. Luiten  
Discipline: Neurowetenschappen

## Abstract

Amyotrofe lateraal sclerose (ALS) is een verwoestende neurodegeneratieve ziekte die ervoor zorgt dat alle motorische functies een voor een uitvallen. Patiënten overlijden vaak vanwege het afsterven van de motorneuronen die de hart- en ademhalingspiers aansturen, waardoor deze spieren op hun beurt niet meer functioneren. Er wordt gezocht naar de oorzaak van deze ernstige ziekte. Een veelbelovende kandidaat hiervoor is het enzym superoxide dismutase-1 (SOD1). SOD1 is normaliter een belangrijke schakel in de verdediging tegen oxidatieve stress. Mutatie van SOD1 zorgt er vaak voor dat het eiwit van conformatie veranderd en hiermee zijn functie verliest. Ook kan het ervoor zorgen dat SOD1 de benodigde metaalatomen verliest of kan aggregeren. Dit kan ertoe leiden dat verschillende beschermingsmechanismes en de werking van de mitochondria kan veranderen, wat mogelijk leidt tot apoptose. De mutatie van SOD1 heeft niet alleen effect in de motorneuronen zelf maar ook in de andere cellen van het centraal zenuwstelsel zoals astrocyten en microglia cellen. Dit omdat ook deze celtypen, net als motorneuronen, veel in aanraking komen met superoxides. Het lijkt erop dat er een verband bestaat tussen ALS en SOD1, de vraag blijft alleen hoe sterk dit verband is. En wat de invloed is op de zoektocht naar een behandeling voor ALS.

## Inleiding

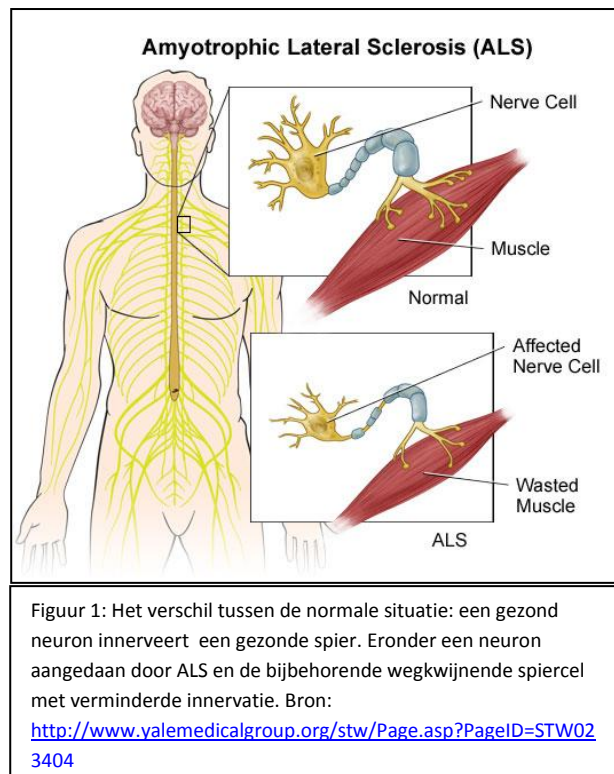
Amyotrofe lateraal sclerose, vaak afgekort tot ALS, is een neurodegeneratieve ziekte die ervoor zorgt dat de innervatie van bijna alle spiergroepen een voor een uitvallen. Er zijn nog maar weinig aanwijzingen over de oorzaak, of oorzaken, voor het ontstaan van ALS. Gelukkig houdt dit de biomedische- en farmaceutische wereld niet tegen om het onderzoek naar ALS voort te zetten. Deze zoektocht begint nu eindelijk haar vruchten af te werpen. Er is geconstateerd dat een eiwit, superoxide dismutase, mogelijk grote invloed heeft op het ontstaan en het verloop van ALS. De laatste 20 jaar zijn er enorm veel resultaten en onderzoeken verschenen. Daarmee is dit het uitgelezen moment voor een uiteenzetting over de mogelijke relatie tussen het enzym superoxide dismutase en de neurodegeneratieve ziekte ALS.

ALS is voor het eerst officieel beschreven in 1874 door Jean-Martin Charcot. De ziekte heeft daarom ook een tijdje bekend gestaan als de ziekte van Charcot. (Rowland en Shneider 2001) Een andere benaming voor ALS, vooral veel gebruikt in de Verenigde Staten, is Lou Gherig's disease. Dit omdat de bekende Lou Gherig, honkballer bij de New York Yankees, in de jaren 40 van de vorige eeuw aan deze ziekte leed en hier aan is overleden. De naam voor ALS bevat de woorden amyotroof, lateraal en sclerose. "Amyotroof" wat duidt op spier atrofie, spierzwakte en de spiertrekkingen, die duiden op een aandoening aan de lagere motor neuronen. "Laterale sclerose" verwijst naar het verschijnsel dat zich voordoet bij autopsie van ALS patiënten: verharding van de lateraal gelegen banen van het ruggenmerg. (Rowland en Shneider 2001)

Er zijn vele andere neuromusculaire aandoeningen die lijken op ALS, zoals het Kennedy syndroom, X chromosoom gebonden spinobulbaire spier atrofie, cervicale spondylotische myelie en myastenia gravis. Dat er zoveel vergelijkbare syndromen zijn, is een van de redenen die de diagnose ALS zo moeilijk te stellen maakt. Er zijn geen onderzoeken die met 100% zekerheid kunnen aantonen dat een levende patiënt aan ALS lijdt, en niet aan een van de hiervoor genoemde ziektes. (Rowland en Shneider 2001) Het mechanisme van ALS is dat de motor neuronen die gelegen zijn in de ventrale hoorn van het ruggenmerg afsterven, zodat de innervatie van vele spieren vermindert of verdwijnt. Hierdoor ontstaat een snelle afname/atrofie van de spieren wat leidt tot verlamming. Het cognitief functioneren van de patiënten wordt echter niet of nauwelijks aangetast door ALS, de patiënten maken dus alles bewust mee. (Beckman, Estevez et al. 2001)

## Symptomen

De symptomen die karakteristiek zijn voor ALS zijn spierzwakte en verlamming. Mensen die lijden aan ALS zullen in het begin van hun ziekte vaak eerst zwakte in de handen en/of voeten ervaren. Bij nader onderzoek worden er bijna altijd afwijkingen in zowel lagere motor neuronen, in het ruggenmerg, als in hogere motor neuronen, in de hersenschors gevonden. Denk hierbij voor lagere motor neuronen afwijkingen aan spiertrekkingen, zwakte en afgenomen of verdwenen reflexen. (Rowland, Shneider 2001) Ook zijn er dus symptomen die duiden op een aandoening aan de hogere motor neuronen zoals spasticiteit, voetzool reflex volgens Babinski en verlies van de fijne motoriek.



