

AZ AMYOTROPHIÁS LATERALSCLEROSIS PATOFIGIOLÓGIAI TÉNYEZŐINEK KÖZPONTI KAPCSOLÓELEME, A KALCIUM

PATAI Roland¹, NÓGRÁDI Bernát², MESZLÉNYI Valéria², OBÁL Izabella³, ENGELHARDT József István³,
SIKLÓS László¹

¹MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet, Szeged

²A Szegedi Orvosbiológiai Kutatások Jövőjéért Alapítvány, Szeged

³Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinika, Szeged



Hungarian

<http://dx.doi.org/10.18071/isz.70.0247>

www.elitmed.hu

CALCIUM ION IS A COMMON DENOMINATOR IN THE PATHOPHYSIOLOGICAL PROCESSES OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Patai R; Nógrádi B; Meszlényi V; Obál I, MD, PhD;
Engelhardt JI, MD, PhD, DSc; Siklós L, PhD, DSc
Ideggyogy Sz 2017;70(7-8):247-257.

Az amyotrophias lateralsclerosist (ALS), a leggyakoribb motoneuron-betegséget a harántcsíkt izmok fokozatos gyengülése, sorvadása, majd teljes bénulása jellemzi, melyek oka az agyban és a gerincvelőben található motoneuronok progresszív pusztulása. Mai ismereteink szerint azonban az ALS összetett klinikai tünetegyüttes, ami átfedést mutathat kognitív deficittel járó kórképekkel is. Ennek megfelelően egy-egy eset olyan klinikopatológiai spektrumon értelmezhető, amelynek két végpontja a klasszikus, kizárólag a mozgatóneuronokat érintő ALS, illetve a frontotemporalis dementia. A betegség lefolyása azonban ugyanazon a komplex mechanizmusokon alapul, amelyek a felső és alsó mozgatóidegsejtek degenerációját okozzák. Az ALS-ben a mozgatóidegsejtek pusztulásának számos részfolyamata ismert. Ezek közül is kiemelhető az oxidatív stressz, az excitotoxicitás, az immun-/gyulladásos folyamatok szerepe és a mitochondriumok károsodása. Ezek a mechanizmusok a betegség progressziója alatt szimultán figyelhetők meg, sőt, képesek egymás hatását felerősíteni. Feltételezhető, hogy a kalciumionoknak jelentős katalizátor szerepük van, mivel e folyamatok mindegyike erős, pozitív előjelű és reciprok kalciumfüggést mutat. Vagyis közöttük olyan kalciumfüggő kapcsolat alakulhat ki, ami időben és térben egysítható és felerősítheti az egyedi folyamatok degeneratív hatását. Ezen összefoglaló közlemény fő célja az ALS-ben megfigyelhető diszkrét neurodegeneratív folyamatok közötti kalciummediált reciprok kapcsolatok áttekintése.

Kulcsszavak: ALS, motoneuron, kalcium, excitotoxicitás, oxidatív stressz, immun-/gyulladásos folyamatok

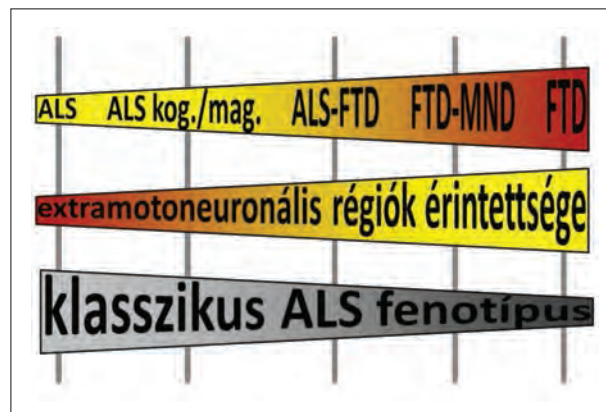
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the most frequent motor neuron disease is characterized by progressive muscle weakness caused by the degeneration of the motor neurons in the spinal cord and motor cortex. However, according to the recent observations, ALS is a rather complex syndrome which frequently involves symptoms of cognitive impairment. Therefore, ALS cases can be interpreted in a clinico-pathological spectrum spanning from the classical ALS involving only the motor system to the fronto-temporal dementia. The progression of the disease, however, manifested in the degeneration of the upper and lower motor neurons, is based on the same complex pathobiology. The main elements of the pathomechanism, such as oxidative stress, excitotoxicity, immune/inflammatory processes and mitochondrial dysfunction are well described already, which operate in orchestrated way and amplify the deleterious effect of each other. It is assumed that calcium ions act as a catalyst in this interaction, hence each of the individual mechanisms has strong, positive and reciprocal calcium dependence thus may combine the individual pathological processes into a unified escalating mechanism of neuronal destruction. This review provides an overview of the role of calcium in connecting and amplifying the major mechanisms which lead to degeneration of the motor neurons in ALS.

