

Homeostáza mědi jako terapeutický cíl u amyotrofické laterální sklerózy s mutací superoxiddismutázy 1 a sloučenina CuATSM

Copper homeostasis as a therapeutic goal in amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in superoxide dismutase 1 and CuATSM molecule

Souhrn

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je progresivní neurodegenerativní onemocnění (ND) motoneuronů v mozkové kůře, mozkovém kmeni a míše vedoucí ke ztrátě svalové kontroly a úmrtí vlivem respiračního selhání většinou do 3–5 let od stanovení diagnózy. Většina případů ALS je sporadická (sALS), avšak 5–10 % tvoří případy familiární (fALS). Asi 20 % případů fALS a 2–7 % případů sALS je spojeno s mutací SOD1 genu, který kóduje enzym měď-zinek superoxiddismutázu 1 (SOD1). Nejběžnější volný radikál vznikající v lidském těle je málo reaktivní a tedy nikoliv příliš škodlivý superoxid mající však schopnost spontánní přeměny dismutací na peroxid vodíku. SOD1 tuto dismutaci urychluje a vzniklý peroxid vodíku je odstraňován navazujícími reakcemi. Mutace postihující SOD1 vedou k poruše homeostázy mědi v míše zvířecích (myších) modelů ALS. V současnosti je v Austrálii testována sloučenina Cu²⁺ diacetyl-di, N4-methylthiosemicarbazone v I/II fázi klinické studie u ALS pacientů. Předpokládá se, že tato molekula by mohla fungovat nejen u případů ALS s mutací SOD1 (SOD1-ALS) jako nosič mědi nebo zinku umožňující jejich interakci se SOD1, a tím správnou funkci enzymu, ale i jako sloučenina vycytávající peroxynitrit. Léčebný potenciál tedy není limitován pouze na SOD1-ALS či ALS obecně, ale jako sloučenina snižující poškození buněk oxidativním a nitrosativním stresem by mohla najít využití i při terapii dalších ND.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease of motor neurons in the cerebral cortex, brain stem, and spinal cord leading to loss of muscle control and death from respiratory failure occurring mostly within 3–5 years of the disease diagnosis. The majority of ALS cases are sporadic (sALS); however, 5–10% are familial cases (fALS). Approximately 20% of fALS cases and 2–7% of sALS cases are associated with a mutation in the SOD1 gene that encodes the copper-zinc superoxide dismutase 1 enzyme (SOD1). The most common free radical arising in the human body is a not very reactive, and thus, not a very harmful superoxide which, however, is capable of spontaneous conversion by dismutation to hydrogen peroxide. SOD1 accelerates this dismutation and the produced hydrogen peroxide is eliminated by successive reactions. The mutations affecting SOD1 lead to copper dyshomeostasis in the spinal cord of animal (mice) models of ALS. Currently, the Cu²⁺ diacetyl-di, N4-methylthiosemicarbazone molecule is being tested in Australia in a phase I/II clinical trial in patients with ALS. It is assumed that this molecule could work not only in cases of ALS with SOD1 mutation (SOD1-ALS) as a copper or zinc carrier allowing their interaction with SOD1, and thus, it's the proper function of the enzyme, but also as a compound for peroxynitrite uptake. As a result, its therapeutic use appears not to be limited only to cases of SOD1-ALS or ALS in general, but it might also have an effect as a compound to reduce cell damage by oxidative and nitrosative stress in other neurodegenerative diseases.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicinských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

P. Hemerková, M. Vališ

Neurologická klinika
LF UK a FN Hradec Králové



MUDr. Pavlína Hemerková
Neurologická klinika
LF UK a FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail:
pavlinahemerkova@seznam.cz



doc. MUDr. Martin Vališ, Ph.D., FEAN
Neurologická klinika
LF UK a FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: martin.valis@fnhk.cz

Přijato k recenzi: 7. 8. 2019

Přijato do tisku: 10. 12. 2019

Klíčová slova

amyotrofická laterální skleróza – měď-zinek superoxiddismutáza – Cu²⁺ diacetyl-di, N4-methylthiosemicarbazone

Key words

amyotrophic lateral sclerosis – copper-zinc superoxide dismutase – Cu²⁺ diacetyl-di, N4-methylthiosemicarbazone

Úvod

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je progresivní neurodegenerativní onemocnění (ND) motorických neuronů v mozkové kůře, mozkovém kmeni a míše vedoucí ke ztrátě svalové kontroly a úmrtí vlivem respiračního selhání ve většině případů do 3–5 let od stanovení diagnózy [1,2]. Většina případů ALS je sporadická (sALS), avšak přibližně 10 % tvoří případy familiární (fALS) [3]. Dosud bylo identifikováno více než 25 genů, jejichž mutace je spojena se vznikem fALS [4]. Nejčastější genetická příčina fALS je hexanukleotidová expanze genu *C9ORF72*, kterou nalézáme u 40 % pacientů s fALS, u 7 % pacientů se sALS, ale také u 25 % pacientů s familiární formou frontotemporální demence (fFTD) [5]. Obě tyto nemoci jsou nyní nově brány jako součást jednoho klinickopatologického spektra, TDP-43 proteinopatie, a jejich symptomy se mohou často do jisté míry prolínat. U přibližně 15 % pacientů s FTD se rozvine i ALS, naopak 5–22 % pacientů s ALS onemocní i FTD. Kognitivní dysfunkci typu FTD ale můžeme pozorovat téměř u 50 % pacientů s ALS [6,7]. Jako první gen, jehož mutace je spojena se vznikem fALS, byl detekován *SOD1* gen, který kóduje enzym měď-zinek superoxidodismutázu ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD1, dále jen SOD1). Bylo popsáno více než 170 různých mutací *SOD1*, které mohou být kauzálními pro přibližně 20 % fALS a 2–7 % sALS [8–10].