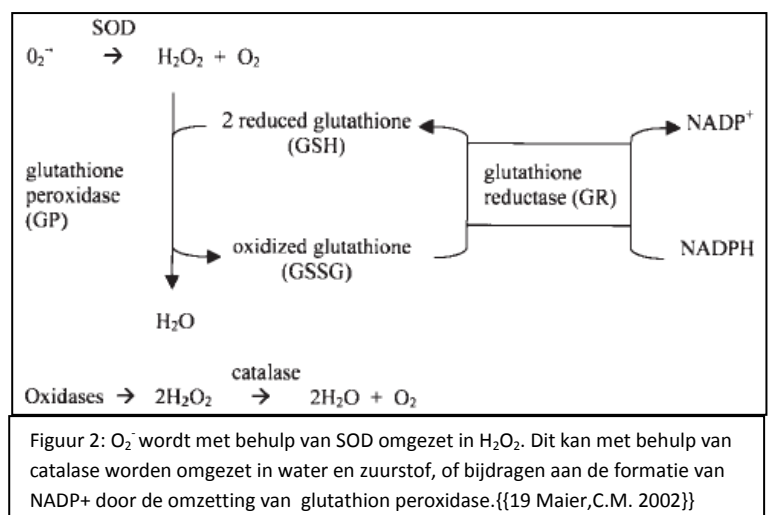
Het is belangrijk te vermelden dat zowel lagere als hogere motor neuron afwijkingen aanwezig moeten zijn om de diagnose ALS te kunnen stellen. (Rowland 1998) Behalve de aanwezigheid van deze symptomen zijn er nog andere aanwijzingen die in de richting van ALS kunnen wijzen. Ten eerste de leeftijd van de patiënt, de leeftijdsgrens van 20 jaar wordt aangehouden als ondergrens. Deze grens wordt aangehouden omdat slechts 5% van de ALS gevallen zich openbaart voor het 30<sup>e</sup> levensjaar. Hierna neemt de frequentie waarmee ALS voorkomt toe naarmate de leeftijd vordert. Ten tweede zijn er sterke vermoedens dat lichaamsbouw en leefstijl invloed hebben op het ontstaan van ALS. In de uitgevoerde onderzoeken het grote merendeel van de patiënten hun hele leven dun en zeer sportief zijn geweest. Ten slotte zijn er nog andere tekenen die op ALS duiden: het verloop van de ziekte moet progressief zijn, er zijn geen verbeteringen of plateaufases waarneembaar (waarmee het zich onderscheidt van bijvoorbeeld MS). Alle patiënten met ALS hebben last van zwakte en de meesten ook van spiertrekkingen. Ook kan het voorkomen dat de patiënt last heeft van pseudobulbaire verlamming, veroorzaakt door een laesie in de witte stof die de hersenstam met de cortex verbindt ( cortico-bulbaire tractus), waardoor slikken en praten moeilijker wordt en de patiënt last kan krijgen van emotionele uitbarstingen. (Rowland 1998) Ten slotte zullen op het elektromyogram (EMG) van elke ALS patiënt sporen van denervatie zichtbaar moeten zijn. (Wilbourn 1998)

### Oorzaak

De grootste wetenschappelijke vraag bij ALS is de uitdaging hoe, of waardoor, de ziekte wordt veroorzaakt. Er zijn hiervoor verschillende theorieën en modellen bedacht, maar voor hier op verder te gaan is het vereist om een onderscheid te maken tussen de subtypen van ALS. ALS kan verdeeld worden in 2 subgroepen: de sporadische groep ALS patiënten (SALS) en de familiale, of erfelijke, groep ALS patiënten (FALS). De FALS groep beslaat ongeveer 10% van alle ALS gevallen. (Synofzik, Ronchi et al. 2012) Het is deze groep waar de onderzoekers hun hoop voor een aanwijzing voor de oorzaak en misschien een aanwijzing voor de genezing op richten. FALS houdt in dit geval dus in dat de patiënten in deze groep genetische predispositie hebben voor het ontwikkelen van ALS. Een van de meest bekende mutaties in deze groep is een mutatie op het gen dat codeert voor superoxide dismutase-1 (SOD1). De cijfers over de prevalentie van deze mutatie variëren. Er zijn onderzoeken waarbij er vanuit wordt gegaan dat de mutatie bij 12-23% bij de FALS- en 2-3% bij de SALS patiënten aanwezig is, (Liscic, Breljak 2011) maar ook onderzoeken die er vanuit gaan dat de mutatie op het gen voor SOD1 zelfs ongeveer 6% van alle ALS gevallen veroorzaakt. (Synofzik, Ronchi et al. 2012). Aangezien de SOD1 mutatie een van de meest onderzochte mutaties voor ALS is, zal deze scriptie grotendeels over de bevindingen/resultaten op dit gebied gaan. Er worden echter ook nog andere mogelijke oorzaken en mechanismes besproken, die al dan niet beïnvloed worden door SOD1 en haar mutaties.

### Superoxide dismutase

Voor een duidelijk beeld van de pathologie van ALS en SOD1, moet eerst duidelijk zijn wat de werking van superoxide dismutase (SOD) is. Zoals algemeen bekend is hebben bijna alle levende organismen zuurstof nodig. Zuurstof, symbool O, is het achtste element en heeft een vrij elektron wat het reactief maakt. Deze eigenschap zorgt ervoor dat zuurstof potentieel gevaarlijk is voor alle organismen. Dit effect wordt enigszins geneutraliseerd doordat zuurstof bijna nooit als enkel atoom voorkomt maar meestal bestaat uit een paar: O<sub>2</sub>. Zuurstof is zeer



Figuur 2: O<sub>2</sub><sup>-</sup> wordt met behulp van SOD omgezet in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dit kan met behulp van catalase worden omgezet in water en zuurstof, of bijdragen aan de formatie van NADP<sup>+</sup> door de omzetting van glutathion peroxidase. {{19 Maier,C.M. 2002}}

belangrijk in levende organismen vanwege de rol die het speelt in het vrijmaken van energie door middel van verbranding. Deze verbranding vindt gedeeltelijk plaats in het cytoplasma. Maar verreweg het grootste deel van de verbranding vindt plaats in de mitochondriën. Vervolgens wordt zuurstof hier gebruikt in een proces dat bekend staat als oxidatieve fosforylering. Hierbij worden stoffen zoals glucose en vetten geoxideerd zodat er energie vrijkomt waarmee adenine trifosfaat (ATP) gevormd kan worden. Normaliter verloopt dit proces zonder problemen. Het kan echter voorkomen dat enkele van deze zuurstof moleculen in aanraking komen met een vrij elektron waardoor ze worden veranderd in een superoxide anion ( $O_2^-$ ). Dit molecuul is een radicaal, wat wil zeggen dat het met bijna alles zal gaan reageren. Het is deze eigenschap die zuurstof zo gevaarlijk maakt voor levende organismen. Dit omdat superoxide veel schade aan cellulaire structuren en het DNA kan aanrichten, waardoor mutaties kunnen ontstaan. De natuur heeft verschillende afweermechanismes tegen superoxide. Een van deze mechanismes, die in veel van de bekende organismen voorkomt, is SOD. SOD is een enzym dat er voor zorgt dat 2 superoxide moleculen en 2 waterstof ionen worden omgezet tot het stabielere waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) en een zuurstof atoom. (McCord en Fridovich 1969) Zonder tussenkomst van SOD gebeurt dit ook, maar in een veel lager tempo. (Maier en Chan 2002) Superoxide is niet alleen maar schadelijk. Het kan dienen als signaalstof, is een belangrijke stof in het immuunsysteem en is op zijn beurt weer nodig in de energiehuishouding bij de formatie van NADP+ zoals te zien is in figuur 2. In dit figuur is te zien dat er ook enzymen zijn die waterstofperoxide omzetten in water en zuurstof. Dit is nodig omdat juist waterstofperoxide in staat is tot het activeren van andere sterkere radicalen zoals het hydroxyl radicaal ( $\cdot OH$ ), wat nog sterkere schadelijke eigenschappen heeft dan  $O_2^-$ . (Maier en Chan 2002)

### SOD-1

De belangrijkste eigenschap van het enzym SOD is dus het 'vangen' en omzetten van zuurstof radicalen (ROS), deze om te zetten zodat andere enzymen ermee aan de slag kunnen en op hun

	CuZnSOD	MnSOD	ECSOD
Location	Cytosol	Mitochondria	Extracellular space
Molecular weight	32,000	88,000	120,000
Structure	Dimer	Tetramer	Tetramer
Metals, g-atoms/subunit	Cu 1, Zn 1	Mn 1	Cu 1, Zn 1
Chromosome	21 (human)	6 (human)	?
	16 (mouse)	17 (mouse)	5 (mouse)
Gene description	SOD1	SOD2	SOD3

CuZn, copper, zinc; SOD, superoxide dismutase; Mn manganese; EC, extracellular.