Keywords: ALS, motor neuron, calcium, excitotoxicity, oxidative stress, immune/inflammatory mechanisms

Levelező szerző (correspondent): Dr. SIKLÓS László, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet; 6726 Szeged, Temesvári krt. 62. (6701 Szeged, Pf. 521). Telefon: (06-62) 599-611, fax: (06-62) 433-133. E-mail: siklos.laszlo@brc.mta.hu

Érkezett: 2016. november 24. Elfogadva: 2017. január 27.

Jean Martin Charcot francia neurológus és kórelélettan-professzor volt az első, aki máig helytállóan definiálta úgy az amyotrophiás lateralsclerosist (ALS; „la sclérose latérale amyotrophique”), mint ami az *anterolateralis fasciculus* patológiás hegesezésével és az ezzel összefüggő izomsorvadással jár¹. Jelenlegi nézetünk szerint a motoneuron-betegségek közül a leggyakrabban előforduló ALS olyan, ma még gyógyíthatatlan betegség, ami a motoros agykéreg és az agytörzs, valamint a gerincvelő mozgatóidegsejtjeinek progresszív pusztulása következtében a betegekben fokozódó, és egyre több izomcsoportot érintő gyengeséggé, majd teljes bénulásként manifesztálódik. A halál rendszerint a diagnózis felállítását követő 3–5 éven belül légzési elégtelenség következtében áll be². Az ALS diagnosztikai kritériumait „El Escorial” kritériumok néven szokták emlegetni³, melyek az eredeti megfogalmazást követően többszörös revízió estek át^{4,5}. Ez a kritériumrendszer összetett klinikai és laboratóriumi vizsgálatoknak, így elektromiográfiás és elektroneurográfiás méréseknek, képkalkító eljárásoknak, a *liquor* jellemzésének és izombiopsziás minták patológiai vizsgálatának elvégzését írja elő a minden más hasonló tünetekkel járó betegség kizárása érdekében, és alapvető célja nem a klinikai döntéshozatal elősegítése, hanem az ALS fenotípusos variabilitásának szűkítése a klinikai gyógyszereszekbe bevonni kívánt betegek kiválasztása során^{6,7}. Előfordulását tekintve (körülbelül öt új beteg 100 000 lakosra vetítve évente) a különböző etnikumok között nincs különbség, ellenben a betegség szexuális dimorfizmust mutat, ugyanis a 65 év alatti férfiakban gyakoribb az előfordulás, mint az azonos korú nőkben, bár ez a különbség 65 éves kor fölött kiegyenlítődik. További epidemiológiai adatokat tekintve a klasszikus csoportosítás alapja a családi halmozottság megléte, mely esetén familiáris formáról (az esetek 5–10%-a), míg családi előfordulás hiányában idiopathiás, sporadikus formáról beszélünk⁷. Familiáris esetekben a kiváltó ok többnyire genetikai eredetű, melyet körülbelül 20 gén különböző mutációi okozhatnak⁸. Ezekben az esetekben lehetőség van vérből, illetve szövetből történő genetikai vizsgálatokra. Ideális esetben teljes genom szekvenálás javasolt, ám a gyakori mutációk célzott szűrése is megfelelő és gyorsabb alternatíva lehet⁸. Az utóbbi évek egyik irányadó genetikai felfedezése a *9p21 locuson* található *C9orf72* génben megjelenő intronikus hexanukleotid-szekvencia ismétlődése a familiáris és kevésbé a sporadikus formában. Ez a GGGGCC ismétlődés gyengítette az ALS familiáris/sporadikus osztályozásának alapját, illetve ugyanennek a szekvenciának a megjelenése más neurodegeneratív kórképek-



1. ábra. A mozgatórendszert érintő és kognitív kórképek átfedése ALS-ben. Az ALS betegség megfigyelhető fenotípusa a kizárólag a motoneuronális elemeket érintő klasszikus ALS és a frontotemporalis dementia közötti folyamatos spektrumon helyezkedik el

ALS kog/mag: enyhe kognitív vagy viselkedésszerű tünetekkel jelentkező ALS, FTD: frontotemporalis dementia, MND: motoneuron-betegség.

ben elhalványította a klinikai határvonalat bizonyos neurodegeneratív betegségek között is (**1. ábra**)⁹. Mivel az ALS-re jellemző kórkép kialakulása több sejttypus (astrocyták, microgliák, infiltráló immunsejtek) egyidejű közreműködését, továbbá genetikai faktorok és patofiziológiai folyamatok (oxidatív stressz, excitotoxicitás, immun-/gyulladásos folyamatok, mitochondrium károsodása) molekuláris mechanizmusai komplex interakcióját igényli, így az ALS-t nem sejtautonóm¹⁰, multifaktoriális entitásként értelmezik¹¹. A *C9orf72* gén mellett újabban azonosított, familiáris és sporadikus betegek szubpopulációiban egyaránt kimutatható TDP-43- és FUS DNS/RNS-szabályozó génmutációk, és az ezzel összefüggő TDP-43- és FUS-tartamú citoplazmikus inklúziók¹² az RNS-metabolizmus kóros elváltozásának ALS-ben betöltött kitértetett szerepére utalnak. Mindezeket a mechanizmusokat számos átfogó publikáció ismerteti^{7, 9–11}. Ebben az összefoglaló közleményben a kalciumion központi szerepére helyezzük a hangsúlyt, illetve arra, hogy a primer sérülés lokalizációjától és típusától függetlenül hogyan képes a kalciumion a különböző toxikus folyamatokat egyesíteni és egyetlen öngerjesztő degeneratív mechanizmussá ötvözni. Ebből a szempontból áttekintjük továbbá, hogy a mozgatóidegsejtek néhány meghatározó tulajdonsága, úgymint az alacsony kalcium-pufferkapacitás vagy a glutamát receptorok speciális, kalciumpermeabilis konformációja hogyan teszi sérülékennyé vagy épp ellenállóbbá ezen sejtek egyes szubpopulációit a kalcium által közvetített degenerációval szemben.