Fyziologická role superoxidodismutázy 1

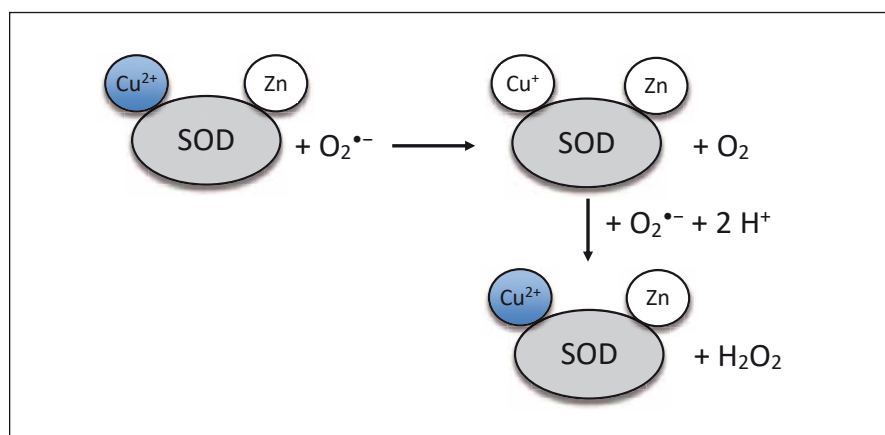
Nejběžnější volný radikál vznikající v lidském těle je málo reaktivní a relativně neškodný

superoxid schopný spontánní přeměny tzv. dismutací na peroxid vodíku, který je ihned odstraňován navazujícími reakcemi katalyzovanými katalázou a peroxidázou. Ze superoxidu ale mohou vznikat i další velmi škodlivé reaktivní formy kyslíku, jako jsou hydroxylový radikál, peroxynitrit či kyselina chlorná. Jelikož má hydroxylový radikál velmi krátký biologický poločas, neexistuje mechanismus jeho odstranění, a organizmy proto odstraňují již samotný superoxid. A právě k tomu slouží enzym SOD1 urychlující dismutaci superoxidu. SOD1, přítomná ve všech aerobních organizmech, se vyskytuje ve třech formách lišících se svým kofaktorem, tedy atomem kovu. Fylogeneticky mladší Mn^{2+} -SOD1 a Fe^{2+} -SOD1 se nachází v prokaryontech, prokaryotických řasách a protozoích. $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -SOD1 se nachází v buňkách eukaryotických organismů – rostlin i živočichů. Je to enzym dimerické struktury obsahující na každé z podjednotek jeden kovový atom zinku a mědi [11,12].

Navázáním zinku dochází ke stabilizaci struktury bílkoviny. Katalytická funkce enzymu, a tedy vylučování volných radikálů, závisí na přítomnosti mědi, která je k proteinu doručována pomocí chaperonu mědi pro SOD1 (copper chaperone for SOD1; CCS) [13–15]. Struktura a základní funkce SOD1 jsou shrnuty na obr. 1 [16]. V motoneuronu je enzym přítomen nejenom v cytoplasmě, ale také v intermembránovém prostoru mitochondrií. Kromě již zmíněné role při ochraně buňky před oxidativním stresem je SOD1 schopna i regulace genové exprese dalších proteinů a účastní se během axonového transportu mitochondrií z buněčného těla k synapsi (obr. 2) [17].

Porucha homeostázy mědi u neurodegenerativních onemocnění a role superoxidodismutázy 1

Měď se vstřebává v tenkém střevě, odkud se dostává do jater a do ledvin. V játrech je 65–90 % vstřebažené mědi navázáno na ceruloplasmin a takto uvolněno do krevního oběhu [18]. Hematoencefalickou bariéru (HEB) je ale schopen překonat jen zbytek volné, nenavázané mědi [19]. Kapiláry HEB jsou v těsném kontaktu s astrocyty exprimujícími metalotioneiny (MT), které plní úlohu měď-sekvestrujících proteinů. Z astrocytů jsou následně ionty mědi uvolňovány do neuronů [20,21]. Inkorporace mědi do buňky je zajišťována influxními proteiny – transportními proteiny mědi (CTR 1-3) a divalentním transportérem kovů (DMT 1). Při přebytku mědi v buňce je za její vyloučení zodpovědná adenosin trifosfatáza katalyzující hydrolyzu adenosin trifosfátu na adenosin difosfát a fosfát, ATPáza 7 A, která vzniklou energii využívá k aktivnímu pumpování nadbytečných molekul mědi ven z buňky [22,23]. Uvnitř buňky je měď prostřednictvím tří přenašečů, tzv. chaperonů mědi, doručována do Golgiho aparátu, cytochrom C oxidázy v mitochondriích a konečně SOD1 v cytoplasmě [24,25]. Doručení mědi do SOD1 závisí pouze na CCS a u myši s genetickou delecí CCS dochází k signifikantnímu poklesu enzymatické aktivity SOD1 [25,26]. Dříve se předpokládalo, že právě mutace způsobující ztrátu enzymatické aktivity SOD1 vedou ke vzniku ALS, nicméně enzymatická aktivita SOD1 zůstává u mnoha případů SOD1-ALS přibližně stejná jako u nemutovaného proteinu [27]. Obecně tedy mutace postihující SOD1 můžeme rozdělit do dvou typů. První skupinu tvoří tzv. wild-type like (WTL) mutace, u kterých je aktivita enzymu podobná nemutovanému. Druhá skupina je popisována jako tzv. metal-binding region (MBR) mutace, které vedou ke snížení katalytické aktivity enzymu [12]. Oba typy mutací ve svém důsledku vedou k narušení homeostázy mědi v míše zvířecích modelů ALS a k její intracelulární akumulaci [28,29]. Tato akumulovaná měď je ale nedostupná jednak pro SOD1, což vede k chybné agregaci proteinu, a navíc dochází i k ovlivnění dalších enzymů vázajících měď, jako je mitochondriální cytochrom c oxidáza [28,30]. Nadbytečná měď hraje roli spouštěče oxidativního stresu, lipidové peroxidace, apoptózy a formace SOD1 agregátů. Studie zabývající se poruchou homeostázy mědi u ALS většinou používají transgenní G93A-SOD1 myši. Jedná