Tabel 1: de 3 superoxide dismutases die bekend zijn in zoogdieren. {{19 Maier,C.M. 2002}}

beurt weer om kunnen zetten tot onschadelijke moleculen. Er zijn binnen de zoogdieren 3 verschillende vormen van SOD bekend. Zij verschillen onderling erg van elkaar, zoals te zien is in tabel 1. Om verwarring te voorkomen zijn de SODs genummerd: CuZnSOD wordt SOD1 genoemd, MnSOD wordt SOD2 genoemd en ECSOD wordt SOD3 genoemd. Zoals al eerder is gesteld zijn er aanwijzingen die duiden op een verband tussen SOD1 en ALS. SOD1 is een dimeer, bestaat uit 153 aminozuren en bevindt zich binnenin de cellen in het cytosol. Ook wordt SOD1 aangetroffen in cellulaire structuren als de peroxisomen en de nucleus. Hoewel het een klein eiwit is met een relatief laag moleculair gewicht, beslaat het met een concentratie van ongeveer 10  $\mu M$  een grote fractie van de hoeveelheid eiwitten in de cel. SOD bevat metaal atomen om superoxides aan te trekken. In het geval van SOD1 zijn dit een koper en een zink atoom. Het koper atoom bevindt zich op de zogenaamde "active site" van het enzym, en trekt hier de superoxides naartoe zodat deze verwerkt kunnen worden tot minder schadelijke producten. Zink speelt een minstens zo belangrijke rol alleen is nog niet geheel bekend hoe dit mechanisme in zijn werk gaat. Wat wel bekend is met betrekking tot de rol van zink, is dat het verlies van zink grote effecten heeft op de functionaliteit van het enzym. Mocht zink verdwijnen uit SOD1 dan wordt het toxisch voor (motor) neuronnen. (Maier en Chan 2002)

### SOD mutaties

SOD1 bestaat dus uit slechts 153 aminozuren. SOD1 is een klein maar efficiënt eiwit en dus kunnen mutaties hierin verstrekkende gevolgen hebben. Op dit moment is bekend dat er 40 plekken in het eiwit zijn, waar mutaties tot instabiliteit van de "eiwit backbone" leiden. Als deze backbone instabiel

wordt zal de vorm van het eiwit veranderen, en daardoor zal het zijn functie minder goed of zelfs helemaal niet meer kunnen uitvoeren. Verder zijn er nu ongeveer 90 mutaties van het SOD eiwit bekend. De meeste hiervan zijn missence punt mutaties, wat inhoudt dat er door verandering van 1 base een ander aminozuur in de sequentie wordt ingebouwd. Ook zijn er enkele deleties en inserties in de C-terminal regio bekend die allemaal de stabiliteit van het eiwit kunnen veranderen. (Beckman, Estevez et al. 2001) Een schematische weergave hiervan is te zien in figuur 3. De SOD mutaties in patiënten met erfelijke ALS zijn dominant. Dit wijst erop dat het hier waarschijnlijk om een toxische gain-of-function mutatie gaat en niet om het verdwijnen van de eigenschap van SOD om superoxides aan te trekken. (Brown 1996) Eerder zijn de percentages van het aantal ALS gevallen die veroorzaakt wordt door een SOD1 mutatie gegeven 2 -3 %. Dit houdt dus in dat 97-98% van alle ALS gevallen niet door een mutatie op SOD1 of op andere antioxidante afweersystemen zoals SOD2 of SOD3 wordt veroorzaakt. Men zou dus kunnen twijfelen aan de relevantie voor het onderzoek naar SOD mutaties. Dit is hoeft echter niet zo te zijn, aangezien de gevallen van ALS die veroorzaakt worden door SOD1 mutaties qua ziektebeeld en verloop erg veel lijken op de overgebleven 98% van de ALS gevallen. Hierdoor zou het mogelijk kunnen zijn dat SOD toch een sleutelfunctie in het ziekteproces van ALS kan hebben en het onderzoek bij deze relatief kleine groep patiënten dus wel degelijk zinvol is. (Beckman, Estevez et al. 2001)

### Toxiciteit van SOD mutaties

Er zijn dus aanwijzingen dat de mutaties van SOD zorgen voor een gain-of-function, wat inhoudt dat het eiwit een nieuwe eigenschap verwerft die eerder niet aanwezig was. Welke nieuwe functie het enzym door deze mutaties krijgt is echter niet geheel duidelijk. Alleen duidelijk is dat deze een toxisch effect op (motor)neuronen kan hebben. Dit komt waarschijnlijk omdat neuronen veel gebruik maken van superoxides en omdat neuronen over het algemeen niet meer opnieuw worden aangemaakt als ze eenmaal zijn afgestorven. Er zijn verschillende theorieën over de oorzaak van de toxiciteit van SOD mutaties. Een van de oudste theorieën stelt dat de toxiciteit wordt veroorzaakt doordat SOD mutanten de nitratie van tyrosine, veroorzaakt door peroxynitriet ( $\text{ONOO}^-$ ), stabiliseren. De nitratie van tyrosine zorgt ervoor dat 3-nitrotyrosine gevormd wordt. Deze omzetting van tyrosine tot 3-nitrotyrosine kan ervoor zorgen dat er een conformatieverandering van een eiwit plaatsvindt waardoor de functie van dit eiwit zou kunnen veranderen. Een voorbeeld hiervan zijn de neurofilamenten. Nitratie van tyrosine in de neurofilamenten zorgt voor een conformatieverandering waardoor deze structureiwitten belemmerd worden in het uitvoeren van hun functie. (Beckman, Estevez et al. 2001) Ook bezit 3-nitrotyrosine de eigenschap om herhaaldelijk tyrosyl- en  $\text{NO}_2$  radicalen te vormen, die op hun beurt meer eiwitten in hun functie kunnen aantasten en oxidatieve schade aan kunnen richten. (Radi 2004) Er worden echter steeds meer aanwijzingen gevonden dat deze theorie niet voldoende is. (Estevez, Crow et al. 1999)

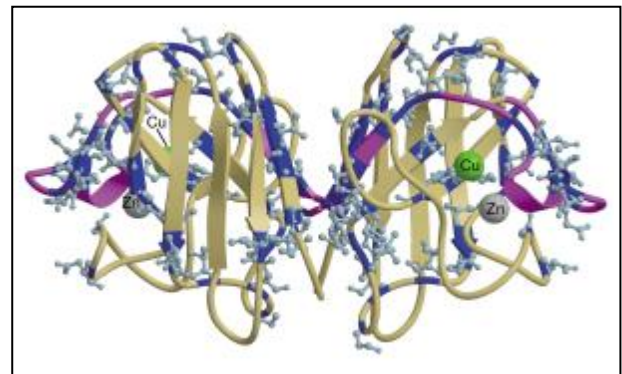


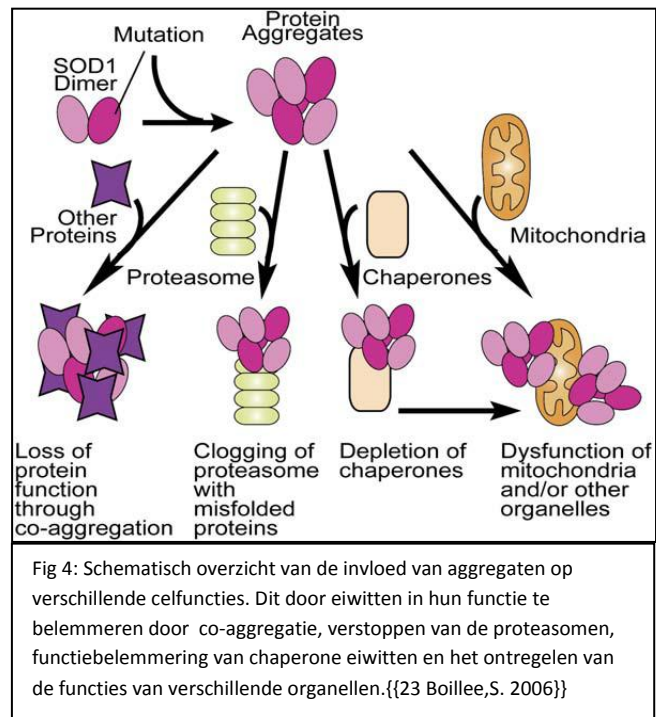
Fig 3: model van SOD1. Lichtblauw zijn de zijketens van mutant aminozuren, de donkerblauw zijn de plekken op de backbone waar mutatie plaatsvindt, paars is de terminal c regio en kan in sommige individuen helemaal weg gevallen zijn.{{11 Beckman,J.S. 2001}}