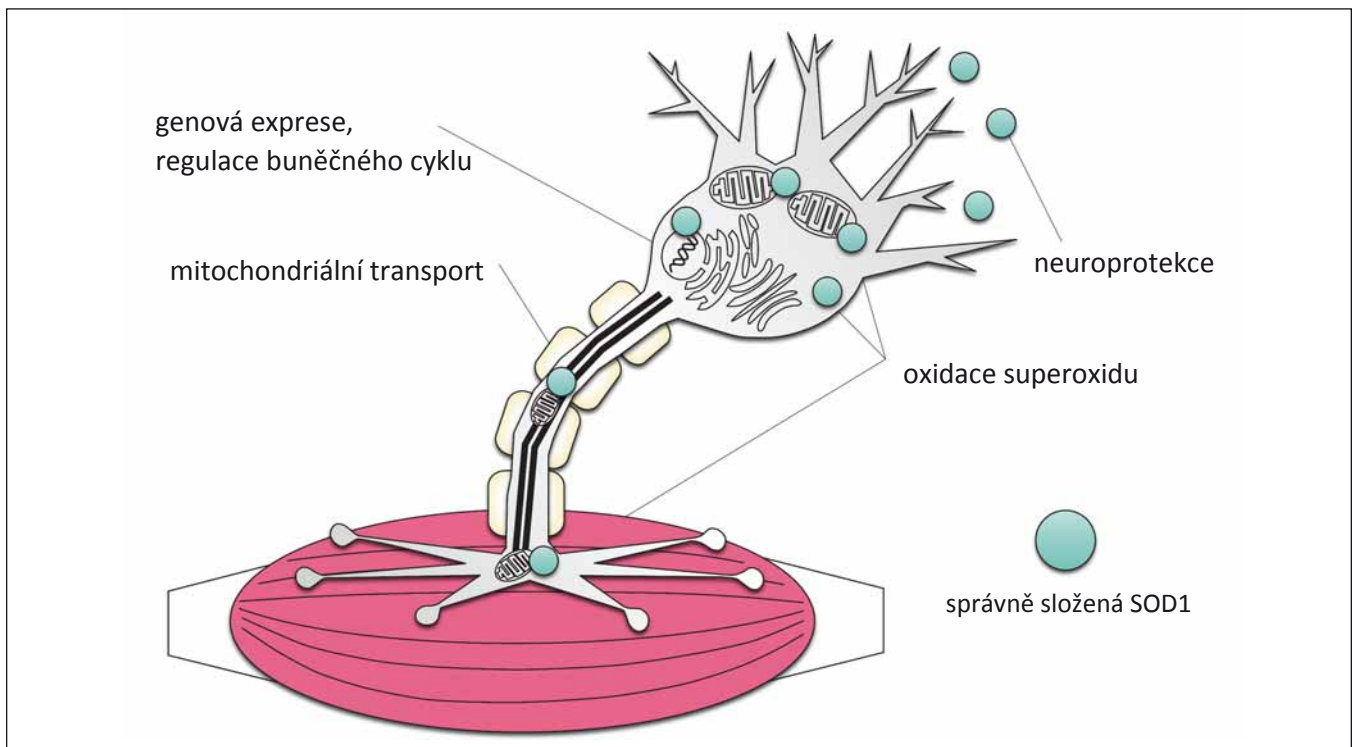


Obr. 1. Schéma struktury a funkce superoxidodismutázy 1 [16].

H_2O_2 – peroxid vodíku; $\text{O}_2^{\bullet-}$ – superoxid

Fig. 1. Diagram of structure and function of superoxide dismutase 1 [16].

H_2O_2 – hydrogen peroxide; $\text{O}_2^{\bullet-}$ – superoxide



Obr. 2. Funkce SOD1 v motorických neuronech [17].

SOD1 se nachází v cytoplasmě, na synapsi a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Rolí SOD1 je přeměna volných radikálů, zejména superoxidu O_2^- , čímž zmírňuje oxidativní stres. Je rovněž secernována extracelulárně a předpokládá se, že i zde má neuroprotektivní účinky. SOD1 je schopna změnit stav aktivace jiných proteinů, a tím i regulace genové exprese, proliferace a diferenciaci dalších proteinů. Studie zkoumající následky ztráty funkce enzymu prokázaly, že se SOD1 rovněž podílí na axonovém transportu mitochondrií k synapsi.

SOD1 – superoxidodismutáza 1

Fig. 2. Functions of SOD1 in motoneurons [17].

SOD1 is located in the cytoplasm, synapse and intermembrane space of mitochondria. The role of SOD1 role is to oxidize free radicals, notably superoxide O_2^- , thereby mitigating oxidative stress. It is also secreted and thought to have neuroprotective effects extracellularly. SOD1 can change the activation states of other proteins, thereby regulating gene expression, proliferation, and differentiation of other proteins. Loss of function studies have shown that SOD1 also participates in axonal trafficking of mitochondria to the synapse.

SOD1 – superoxide dismutase 1

se o model fALS s mutací SOD1, kde dochází k záměně glycinu za alanin v pozici 93. Terapeutické přístupy uvedené níže by ale mohly mít efekt i u sALS a dokonce i u dalších ND. I u pacientů se sALS totiž bývá hladina mědi zvýšena v séru, v motorickém kortexu i v likvoru, kde byly navíc naměřeny i zvýšené hladiny železa a hořčíku [31,32]. U některých pacientů se sALS byla zjištěna extrémně vysoká hladina zinku a mědi v likvoru dokonce před zhoršením motorických funkcí [33]. U nemocných s Parkinsonovu nemocí se mění množství mědi v substantia nigra [34]. Pro Alzheimerovu demenci je typické zvýšení množství mědi a zinku v placích amyloidu, ale naopak v některých částech neokortexu dochází k jejich depleci [35,36]. Není tedy s po-
divem, že mnohé výzkumné strategie léčby ND cílí právě na obnovení homeostázy mědi a ostatních těžkých kovů.

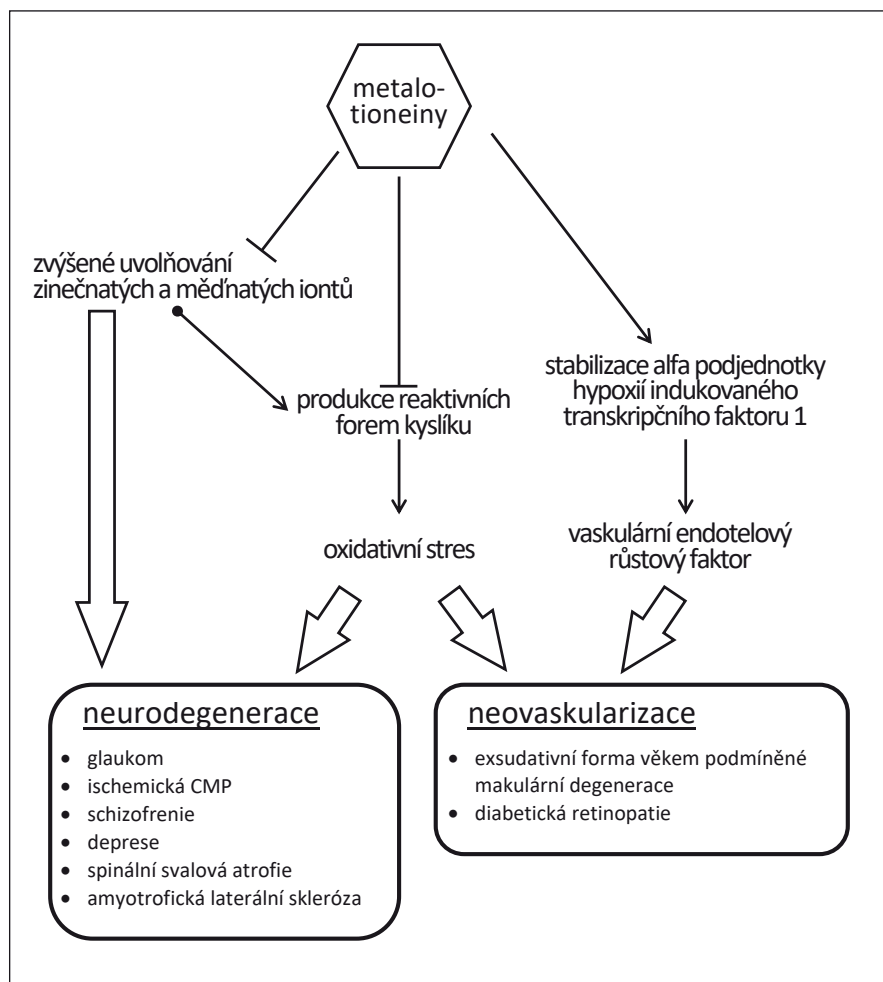
Chelatační terapie a homeostáza mědi

Chelatace je fyzikálně-chemický proces, při kterém dochází k navázání vícevazebných kationtů, např. kovů, na některé organické sloučeniny a k jejich vyloučení z organismu. S použitím myších modelů SOD1-ALS byla zkoušena chelatační terapie D-penicilaminem, trientinem a tetratiomolybdatem (TTM) [28,37–39]. Léčba všemi třemi chelátory měla za následek pozdější nástup onemocnění a prodloužení celkového přežití transgenických myší. TTM navíc zpomaloval progresi onemocnění, dokonce i pokud bylo podávání započato až v průběhu onemocnění a při léčbě došlo k redukci intracelulární mědi v míše G93A-SOD1 myší k normálním hladinám [28,39]. Podávání TTM vedlo i k prodloužení délky trvání onemocnění. Tento rozdíl v terapeutickém účinku jednot-

livých chelátorů bude pravděpodobně způsoben velmi dobrou schopností TTM procházet HEB i při periferním podání [39,40]. Tyto závěry jsou velmi slibné, nicméně žádné výsledky klinických zkoušek s TTM dosud publikovány nebyly.

Metalotioneiny a jejich vliv na homeostázu mědi

Dále se nabízí možnost ovlivnění intracelulární hladiny mědi prostřednictvím indukce exprese MT. MT jsou nízkomolekulární, intracelulární, na cystein velmi bohaté proteiny mající velkou afinitu k těžkým kovům [41]. Existují čtyři izoformy MT. MT-1 a MT-2 se vyskytují ve všech tkáních a právě tyto formy hrají důležitou roli ve zprostředkování homeostázy kovových iontů a při ochraně buněk CNS před oxidativním stresem, potlačování zánětu a apoptózy [42–45]. MT



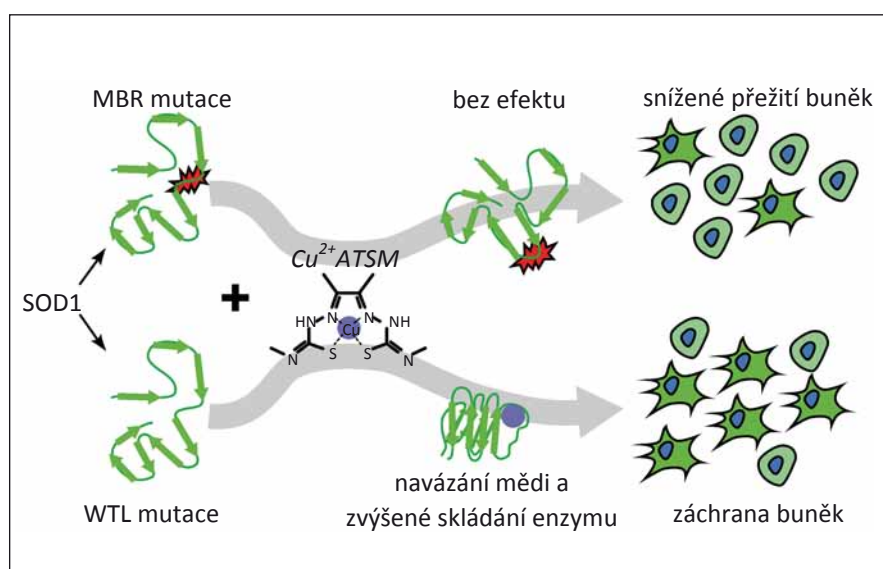
Obr. 3. Předpokládaný schematický mechanismus zapojení metalotioneinů do procesu neurodegenerace a neovaskularizace [46].

Metalotioneiny vážou kovové ionty, snižují produkci volných kyslíkových radikálů a působí tedy proti neurodegenerativním onemocněním. Zároveň podporují neovaskulární poruchy prostřednictvím stabilizace faktoru-1a indukovatelného hypoxií.

Fig. 3. Putative schematic mechanism of the involvement of metallothioneins in neurodegeneration and neovascularization [46].