### Aggregatie

Een andere theorie, die op het moment meer geaccepteerd wordt dan de tyrosine nitratie theorie, stelt dat de toxiciteit van SOD mutaties niet afhankelijk is van oxidatieve stress, maar dat deze veroorzaakt wordt door eiwit aggregatie. (Beckman, Estevez et al. 2001) Bewijzen voor deze theorie zijn onder meer gevonden in onderzoeken gedaan op transgene muizen. Hieruit bleek dat er in dit muismodel geen verband was tussen SOD en de progressie van ALS. Het maakte hier voor de

progressie van de ziekte namelijk niet uit of er geen SOD, of een zesvoud van de normale concentratie SOD aanwezig was. (Bruijn, Houseweart et al. 1998) Dit bevestigt de bewering dat de werking van SOD dus niet zoveel invloed op het ziekteverloop heeft als gedacht. Andere onderzoeken richten zich op de eiwitaggregaten die worden aangetroffen in de motorneuronen van ALS patiënten. Zo zijn er studies gedaan waaruit men concludeerde dat de hoeveelheid aggregaten van niet-oplosbare SOD1 eiwitten het meest aanwezig waren tijdens de symptomatische fase. (Boillee, Vande Velde et al. 2006) Dit doet vermoeden dat de hoeveelheid aggregatie verband houdt met de mate van motorneuron sterfte. Ondanks het vele onderzoek dat op dit gebied is uitgevoerd, zijn er nog veel onduidelijkheden en onzekerheden over deze aggregatie theorie. Men is er zelfs nog niet zeker van of de aggregaten op zichzelf wel toxisch zijn. Zo is er het tot nu toe nog onverklaarde geval van de variant van een SOD mutatie gevonden . Bij deze SOD mutatie is op plek 4 het aminozuur alanine, vervangen voor een valine (A4V). Deze mutatie zorgde in het muismodel wél voor aggregatie van SOD, maar veroorzaakte geen motorneuron sterfte en dus ook geen symptomen . (Beckman, Estevez et al. 2001) Een van de meest curieuze waarnemingen bij deze mutatie is dat deze bij muizen relatief weinig schade aanricht, terwijl deze bij mensen juist een zeer agressief verloop van de ziekte lijkt te veroorzaken. (Boillee, Vande Velde et al. 2006) Een andere opvallende waarneming is gedaan bij ander neuronaal weefsel zoals neuronen in de hippocampus en neuronen in de ganglia van de dorsale wortel van het ruggenmerg. Het opvallende bij deze weefsels is het feit dat deze weefsels een vergelijkbaar niveau van SOD activiteit hebben met motorneuronen, maar geen aggregatie vertonen. (Boillee, Vande Velde et al. 2006)

Mogelijke verklaringen voor de invloed die de eiwitaggregaten op verschillende processen in de cel hebben zijn te zien in een overzicht in figuur 4. Men vermoedt dat aggregaten de proteasomen verhinderen om goed te functioneren. Dit komt waarschijnlijk omdat de aggregaten het eiwit ubiquitine bevatten, wat een target is voor verwerking in de proteasomen. Omdat ubiquitine aanwezig is in de aggregaten worden deze naar de proteasomen getransporteerd, waardoor ze 'verstopt' kunnen raken. (Boillee, Vande Velde et al. 2006) Men is er echter nog niet zeker van of de verstopping van de proteasomen nu een oorzaak of een gevolg is van de aggregatie. Dit omdat voor beide standpunten aanwijzingen zijn gevonden. (Boillee, Vande Velde et al. 2006) Zo is in een bepaalde muis lijn met de G93A (Glycine voor Alanine op plek 93)



mutatie, waarbij sprake was van een hoge mate van aggregatie, aangetoond dat zelfs voordat er symptomen aanwezig waren, de activiteit van de proteasomen werd 'gedownreguleerd'. (Kabashi, Agar et al. 2004) Terwijl er in een andere lijn muizen met dezelfde mutatie (G93A), maar met een lagere mate van aggregatie juist werd geconstateerd dat de activiteit van de proteasomen toegenomen was. (Puttaparthi en Elliott 2005) Verder kunnen de aggregaten de activiteit van chaperonne eiwitten belemmeren en de functie van organellen als mitochondria, Golgi systemen en het endoplasmatisch reticulum ontregelen. (Boillee, Vande Velde et al. 2006)

Aggregaten zijn bij verschillende varianten van de SOD1 mutaties gevonden en komen niet voor bij gezonde wildtype SOD1 individuen. Het is wel zo dat wildtype SOD1 kan bijdragen aan de aggregatie als er ook mutant SOD1 in het spel is, maar wildtype SOD1 is hiervoor echter geen vereiste. (Bruijn, Houseweart et al. 1998) Er zijn verbanden aangetroffen tussen het moment waarop de eerste symptomen tot uiting komen en de aanwezigheid van de aggregaten. De aggregaten verschijnen

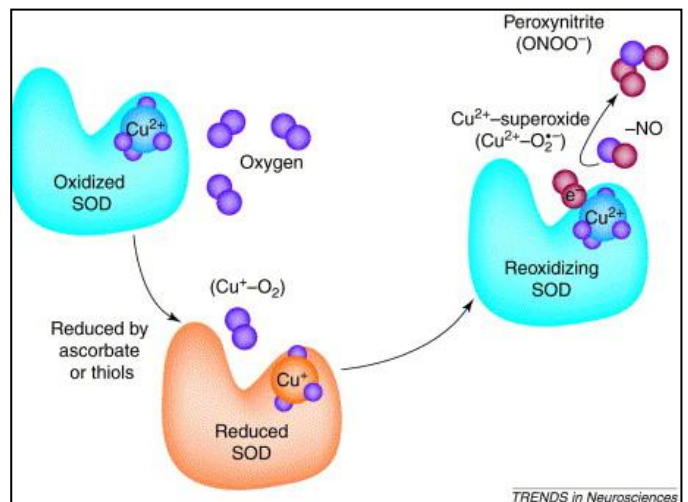
rond de tijd waarop de eerste symptomen zich openbaren, wat op een verband zou kunnen duiden. Geconstateerd is dat de hoeveelheid aggregaten toeneemt naarmate de ziekte vordert en ook dat dit alles zo lijkt te zijn voor verschillende types SOD1 mutanten. (Bruijn, Houseweert et al. 1998)

De aggregaten kunnen echter niet de enige oorzaak zijn voor de dood van de motorneuronen. Dit omdat kenmerkende processen voor ALS, zoals accumulatie van neurofilamenten waardoor het "slow axonaal transport systeem" verstopt raakt (Maier en Chan 2002), al 5 maanden voordat de aggregaten verschijnen kunnen worden aangetoond. (Bruijn, Houseweert et al. 1998)