Metallothioneins bind metal ions and inhibit reactive oxygen species production to protect against neurodegenerative diseases, and support neovascular disorders via stabilizing hypoxia inducible factor-1a.

jsou schopny i stabilizace transkripčního faktoru indukovaného hypoxií a podporují neovaskularizaci. Mohou hrát významnou roli i v rozvoji některých onemocnění (obr. 3) [46]. Tokuda et al prokázali, že k indukci MT-1 a MT-2 lze použít syntetický glukokortikoid dexametazon. K indukované expresi MT dochází v předních rožích míšních v astrocytech a mikroglia, nikoli však v motorických neuronech. U SOD1-ALS myši se při podávání dexametazonu významně prodloužily délka života i trvání onemocnění. Došlo i k významné redukcí G93A-SOD1 agregátů v astrocytech a mikroglia. Tyto výsledky korelují s předpokladem, že mutace SOD1 v neuronech ovlivňuje začátek/nástup onemocnění, zatímco přítomnost mutované SOD1 v astrocytech ovlivňuje rychlost progresu onemocnění [47,48]. Hashimoto et al zjistili, že expresi MT-1/-2 a dokonce i MT-3 v astrocytech u myších G93A-SOD1 modelů lze indukovat i fyzickou aktivitou [49]. Kromě ALS se zkoumá možný terapeutický potenciál indukce MT i u spinální svalové atrofie, onemocnění postihujícího pouze periferní motoneuron [46]. Předpokládá se i možný neuroprotektivní účinek MT při terapii ischemické CMP. MT, především izoforma MT-3, by svým antioxidantním účinkem mohly napomáhat záchraně buněk v ischemickém polostínu. Zde buňky nezanikají nekroticky jako v centru ischemie, ale porucha krevního průtoku nastartuje apoptickou kaskádu s fragmentací genomické deoxyribonukleové kyseliny a s ischemicko-reperfučním poškozením spojeným se vznikem reaktivních forem kyslíku [50,51].

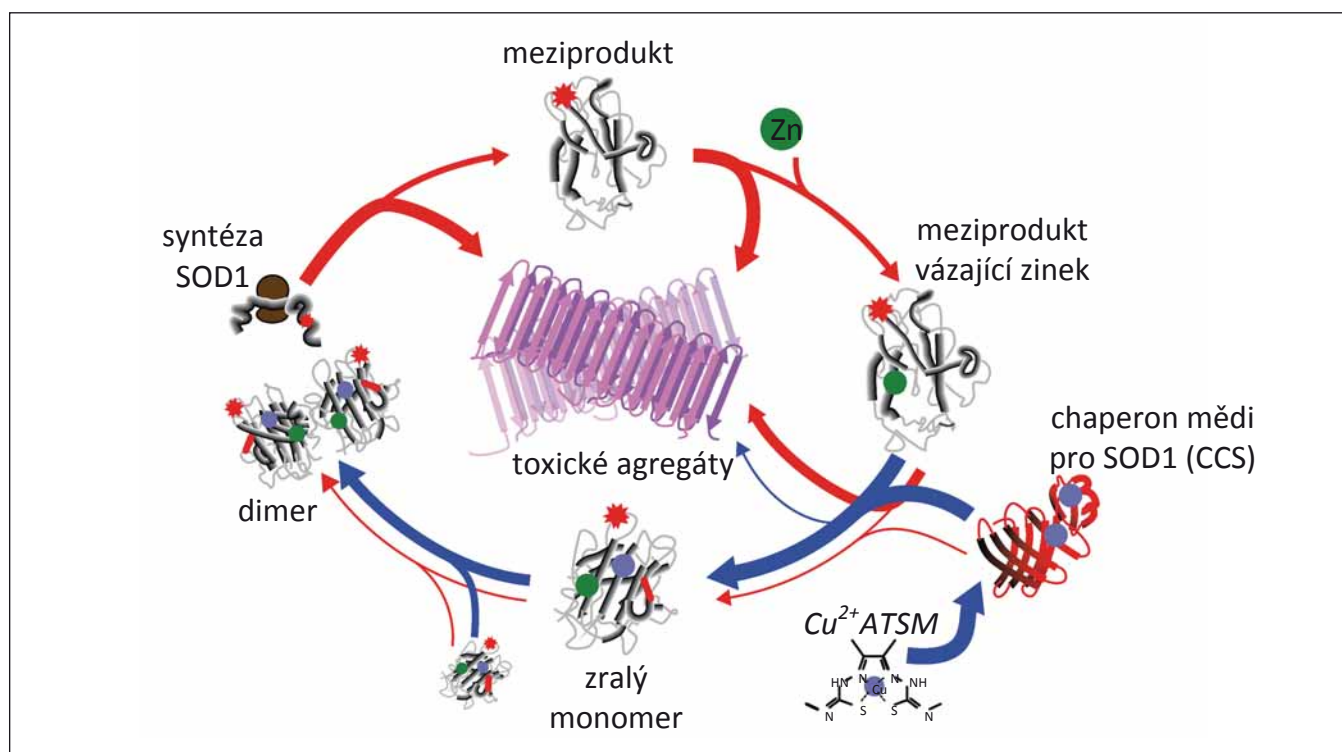


Obr. 4. CuATSM chrání před *in vitro* cytotoxicitou mutant WTL superoxididmutázy mědi a zinku, ale nikoli mutantů, které narušují vazbu kovů [54].

MBR – metal-binding region; SOD1 – superoxididmutáza 1; WTL – wild-type like

Fig. 4. CuATSM protects against the *in vitro* cytotoxicity of WTL copper-zinc superoxide dismutase mutants but not mutants that disrupt metal binding [54].

MBR – metal-binding region; SOD1 – superoxide dismutase 1; WTL – wild-type like



Obr. 5. Model zásahu CuATSM do patologie mutantní SOD1 [54].

Červené šipky znázorňují chybné skládání SOD1 a jejich následnou agregaci během syntézy enzymu, zatímco modré šipky ukazují, jak CuATSM dokáže tento proces ovlivnit. Tloušťka šipky koreluje s pravděpodobností znázorněného děje. Během syntézy se nejprve vytvoří meziprodukt (červená hvězda), který je připravený k navázání zinku. Poté dochází k asociaci s mědí pomocí CCS. Spojením s mědí dochází k vytvoření zralých monomerů, které se potom spojují v dimery tvořící funkční plnohodnotný enzym. Výsledkem CuATSM je větší množství mědi doručené k CCS, což vede k většímu přenosu mědi na SOD1, a tedy ke snížení množství SOD1, která by se v této fázi syntézy počala chybně skládat a agregovat.

CCS – chaperon mědi pro SOD1; SOD1 – superoxiddismutáza 1

Fig. 5. Model of CuATSM rescue of mutant SOD1 pathology [54].

Red arrows show the folding and off-folding pathways for SOD1, whereas blue arrows show the contribution of CuATSM to these pathways. The arrow thickness suggests the probability of the pathways occurring. Following synthesis, mutant SOD1 (red star) folds into an intermediate state that is primed for Zn binding. Zn-bound SOD1 associates with Cu-loaded CCS for transfer of Cu leading to the formation of a mature SOD1 monomer that can form dimers forming a functional full-fledged enzyme. CuATSM results in a larger pool of Cu-bound CCS, which in turn results in greater transfer of Cu to SOD1, reducing the amount of SOD1 that enters an off-folding pathway at this point.

CCS – copper chaperone for SOD1; SOD1 – superoxide dismutase 1

Superoxiddismutáza a CuATSM

V 60. letech 20. století byly u malé sloučeniny známé jako Cu^{2+} diacetyl-di, N4-methylthiosemicarbazon (CuATSM) popsány protinádorové účinky. Byla také popsána selektivní distribuce či retence této látky v hypoxických tkáních a v tkáních s oxidativním stresem a sloučenina našla svoje využití jako marker hypoxie při zobrazování tkání PET [52,53]. V současné době je tento komplex mědi v Austrálii testován v I/II fázi klinické studie u pacientů s ALS [54]. Předpokládá se, že sloučenina CuATSM by mohla mít terapeutický efekt nejen u SOD1-ALS jako nosič mědi nebo i zinku umožňující interakci těchto kovů se SOD1, a tím i její správnou funkci, ale i jako látka vychytávající pe-

roxynitrit. Léčebný účinek by se tedy mohl dostavit jak u případů SOD1-ALS či ALS obecně, tak i u dalších ND. Australští autoři Farrarwell et al v roce 2019 publikovali studii, ve které zkoumali efekt CuATSM na buněčných kulturách s buňkami exprimujícími deset různých SOD1-ALS mutací. Zjistili, že u WTL mutací, tedy u mutací, kde je zachována schopnost enzymu navázat měď či zinek, vede podávání CuATSM k doručení a navázání mědi k SOD1, což je doprovázeno správným skládáním enzymu, zvýšením aktivity SOD1, naopak snížením SOD1 agregace a v konečném důsledku záchranou buněk. U MBR mutací, tedy u mutací postihujících oblast kódující schopnost proteinu navázat měď či zinek, tento efekt pozorován

nebyl (obr. 4) [54]. I ve studii Robertse et al bylo u G37R-SOD1 myši detekováno velké množství měď-deficientní SOD1, které bylo následně sníženo podáváním CuATSM, přičemž množství $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ SOD1 se následně zvýšilo a došlo k prodloužení přežití myšičích modelů i zlepšení jejich motorického výkonu [55]. Zdá se tedy, že nadměrná exprese patogenních WTL SOD1 mutantních forem vede ke vzniku měď-pozbývajících forem SOD1, které se potom chybně skládají a agregují (obr. 5) [54]. Stejný mechanismus působení CuATSM předpokládají i Mc Allum et al, kteří navíc efekt CuATSM srovnávali s riluzolem, prozatím jediným léčivem běžně užívaným v ČR při léčbě ALS, inhibujícím glutamatergní transmissi a prodlu-

žujícím přežití nemocných přibližně o pouhé 3 měsíce. Podávání CuATSM v jejich studii také prodloužovalo přežití a zlepšovalo motorické funkce transgenních G37R-SOD1 myši, přičemž efekt byl závislý na dávce. Zatímco nejvyšší testovaná dávka CuATSM prodloužila přežití o celých 26 %, při terapii riluzolem se jednalo pouze o 3,3 % a zlepšení motorických funkcí nebylo pozorováno vůbec [56]. Mc Allum et al se zabývali otázkou, zda také doručení zinku k SOD1 pomocí Zn²⁺ATSM bude mít obdobný terapeutický efekt. I transgenní G37R-SOD1 myši při podávání Zn²⁺ATSM vykazovaly zlepšení motorických funkcí i delší přežití. Biochemická analýza jejich míšňí tkáně ale ukázala, že množství celkového zinku i množství zinku navázaného na SOD1 zůstalo stejné, avšak došlo k elevaci celkového množství mědi i mědi navázané na SOD1. Další experimenty prokázaly, že při podávání Zn²⁺ATSM v přítomnosti mědi dochází k tzv. transmetalaci, tedy k výměně kovu za kov [57]. Zinkem a jeho rolí v patogenezí SOD1-ALS se zabývali Ermilova et al. Vycházeli z předpokladu, že dieta prostá zinku povede ke zvýšení frakce zinek-deficientní SOD1, což bude vést k chybnému skládání, agregaci a akumulaci enzymu, a tudíž k akceleraci progresu onemocnění, a naopak suplementace zinkem v potravě bude působit protektivně. Prokázali, že podávání malých dávek zinku opravdu vede k prodloužení přežití G93A-SOD1 myši, avšak výsledky nebyly statisticky významné. Podávání vysokých dávek zinku ale vedlo naopak k výrazné akceleraci průběhu onemocnění, pravděpodobně vlivem zhoršeného vstřebávání mědi. Nicméně dá se předpokládat, že mírná perorální suplementace zinkem by mohla vést k redukci rizika vzniku ALS v rodinách s potenciálními mutacemi SOD1 genu [58]. Vieira et al se zabývali otázkou, zdali efekt CuATSM a ZnATSM opravdu závisí právě na přítomnosti kovových iontů a ATSM hraje roli přenašeče zvyšujícího interakci těchto kovů se SOD1 nebo jde o efekt samotné molekuly ATSM. V jejich studii byly znovu použity G93A-SOD1 myši. Při léčbě CuATSM opět docházelo k opožděnému nástupu příznaků nemoci i k prodloužení délky jejího trvání, ale při terapii samotnou molekulou ATSM žádný efekt pozorován nebyl [52]. Poněkud odlišný efekt působení CuATSM předpokládají autoři Soon et al. Ti ve své studii CuATSM opět podávali G93A-SOD1 myším, přičemž léčba měla zase za následek signifikantní prodloužení přežití, a to i při započatí podávání až po objevení se prvních příznaků onemocnění.

Autoři předpokládají, že CuATSM funguje jako efektivní vychytávač peroxynitritu, který spouští oxidativní stres [59]. Peroxynitrit, schopný indukce apoptózy motoneuronů, vzniká reakcí superoxidu s oxidem dusnatým a je odpovědný za hydroxylaci a nitraci aminokyseliny tyrozinu, ale i mnohých dalších proteinů. Nesporná je i jeho role v aktivaci mikroglie a astrocytů vedoucí k rozvoji neuroinflamace účastníci se v patogenezí nejen ALS, ale i neurodegenerace obecně. Jako scavenger volných radikálů funguje i další léčivo pro ALS pacienty již uvedené na trh, a to po více než 20 letech od zavedení léčby riluzolem. Jedná se o edaravon, který byl v roce 2015 registrován pro léčbu ALS v Japonsku a v Jižní Koreji a o 2 roky později i v USA [60].