#### *De rol van metalen in toxiciteit*

Zoals eerder verteld, bevat SOD1 de metaalionen koper en zink. Deze zijn beide belangrijk voor de antioxidante eigenschappen van het SOD1 eiwit. Omdat deze ionen cruciaal zijn voor het correct functioneren, is veel onderzoek gedaan naar de redox eigenschappen van SOD1. En ook of er een verband bestaat tussen deze eigenschappen en ALS. (Estevez, Crow et al. 1999) Uit deze onderzoeken bleek dat ook de mutante vormen van SOD1 correct kunnen vouwen en dat ze een geheel functionerend eiwit kunnen vormen. Dit gegeven zou een verklaring kunnen zijn voor het verschil van de leeftijd waarop de eerste symptomen zichtbaar worden. (Beckman, Estevez et al. 2001)

Toch blijkt dat, ondanks dat de vouwing van het eiwit vergelijkbaar is met het wildtype, sommige mutante SOD1 versies de metaalionen minder goed kunnen binden. Door deze verminderde affiniteit voor de metaalionen, ontstaat de situatie waarin veel SOD1 enzymen hun zink ionen hebben verloren en zich gaan ophopen in de cel. De reden dat alleen zink van het eiwit verdwijnt en koper op zijn plek blijft zitten, is dat de binding tussen koper en de SOD1 backbone sterker is dan die van zink. De binding tussen zink en SOD1 is zelfs in wildtype SOD1 al 7000 keer zo zwak als de binding tussen koper en SOD1. (Beckman, Estevez et al. 2001) Dus als een mutatie de affiniteit van de backbone voor het zink ion nog verder vermindert zal deze losraken en een niet functionerend SOD1 achterlaten. De eliminatie van zink uit het eiwit zorgt er zelfs voor dat de redox eigenschappen zo veranderen dat SOD1 zelf superoxides gaat produceren. Zoals weergegeven in figuur 5. Door het verlies van zink krijgt SOD de eigenschap om elektronen van andere antioxidanten (o.a. ascorbaat) te stelen, waardoor er een reductie van het koper optreedt. Dit houdt in dat het koper atoom een extra elektron opneemt waardoor de netto lading van het atoom veranderd van 2+ naar +1. Vervolgens staat het gereduceerde koper



Figuur 5: Het normaal groene SOD1 is naar blauw verkleurd door het verlies van zink. Reductie treedt op door het stelen van een elektron van thiolen of van ascorbaat, wat er voor zorgt dat SOD1 kleurloos wordt. De blauwe kleur keert langzaam terug doordat koper het elektron afstaat aan zuurstof waardoor superoxide wordt gevormd. Dit superoxide helpt bij de formatie van peroxynitriet. (Beckman, J.S. 2001)

gedurende een periode van enkele minuten het extra elektron weer af aan een zuurstof molecuul, waardoor er superoxide gevormd wordt. (Beckman, Estevez et al. 2001) Deze langzame vorming van superoxide is op zichzelf niet schadelijk voor de cel omdat er zelfs in het geval van een mutatie nog genoeg functionerende SOD en andere antioxidanten zijn om dit superoxide te elimineren. Het probleem is echter dat dit superoxide een razendsnelle interactie aangaat met stikstof oxide (NO). Deze interactie is zo snel dat het kan concurreren met de snelheid waarmee 'gezond' SOD1 superoxide oppikt. Dit komt onder andere doordat stikstof oxide een erg klein molecuul is, waardoor het soms al op de active site van SOD, bij het koper atoom, aan het superoxide kan binden. Door deze binding kan het schadelijke peroxynitriet ontstaan waardoor verdere oxidatieve schade kan



ontstaan.(Estevez, Crow et al. 1999) De reductie van SOD1, en daarmee de vorming van peroxynitriet, komt ook gewoon voor bij wildtype SOD1. Dit gebeurt echter in een veel lager tempo omdat SOD1 zonder zink tot wel 3000 keer zo snel elektronen van andere antioxidanten steelt, in vergelijking met wildtype SOD1. Wildtype SOD1 onderdrukt dus de reductie van mutant SOD1 en formatie van peroxynitriet niet, wat een verklaring zou kunnen zijn voor het feit dat overexpressie van wildtype SOD1 geen bescherming biedt tegen de toxiciteit die de mutanten met zich meebrengen.(Beckman, Estevez et al. 2001)

### **Invloed van SOD1 op andere eiwitmechanismes**

Er zijn steeds meer aanwijzingen die in de richting wijzen dat SOD1 een cruciaal onderdeel voor elke cel en in het bijzonder voor motorneuronen is. Dit omdat motorneuronen door hun hoge activiteit veel superoxide produceren. SOD1 gaat veel interacties aan met verschillende moleculen maar kan ook andere eiwitten en hun werkingsmechanismes beïnvloeden. Een voorbeeld hiervan is het SMN eiwit. SMN staat voor **S**urvival of **M**otor **N**euron en speelt een belangrijke rol in de ziekte spinale musculaire atrofie (SMA). SMA en ALS lijken erg op elkaar omdat er ook bij spinale SMA sprake is van spieratrofie en –zwakte door degeneratie van de spinale motorneuronen. (Kariya, Re et al. 2012) Een verschil is echter dat men wel weet waardoor SMA wordt veroorzaakt, namelijk een homozygote mutatie in het SMN1 gen. Door deze mutatie wordt SMN minder aangemaakt. Omdat ALS en SMA zoveel op elkaar lijken zijn er vermoedens dat SMN ook invloed kan hebben op de mechanismes die zorgen voor motor neuron sterfte in ALS. Zo is reeds aangetoond dat de expressie van SMN, in een bepaalde muizenstam met een mutante vorm van SOD1, lager is dan in niet aangedane individuen. (Turner, Parkinson et al. 2009) Ook heeft men waargenomen dat mensen die een verlaagd SMN niveau hebben, meer kans hebben of zelfs ‘vatbaarder’ zijn voor ALS en dat bij deze mensen het verloop van ALS heviger is.(Veldink, Kalmijn et al. 2005) SMN komt voor in het cytoplasma en in de nucleus en functioneert als een “housekeeping” eiwit. In de nucleus co-lokalisert het zich samen met de zogenaamde Cajal bodies. Men denkt dat deze Cajal bodies samen met SMN verantwoordelijk zijn voor de rijping van “ribonuclear protein”(RNP) en de modificatie van sn RNA.( Kariya, Re et al. 2012) De co-lokalisatie van SMN en de Cajal bodies wordt aangestuurd door een eiwit genaamd coiline. Mutant SOD1 hindert,waarschijnlijk, de interactie tussen het SMN en coiline. Wat de afname van SMN die is waargenomen in muizen, zelfs voordat de eerste symptomen van ALS zich aandienen, zou kunnen verklaren. Om uit te vinden of er een verband is tussen het ontstaan van ALS en SMN, is er een onderzoek gedaan waarbij het effect van overexpressie van SMN op ALS werd onderzocht. Hieruit bleek dat overexpressie van SMN in de spinale motorneuronen leidde tot bescherming tegen het verlies van spinale motorneuronen, minder verlies van SMN uit het complex met de Cajal bodies en een verlenging van de ziektevrije periode. Helaas bleek dat er uiteindelijk nog steeds denervatie van de skeletspieren optrad en dat de muizen nog steeds stierven aan de gevolgen van ALS. (Kariya, Re et al. 2012) Al deze gegevens zijn niet genoeg om met zekerheid te zeggen dat er een verband is tussen mutant SOD1 en SMN. Wel blijkt uit het onderzoek gedaan door Kariya et al. dat mutant SOD1 een sterk ontregelend effect heeft op de SMN pathway en dat SMN en zijn pathway in de toekomst wellicht kunnen helpen de oorzaak voor ALS op te sporen.