Závěr

Přesná patogenese vzniku ALS i mnoha dalších ND zůstává stále nejasná. Většina případů těchto onemocnění je sporadická a mají multifaktoriální ráz. Nezbyvá tedy než hledat dílčí patogenetické mechanismy a terapeutické přístupy na ně se zaměřující. Při terapii ALS, ale i ostatních ND je pravděpodobně takovým jednotlivým patogenetickým dějem porucha homeostázy mědi a zcela jistě i působení oxidativního a nitrosativního stresu. Molekula CuATSM by mohla příznivě ovlivnit oba tyto etiopatogenetické činitele. Kauzální terapie ALS pravděpodobně nebude ještě dlouho dostupná, avšak je reálné, že brzy budeme moci našim pacientům nabídnout i další léčebné postupy než pouhou terapii riluzolem prodloužujícím přežití o několik měsíců a že budeme umět pomoci i tam, kde to zatím není možné.

Grantová podpora

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906) a UKPROGRES Q40. Financováno z projektu IT4Neuro(degeneration), reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010054.

Konflikt zájmů

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádný konflikt zájmů.

Literatura

1. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 3. doi: 10.1186/1750-1172-4-3.
2. Niedermeyer S, Murn M, Choi PJ. Respiratory failure in amyotrophic lateral sclerosis. *Chest* 2019; 155(2): 401–408. doi: 10.1016/j.chest.2018.06.035.
3. Alsultan AA, Waller R, Heath PR et al. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *DeGener Neurol Neuromuscul Dis* 2016; 6: 49–64. doi: 10.2147/DNND.584956.
4. Nguyen HP, Van Broeckhoven C, van der Zee J. ALS genes in the genomic era and their implications for FTD. *Trends Genet* 2018; 34(6): 404–423. doi: 10.1016/j.tig.2018.03.001.

5. Laferriere F, Polyimenidou M. Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss Med Wkly* 2015; 145: w14054. doi: 10.4414/SMW.2015.14054.
6. Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S et al. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology* 2003; 60(7): 1094–1097. doi: 10.1212/01.wnl.0000055861.95202.8d.
7. Strong MJ. The syndromes of frontotemporal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2008; 9(6): 323–338. doi: 10.1080/17482960802372371.
8. Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362(6415): 59–62. doi: 10.1038/362059a0.
9. Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 2016; 539(7628): 197–206. doi: 10.1038/nature20413.
10. Jackson M, Al-Chalabi A, Enayat ZE. Copper/zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation. *Ann Neurol* 1997; 42(5): 803–807. doi: 10.1002/ana.410420518.
11. Racek J. Superoxidodismutáza. [online]. Dostupné z URL: <https://www.krevnicentrum.cz/laboratorni-prirucka/BOJRAAL.htm>.
12. Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 563–593. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647.
13. Leinartaita L, Saraboji K, Nordlund A et al. Folding catalysis by transient coordination of Zn²⁺ to the Cu ligands of the ALS-associated enzyme Cu/Zn superoxide dismutase 1. *J Am Chem Soc* 2010; 132(38): 13495–13504. doi: 10.1021/ja1057136.
14. Banci L, Bertini I, Cantini F et al. Human superoxide dismutase 1 (hSOD1) maturation through interaction with human copper chaperone for SOD1 (hCCS). *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(34): 13555–13560. doi: 10.1073/pnas.1207493109.
15. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6049–6055.
16. Franco MC, Dennys CN, Rossi FH et al. Superoxide dismutase and oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. [online]. Available from URL: <https://www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/superoxide-dismutase-and-oxidative-stress-in-amyotrophic-lateral-sclerosis>.
17. Allison WT, DuVal MG, Nguyen-Phuoc K. Reduced Abundance and subverted functions of proteins in prion-like diseases: gained functions fascinate but lost functions affect aetiology. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10): E2223. doi: 10.3390/ijms18102223.
18. Zheng W, Monnot AD. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* 2012; 133(2): 177–188. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.006.
19. Choi BS, Zheng W. Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. *Brain Res* 2009; 1248: 14–21. doi: 10.1016/j.brainres.2008.10.056.
20. Scheiber IF, Dringen R. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochem Int* 2013; 62(5): 556–565. doi: 10.1016/j.neuint.2012.08.017.
21. West AK, Hidalgo J, Eddins D et al. Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* 2008; 29(3): 489–503. doi: 10.1016/j.neuro.2007.12.006.
22. Kuo YM, Zhou B, Cosco D et al. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(12): 6836–6841. doi: 10.1073/pnas.111057298.