### **SOD en de mitochondriën**

De invloed van SOD1 stopt niet bij moleculen en eiwitten, maar reikt zelfs tot aan celorganellen als de mitochondria. Bekend is dat de mitochondriën een belangrijke rol spelen bij het vrijmaken van energie. Aangezien motorneuronen enorme hoeveelheden energie nodig hebben om hun taak uit te voeren, zijn ze extra kwetsbaar voor de gevolgen van een afwijkende werking van de mitochondriën. In gezonde individuen bevindt SOD1 zich vooral in het cytoplasma (tabel 1), maar er is gebleken dat een klein deel van de SOD1 moleculen zich ook in de mitochondriën bevindt. (Carri, Cozzolino 2011) Het is eigenlijk zeer logisch dat een deel van de SOD1 populatie zich in de mitochondriën bevindt, aangezien dit een van de grootste producenten van superoxides in de cel is.(Cozzolino, Ferri et al. 2012) Niet alleen SOD1 blijkt naar de mitochondriën te lokaliseren, ook mutant SOD1 bezit deze

eigenschap. En helaas heeft mutant SOD1 ook hier weer een ontregelende werking. Mutant SOD1 lokaliseert vaak meer naar de mitochondriën dan wildtype SOD1. Eenmaal in de mitochondriën zorgt de pro-oxidante omgeving er samen met de mutaties voor dat mutant SOD1 zich verkeerd gaat vouwen en gaat aggregeren. (Cozzolino, Ferri et al. 2012) Deze twee verschijnselen zouden ervoor kunnen zorgen dat de mitochondriën gaan bijdragen aan de degeneratie van de motorneuronen. Er zijn waarnemingen gedaan in de cellen van ALS patiënten waarbuit bleek dat de mitochondriën zelf gedegenerereerd waren, een veranderde structuur hadden en waren opgenomen in zogenaamde Bunina lichaampjes, een van de weinige histologische kenmerken van ALS. (Carri en Cozzolino 2011) De degeneratie van de mitochondriën wordt op gang gebracht doordat mutant SOD1 autofagie activeert (mitofagie). Normaliter is dit een goede ontwikkeling en draagt het bij aan de overleving van de cel, maar expressie van mutant SOD1 activeert ook het eiwit PTEN-induced kinase (PINK). PINK is een eiwit dat de mechanismes van mitofagie kan moduleren en er zo voor kan zorgen dat de beschadigde en misvormde mitochondriën niet door mitofagie worden opgeruimd. Dit heeft weer als gevolg dat er grote hoeveelheden calcium vrij kunnen komen, waardoor de desbetreffende cel over zal gaan tot apoptose. Ook bevatten de mitochondriën verschillende andere stoffen die een cel kunnen aanzetten tot apoptose, en ook deze stoffen kunnen samen met het calcium vrijkomen. (Carri en Cozzolino 2011) De vraag blijft echter of deze veranderingen in de mitochondriën een oorzaak kunnen zijn voor ALS of dat de veranderingen zelf veroorzaakt worden door ALS. Wat in ieder geval gezegd kan worden is dat lokalisatie van mutant SOD1 naar de mitochondriën in ieder geval zorgt voor verandering in werking van mitochondriën en dat dit mogelijk kan leiden tot degeneratie van de motorneuronen. (Carri en Cozzolino 2011)

### **SOD en de andere cellen van het centraal zenuwstelsel**

Tot nu toe is alleen de rol die SOD1 en mutant SOD1 spelen in de neuronen besproken, en dan vooral de motorneuronen. Maar neuronen zijn niet de enige cellen die aanwezig zijn in het centrale zenuwstelsel. Er zijn nog vele andere cellen, maar de belangrijkste en meest voorkomende cellen zijn de astrocyten en de microglia. De astrocyten hebben als voornaamste taak de neuronen te verzorgen, ze bieden steun en zorgen dat de neuronen van alle voeding- en groeistoffen voorzien worden. De microglia kunnen worden gezien als de neuroimmuun cellen van het centrale zenuwstelsel en deze cellen verzorgen dus de afweer van het centrale zenuwstelsel. Ze kunnen zowel beschadiging als bescherming van hersenweefsel bevorderen. Er zijn dus veel interacties tussen deze cellen en de neuronen. Ook in deze cellen komt de mutatie van SOD1 voor en er is gebleken dat de mutatie ook deze verschillende types cellen ontregeld. Er is zelfs gebleken dat de mutaties in zowel de neuronen als de ondersteunende cellen aanwezig moet zijn om ALS tot stand te kunnen brengen. Het zou zelfs zo kunnen zijn dat een SOD1 mutatie in het neuron, maar niet in de omliggende cellen, niet tot ziekte zou kunnen leiden, maar het omgekeerde wel. (Barbeito, Pehar et al. 2004)

#### *Astrocyten*

Astrocyten zijn de meest voorkomende cellen in het centrale zenuwstelsel en voorzien de neuronen van steun. Dit doen ze in de vorm van fysieke steun, metabolische ondersteuning en trofische ondersteuning. Ook spelen ze een actieve rol in het moduleren van de prikkelbaarheid en uitscheiding van neurotransmitters van de neuronen. Onderzoek bij muizen van verschillende mutante SOD1 lijnen heeft aangetoond dat astrocyten door de aantasting van motorneuronen bij ALS leidt tot proliferatie en hypertrofie van de astrocyten. Dit proces wordt ook wel gliosis genoemd. Door deze gliosis ondergaan deze astrocyten verschillende morfologische veranderingen waardoor ook hun manier van functioneren verandert. Ten eerste is er een afname van glutamaat transporters waar te nemen. Door deze afname kunnen de astrocyten minder goed glutamaat opnemen. De afname van deze glutamaat transporters wordt waarschijnlijk veroorzaakt door oxidatieve stress, wat weer in verband staat met de mutatie van SOD1. Het gevolg van deze afname in transporters is dat de extracellulaire concentratie van glutamaat toeneemt. Dit komt overeen met de waarneming dat veel ALS patiënten een verhoogde concentratie van glutamaat in hun spinale liquor hebben. Ook

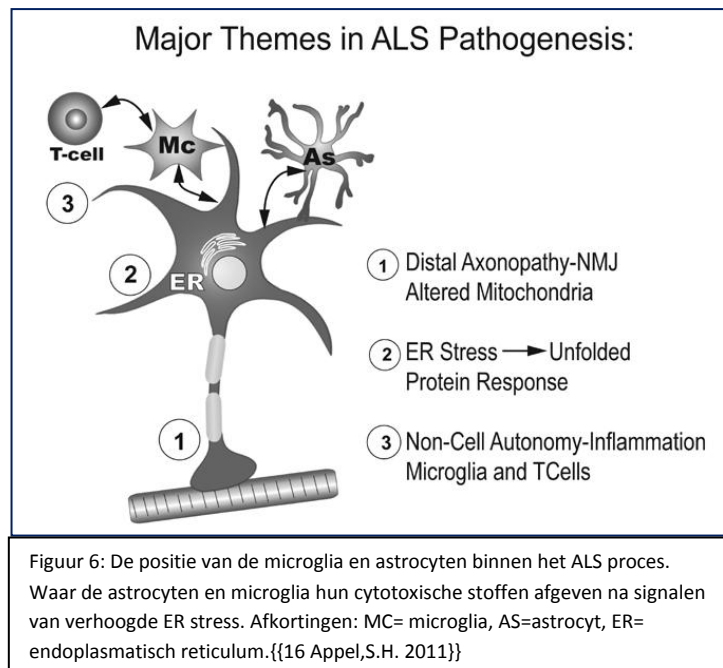
ondersteunt dit de hypothese dat excitotoxiciteit, veroorzaakt door glutamaat, kan bijdragen aan de degeneratie aan motorneuronen. (Barbeito, Pehar et al. 2004) Ten tweede verandert de afgifte van cytokines zoals interleukines en andere cytokines die ontstekingsreacties initiëren. Door de verhoogde afgifte van cytokines als interleukine-6 en TNF $\alpha$ , worden alle cellen van het centrale zenuwstelsel gevoeliger voor factoren die apoptose induceren. Ook kunnen de cytokines de werking van de NMDA receptoren voor glutamaat veranderen, zodat ook via deze weg excitotoxiciteit kan optreden. Ironisch genoeg bleek dat de cytokines er in muizen met SOD1 mutaties vooral voor massale astrocyt sterfte zorgden, waardoor de neuron op hun beurt ook kwetsbaarder werden. Ten derde blijkt dat astrocyten van patiënten met ALS meer zuurstof- en stikstofradicalen gaan produceren, en hierdoor dus nog meer bijdragen aan neuron sterfte. Dit omdat, zoals al eerder uitgelegd is, de interactie tussen mutant SOD1 en deze radicalen zorgt voor de vorming van peroxy-nitriet. Ten slotte produceren de geactiveerde astrocyten meer apoptotische factoren zoals FasL en TNF $\alpha$ . Of deze factoren cellen aanzetten tot apoptose ligt aan het gen expressie patroon van die cel. Helaas blijkt ook hier weer dat mutante vormen van SOD1 zoals G93A en G85R er voor zorgen dat cellen, en vooral neuron, gevoeliger zijn voor onder andere Fas. (Barbeito, Pehar et al. 2004)

### Microglia

De microglia dragen, net als de astrocyten, bij aan de totstandkoming van de ontstekingsreacties in het centraal zenuwstelsel. In

muizenstammen met mutant SOD1 en in patiënten met ALS is een verandering waar te nemen in de cellen die de afweer verzorgen. In beide bleek er sprake te zijn van neuroinflammatie en toegenomen activiteit van de microglia, dendritische cellen en CD4 en CD8 T-cellen. Ook is in het onderzoek bij deze muizen gebleken dat een SOD1 mutatie in alleen de neuron niet genoeg was om de ziekteverschijnselen van ALS teweeg te brengen. Ook mutatie van SOD1 in alleen astrocyten en microgliacellen leidde niet tot het ziektebeeld ALS. Om dus een 'echt' ziektebeeld te veroorzaken moeten zowel de neuron als de omliggende cellen aangedaan worden door de mutatie van SOD1. Door deze constatering lijkt het erop dat "niet

motorneuronen" een belangrijke rol spelen in de bescherming en overleving van motorneuronen. Microglia kunnen dus zowel een cytotoxische als een beschermende werking hebben. Welke van deze 2 taken wordt uitgevoerd hangt af van welke informatie de microglia ontvangen in de vorm van cytokines en andere signaalstoffen. Als mutant SOD1 dus zowel in de neuron als in de omliggende cellen aanwezig is, zullen er minder factoren zijn die de beschermende werking en meer factoren die de cytotoxische werking van de microglia promoten. Dit alles is onderdeel van een cascade die schematisch is weergegeven in figuur 6. In stap 1 is hier te zien dat er bij ALS veranderingen van de mitochondria optreedt, waardoor er onder andere meer calcium vrijkomt in de axonen van motorneuronen. Ook zwellen de axonen op waardoor axonaal transport van vesicles met onder andere neurotransmitters minder goed plaats kan vinden. Vervolgens kunnen de stoffen die zorgen dat de microglia hun beschermende karakter behouden minder goed geproduceerd en vervoerd worden. Dit zorgt er voor dat de microglia steeds minder neuroprotectief worden. De processen van stap 1 verhogen de druk op het ER waardoor er stoffen als caspases worden geproduceerd, die kunnen leiden tot apoptose. Ook zou het zo kunnen zijn dat een ER dat onder verhoogde stress staat



meer mutant SOD1 zou kunnen gaan produceren, wat het hele proces dus ook niet ten goede komt. Ten slotte zetten deze factoren uit het gestreste ER de microglia aan tot de afgifte van radicalen en pro-inflammatoire stoffen, waardoor de motorneuronen over zullen gaan tot apoptose. (Appel, Zhao et al. 2011)

### **SOD als target voor drug research**

Na al deze informatie is waarschijnlijk een beter en duidelijker beeld van de pathologie van ALS ontstaan. De biomedische wereld staat nooit stil en er wordt constant gezocht naar medicijnen die het verloop van de ziekte kan vertragen, stop kan zetten of in het ideale geval het ziekteproces weer kan omkeren. Een van de belangrijkste dingen waar men van doordrongen moet zijn, als er wordt gezocht naar een behandelmethode, is dat ALS een complexe ziekte is met vele verschillende factoren. Daarom is het ook niet waarschijnlijk dat ALS te behandelen is met een enkel medicijn. Op het moment zijn er verschillende medicijnen die op korte termijn enig resultaat boeken. Zij zijn vooral gericht op het vertragen van de ziekte. Voorbeelden hiervan zijn behandeling van muizen met een SOD1 mutatie die werden behandeld met SOD/katalase mimetica, waardoor oxidatieve stress verminderd werd en het leven van deze muizen werd verlengd. (Maier en Chan 2002) Of een toediening van een virus wat zorgde voor silencing van het SOD1 gen en leidde tot uitstelling van het begin van de ziekte en een trager verloop. Toediening van het neuroprotectieve middel rasagiline, wat motorisch functioneren bevordert en in combinatie met riluzol de overleving bevordert. Ook het gebruik van ceftriaxon heeft invloed op het ziekteverloop door motorneuron verlies uit te stellen, spierkracht te vergroten en het leven verlengde van muizen met de G93A mutatie. (Vincent, Sakowski et al. 2008) Verder heeft ook het antidiabetische middel pioglitazon een anti inflammatoire werking en verbetert het de spierkracht en zorgt het voor een grotere kans op overleving. Vervolgens blijkt dat het mangaanese porphyrine de overleving van de G93A muizen tot wel 3 keer kan verhogen. (Vincent, Sakowski et al. 2008) Al deze middelen zijn voorbeelden van middelen die enig effect hadden op muizen met ALS en enkele zijn zelfs gevorderd tot menselijke onderzoekstrials. Een ander probleem wat ervoor zorgt dat het vinden van een medicijn moeilijk verloopt is, dat de verhoudingen tussen de motorneuronen en de microglia en astrocyten er dynamisch is en dat deze verhoudingen veranderen tijdens de verschillende fases van ALS. Ten slotte is er nog een stof die een veelbelovende kandidaat blijkt te zijn voor de behandeling van ALS: insuline-like growth factor 1 (IGF1). Deze stof zou zoveel potentieel kunnen hebben omdat het een groeifactor is, en groeifactoren kunnen een neuroprotectief en een regeneratieve werking hebben op aangedane neuronnen. (Vincent, Sakowski et al. 2008)

### **Discussie**

De vraag die nu echter nog steeds blijft is of er wel echt een verband is aan te tonen tussen SOD1 en ALS. Helaas blijft deze vraag moeilijk te beantwoorden. Dit komt voornamelijk omdat ALS, zoals al gezegd, een ziekte is waarbij vele factoren een rol spelen. De stelling dat een mutatie van SOD1 dus de oorzaak is van ALS is dan ook onjuist. In deze scriptie zijn echter vele voorbeelden gegeven van aspecten die een rol spelen bij ALS, welke wel degelijk beïnvloed worden door de aanwezigheid van mutant SOD1. Alleen de aanwezigheid van mutante vormen van SOD1 op zichzelf beïnvloeden de cel al op een negatieve manier omdat de antioxidante eigenschappen van SOD1 door de mutatie worden ondermijnd. Het verlies van deze eigenschappen kan worden veroorzaakt doordat het enzym een andere vorm heeft gekregen omdat er een mutatie in de eiwit backbone aanwezig is. Ook kan het veroorzaakt worden door het verlies van een van de twee metaalatomen waardoor er geen superoxides meer kunnen worden aangetrokken, en SOD1 zelfs bijdraagt aan extra formatie van superoxide. Een andere schadelijke eigenschap die SOD1 verkrijgt door het muteren is dat het eiwit zich, zowel in het cytoplasma als de organellen, gaat ophopen tot aggregaten. Door deze aggregaten kunnen organellen als de mitochondria en het ER bloot komen te staan aan extra stress, waardoor er nog meer extra superoxide gevormd wordt. Dit alles is echter geen bewijs dat de mutant SOD1 aggregaten of het verlies van metaal atomen de directe oorzaak is van ALS, omdat er ook vormen

bekend zijn waar geen aggregaten voorkomen of waar nog steeds de benodigde metaalatomen aanwezig zijn.