23. Arredondo M, Muñoz P, Mura CV et al. DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(6): C1525–C1530. doi: 10.1152/ajpcell.00480.2002.
24. Hamza I, Prohaska J, Gitlin JD. Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(3): 1215–1220. doi: 10.1073/pnas.0336230100.
25. Wong PC, Waggoner D, Subramaniam JR et al. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(6): 2886–2891. doi: 10.1073/pnas.040461197.
26. Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J* 2004; 23(14): 2872–2881. doi: 10.1038/sj.emboj.7600276.
27. Gurney ME, Pu H, Chiu AY et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264(5166): 1772–1775. doi: 10.1126/science.8209258.
28. Tokuda E, Okawa E, Watanabe S et al. Dysregulation of intracellular copper homeostasis is common to transgenic mice expressing human mutant superoxide dismutase-1s regardless of their copper-binding abilities. *Neurobiol Dis* 2013; 54: 308–319. doi: 10.1016/j.nbd.2013.01.001.
29. Tokuda E, Okawa E, Ono SI et al. Dysregulation of intracellular copper trafficking pathway in a mouse model of mutant copper/zinc superoxide dismutase-linked familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2009; 111(1): 181–191. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06310.x.
30. Williams JR, Trias E, Beilby PR et al. Copper delivery to the CNS by CuATSM effectively treats motor neuron disease in SOD1(G93A) mice co-expressing the Copper-Chaperone-for-SOD. *Neurobiol Dis* 2016; 89: 1–9. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.020.
31. Domzał T, Radzikowska B. Ceruloplasmin and copper in the serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurol Neurochir Pol* 1983; 17(3): 343–346.
32. Gellein K, Garruto RM, Syversen T et al. Concentrations of Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Rb, V, and Zn in formalin-fixed brain tissue in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia complex of Guam determined by High-resolution ICP-MS. *Biol Trace Elem Res* 2003; 96(1–3): 39–60. doi: 10.1385/BTER:96:1-3:39.
33. Hozumi I, Hasegawa T, Honda A et al. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 2011; 303(1–2): 95–99. doi: 10.1016/j.jns.2011.01.003.
34. Genoud S, Roberts BR, Gunn AP et al. Subcellular compartmentalisation of copper, iron, manganese, and zinc in the Parkinson's disease brain. *Metallomics* 2017; 9(10): 1447–1455. doi: 10.1039/c7mt00244k.
35. Miller LM, Wang Q, Telivala TP et al. Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J Struct Biol* 2006; 155(1): 30–37. doi: 10.1016/j.jsb.2005.09.004.
36. Schrag M, Mueller C, Oyoyo U et al. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog Neurobiol* 2011; 94(3): 296–306. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.05.001.
37. Hottinger AF, Fine EG, Gurney ME et al. The copper chelator D-penicillamine delays onset of disease and extends survival in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 1997; 9(7): 1548–1551. doi: 10.1111/j.1460-9568.1997.tb01511.x.
38. Andreassen OA, Dedeoglu A, Friedlich A et al. Effects of an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, desmethylselegiline, trientine, and lipoic acid in transgenic ALS mice. *Exp Neurol* 2001; 168(2): 419–424. doi: 10.1006/exnr.2001.7633.
39. Tokuda E, Ono S, Ishige K et al. Ammonium tetrathiomolybdate delays onset, prolongs survival, and slows progression of disease in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2008; 213(1): 122–128. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.05.011.
40. Ogra Y, Suzuki KT. Targeting of tetrathiomolybdate on the copper accumulating in the liver of LEC rats. *J Inorg Biochem* 1998; 70(1): 49–55. doi: 10.1016/S0162-0134(98)00012-9.
41. Hozumi I, Asanuma M, Yamada M et al. Metallothioneins and neurodegenerative diseases. *J Health Sci* 2004; 50(4): 323–331. doi: 10.1248/jhs.50.323.
42. Piotrowski JK, Trojanowska B, Sapota A. Binding of cadmium and mercury by metallothionein in the kidneys and liver of rats following repeated administration. *Arch Toxicol* 1974; 32(4): 351–360. doi: 10.1007/BF00330118.
43. Richards MP. Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. *J Nutr* 1989; 119(7): 1062–1070. doi: 10.1093/jn/119.7.1062.
44. Murakami S, Miyazaki I, Sogawa N et al. Neuroprotective effects of metallothionein against rotenone-induced myenteric neurodegeneration in parkinsonian mice. *Neurotox Res* 2014; 26(3): 285–298. doi: 10.1007/s12640-014-9480-1.
45. Scheiber IF, Dringen R. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochem Int* 2013; 62(5): 556–565. doi: 10.1016/j.neuint.2012.08.017.
46. Nakamura S, Shimazawa M, Hara H. Physiological roles of metallothioneins in central nervous system diseases. *Biol Pharm Bull* 2018; 41(7): 1006–1013. doi: 10.1248/bpb.b17-00856.
47. Tokuda E, Watanabe S, Okawa E et al. Regulation of intracellular copper by induction of endogenous metallothioneins improves the disease course in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* 2015; 12(2): 461–476. doi: 10.1007/s13311-015-0346-x.
48. Ono SI. Metallothionein is a potential therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Pharm Des* 2017; 23(33): 5001–5009. doi: 10.2174/1381612823666170622105513.
49. Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T et al. Exercise induces metallothioneins in mouse spinal cord. *Neuroscience* 2009; 163(1): 244–251. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.067.
50. Eidzadeh A, Trendelenburg G. Focusing on the protective effects of metallothionein-I/II in cerebral ischemia. *Neural Regen Res* 2016; 11(5): 721–722. doi: 10.4103/1673-5374.182689.
51. Otevřel F, Smrčka M, Kuchtičková Š et al. Korelace ptiO₂ a apoptózy u fokální mozkové ischemie a vliv systémové hypertenze. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70(103(2): 168–173.
52. Vieira FG, Hatzipetros T, Thompson K et al. CuATSM efficacy is independently replicated in a SOD1 mouse model of ALS while unmetallated ATSM therapy fails to reveal benefits. *IBRO Rep* 2017; 2: 47–53. doi: 10.1016/j.ibror.2017.03.001.
53. Vávere AL, Lewis JS. Cu-ATSM: a radiopharmaceutical for the PET imaging of hypoxia. *Dalton Trans* 2007; (43): 4893–4902. doi: 10.1039/b705989b.
54. Farrawell NE, Yerbury MR, Plotkin SS et al. CuATSM Protects against the *in vitro* cytotoxicity of wild-type-like copper-zinc superoxide dismutase mutants but not mutants that disrupt metal binding. *ACS Chem Neurosci* 2019; 10(3): 1555–1564. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00527.
55. Roberts BR, Lim NK, McAllum EJ et al. Oral treatment with Cu(II)(atms) increases mutant SOD1 *in vivo* but protects motor neurons and improves the phenotype of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2014; 34(23): 8021–8031. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4196-13.2014.
56. McAllum EJ, Lim NK, Hickey JL et al. Therapeutic effects of Cull(atms) in the SOD1-G37R mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2013; 14(7–8): 586–590. doi: 10.3109/21678421.2013.824000.
57. McAllum EJ, Roberts BR, Hickey JL et al. Zn II(atms) is protective in amyotrophic lateral sclerosis model mice via a copper delivery mechanism. *Neurobiol Dis* 2015; 81: 20–24. doi: 10.1016/j.nbd.2015.02.023.
58. Ermilova IP, Ermilov VB, Levy M et al. Protection by dietary zinc in ALS mutant G93A SOD transgenic mice. *Neurosci Lett* 2005; 379(1): 42–46. doi: 10.1016/j.neulet.2004.12.045.
59. Soon CP, Donnelly PS, Turner BJ et al. Diacetyl bis(N(4)-methylthiosemicarbazonato) copper(II) (Cull(atms)) protects against peroxynitrite-induced nitrosative damage and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Biol Chem* 2011; 286(51): 44035–44044. doi: 10.1074/jbc.M111.274407.
60. Štětkářová I, Matěj R, Ehler E. Nové poznatky v diagnostice a léčbě amyotrofické laterální sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 2018; 81(5): 546–554. doi: 10.14735/amcsnn2018546.