Mutant SOD1 beïnvloedt niet alleen structuren in de cel maar ook verschillende mechanismes. Bijvoorbeeld de interacties tussen SOD1 en het eiwit SMN. Hiervan is bekend dat mensen met lagere concentraties SMN, meer kans hebben op het ontwikkelen van ALS. Ook kan toegenomen lokalisatie van mutant SOD1 de werkingsmechanismen van de mitochondria zo ontwrichten, dat deze niet meer in aanmerking komen voor autofagie. Het gevolg hiervan is dat de neuronen worden overstroomd door enorme hoeveelheden calcium en pro-apoptische stoffen, waardoor de neuronen overgaan tot apoptose.

Ten slotte is in deze scriptie de invloed van mutant SOD1 op de niet-neuronale cellen van het centraal zenuwstelsel behandeld. De aanwezigheid van mutant SOD1 heeft wederom een ontregelende werking op de cellen en hun werkingsmechanismen en zorgt ervoor dat de astrocyten en microglia bijdragen aan een situatie van bijna permanente neuroinflammatie. Mutant SOD1 zorgt ervoor dat de astrocyten en microglia hun beschermende taak steeds meer achterwege laten, en de toch al verzwakte motorneuronen uitschakelen om verdere omliggende schade te beperken.

Als men een therapie voor ALS zou willen bedenken, moet er rekening worden gehouden met de verschillende aspecten van deze verwoestende ziekte. Zo zijn de meeste processen in ALS die zorgen voor motorneuron sterfte negatieve spiralen die moeilijk te doorbreken zijn. Een ander probleem is dat ook niet alleen de motorneuronen genezen en beschermd moeten worden, maar ook de omliggende cellen zullen behandeld moeten worden. Dit vooral omdat is aangetoond dat ALS niet eens ontstaat als mutant SOD1 zich alleen in de motorneuronen bevindt.

Concluderend blijft de vraag of er een verband is aan te wijzen tussen SOD1 en ALS moeilijk te beantwoorden. Toch zijn er sterke aanwijzingen die duiden op een positief antwoord. Er is in ieder geval aangetoond dat mutant SOD1 betrokken is bij de vele processen die ontregeld zijn in individuen met ALS, maar niet in welke mate. Zo lijkt het erop dat wanneer de vorming van mutant SOD1 uitgesteld of verminderd wordt, de eerste symptomen van ALS zich ook later openbaren. Het geheel afwenden van de ziekte is tot op heden helaas nog niet gelukt. De vraag blijft echter of mutant SOD1 kan worden aangewezen als een van de oorzaken van ALS of dat de oorzaak toch ergens anders blijkt te liggen. De groep patiënten met familiale ALS die wordt veroorzaakt is immers maar een klein deel van alle ALS patiënten. Aangezien het ziektebeeld zo vergelijkbaar is met de overige ALS patiënten, ligt de sleutel tot het genezen van ALS wellicht toch verborgen in de processen die beïnvloed worden door SOD1.

## Referenties

- APPEL, S.H., ZHAO, W., BEERS, D.R. and HENKEL, J.S., 2011. The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*, **30**(1), pp. 4-8.
- BARBEITO, L.H., PEHAR, M., CASSINA, P., VARGAS, M.R., PELUFFO, H., VIERA, L., ESTEVEZ, A.G. and BECKMAN, J.S., 2004. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain research. Brain research reviews*, **47**(1-3), pp. 263-274.
- BECKMAN, J.S., ESTEVEZ, A.G., CROW, J.P. and BARBEITO, L., 2001. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends in neurosciences*, **24**(11 Suppl), pp. S15-20.
- BOILLEE, S., VANDE VELDE, C. and CLEVELAND, D.W., 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, **52**(1), pp. 39-59.
- BROWN, R.H., JR, 1996. Superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis: new insights into mechanisms and treatments. *Annals of Neurology*, **39**(2), pp. 145-146.
- BRUIJN, L.I., HOUSEWEART, M.K., KATO, S., ANDERSON, K.L., ANDERSON, S.D., OHAMA, E., REAUME, A.G., SCOTT, R.W. and CLEVELAND, D.W., 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science (New York, N.Y.)*, **281**(5384), pp. 1851-1854.
- CARRI, M.T. and COZZOLINO, M., 2011. SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **43**(6), pp. 593-599.
- COZZOLINO, M., FERRI, A., VALLE, C. and CARRI, M.T., 2012. Mitochondria and ALS: Implications from novel genes and pathways. *Molecular and cellular neurosciences*, .
- ESTEVEZ, A.G., CROW, J.P., SAMPSON, J.B., REITER, C., ZHUANG, Y., RICHARDSON, G.J., TARPEY, M.M., BARBEITO, L. and BECKMAN, J.S., 1999. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science (New York, N.Y.)*, **286**(5449), pp. 2498-2500.
- KABASHI, E., AGAR, J.N., TAYLOR, D.M., MINOTTI, S. and DURHAM, H.D., 2004. Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry*, **89**(6), pp. 1325-1335.
- KARIYA, S., RE, D.B., JACQUIER, A., NELSON, K., PRZEDBORSKI, S. and MONANI, U.R., 2012. Mutant superoxide dismutase 1 (SOD1), a cause of amyotrophic lateral sclerosis, disrupts the recruitment of SMN, the spinal muscular atrophy protein to nuclear Cajal bodies. *Human molecular genetics*, .
- LISCIC, R.M. and BRELJAK, D., 2011. Molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **35**(2), pp. 370-372.
- MAIER, C.M. and CHAN, P.H., 2002. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, **8**(4), pp. 323-334.
- MCCORD, J.M. and FRIDOVICH, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*, **244**(22), pp. 6049-6055.

- PUTTAPARTHI, K. and ELLIOTT, J.L., 2005. Non-neuronal induction of immunoproteasome subunits in an ALS model: possible mediation by cytokines. *Experimental neurology*, **196**(2), pp. 441-451.
- RADI, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(12), pp. 4003-4008.
- ROWLAND, L.P., 1998. Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, **160 Suppl 1**, pp. S6-24.
- ROWLAND, L.P. and SHNEIDER, N.A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine*, **344**(22), pp. 1688-1700.
- SYNOFZIK, M., RONCHI, D., KESKIN, I., BASAK, A.N., WILHELM, C., GOBBI, C., BIRVE, A., BISKUP, S., ZECCA, C., FERNANDEZ-SANTIAGO, R., KAUGESAAR, T., SCHOLS, L., MARKLUND, S.L. and ANDERSEN, P.M., 2012. Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS. *Human molecular genetics*, .
- TURNER, B.J., PARKINSON, N.J., DAVIES, K.E. and TALBOT, K., 2009. Survival motor neuron deficiency enhances progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neurobiology of disease*, **34**(3), pp. 511-517.
- VELDINK, J.H., KALMIJN, S., VAN DER HOUT, A.H., LEMMINK, H.H., GROENEVELD, G.J., LUMMEN, C., SCHEFFER, H., WOKKE, J.H. and VAN DEN BERG, L.H., 2005. SMN genotypes producing less SMN protein increase susceptibility to and severity of sporadic ALS. *Neurology*, **65**(6), pp. 820-825.
- VINCENT, A.M., SAKOWSKI, S.A., SCHUYLER, A. and FELDMAN, E.L., 2008. Strategic approaches to developing drug treatments for ALS. *Drug discovery today*, **13**(1-2), pp. 67-72.
- WILBOURN, A.J., 1998. Clinical neurophysiology in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: the Lambert and the El Escorial criteria. *Journal of the neurological sciences*, **160 Suppl 1**, pp. S25-9.