Az egyes patológiai folyamatok az intracelluláris kalciumszint emelkedését idézik elő

EXCITOTOXICITÁS

A glutamát mint serkentő hatású idegi jelátviteli molekula számos élettani folyamatban nélkülözhetetlen, melyek közül a legjelentősebbek a kognitív funkciók, a memória és a tanulás. Ezek alapján a glutamát-egyensúly felborulása számos idegrendszeri érintő betegség patofiziológiai alapja lehet, mely a szakirodalmi adatok alapján a krónikus elváltozásokon kívül (ALS¹³, Alzheimer-kór¹⁴, Parkinson-kór¹⁵, sclerosis multiplex¹⁶, autizmus¹⁷), akut esetekben, például traumás agyi sérülés esetében is megfigyelhető¹⁸. Mivel a glutamát az egyik leggyakoribb molekula az agyban, ezért patológiás szerepét már korán felismerték. Olney az 1960-as években végzett úttörő kísérleteiben retinasejteken mutatta ki a glutamát által kiváltott toxikus hatásokat, melyre összefoglaló néven az azóta is használt excitotoxicitásként utalt¹⁹. Az excitotoxicitás ALS-ben betöltött szerepét a betegek vérplazmájában mért, a normálistól kétszer magasabb mennyiségű glutamát jelenlétével bizonyították, bár diagnosztikai célra a gerincvelői folyadék magas glutamát- és aszparaginsav-szintje is utalhat. Ezeket az adatokat alátámasztotta az a megfigyelés is, ami a serkentő aminosav-transzporter 2 (EAAT2) gerincvelői és corticalis mennyiségének a csökkenését írja le, mivel a glutamát gyors metabolizálódásáért az EAAT1 és EAAT2 transzporterek felelősek²⁰. Ezzel egy időben ALS-betegekben a 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav (AMPA) típusú glutamátreceptorok patológiás konformációváltozását is leírták. Fiziológiai körülmények között az AMPA-receptorok nem átjárhatók a kalciumionok számára, ám a 2-es típusú glutamátreceptor-alegység (GluR2) konformációjának megváltozása vagy teljes hiánya kalciumionokra átjárhatóvá alakítja a receptort²¹. Az idegsejtek közötti impulzusáttevődés során ez a térszerkezeti módosulás nagymértékű kalciumbeáramlást eredményez a posztzinaptikus mozgatóidegsejtben, ami károsító hatást vált ki. A GluR2 alegység fehérjéjének és mRNS-ének csökkent expressziója, mely az ALS-betegekben megfigyelhető, megfelelő molekuláris alapot biztosít a magasabb glutamátszinttel kiváltott fokozott kalciumbeáramlás, így a megnövekedett intracelluláris kalciumszint kialakulásához²².

OXIDATÍV STRESSZ

Az oxidatív stressz ALS-ben betöltött szerepét évtizedekkel ezelőtt bizonyították *post mortem* vizsgá-

latokkal, melyek során megemelkedett mennyiségű karbonilszármazékot detektáltak a központi idegrendszer különböző részeiben²³, ami a lizin, a prolin, az arginin és a treonin direkt oxidációjának toxikus termékei²⁴. Ezenfelül jelentős mennyiségű 3-nitrotirozint is kimutattak, ami a peroxinitrit által okozott degeneráció ismert markere²⁵. A *post mortem* adatokon kívül gerincvelői folyadékból és vérből is kimutathatók oxidatív károsodásra utaló termékek, mint a 4-hidroxi-nonenal és a 8-hidroxi-2-dezoxiguanin²⁵. Az oxidatív stressz hatása azokat az ionszarnákat, így a kalciumszarnákat sem kíméli, amik a sejtek homeosztázisához nélkülözhetetlen ionikus miliót biztosítják²⁵. A plazmamembránban végbemenő lipidperoxidáció a feszültségfüggő kalciumszarnak szenzitizációját²⁶ vagy a P/Q típusú kalciumszarnak aktivitásának megemelkedését, így az intracelluláris kalciumszint emelkedését eredményezheti²⁷. ALS-ben az oxidatív károsodás egyik bizonyított oka az antioxidáns rendszer kisiklásával hozható összefüggésbe. Mivel bizonyos celluláris folyamataink folyamatosan termelnek reaktív oxigéngyököket, ezért evolúciósan több védelmi mechanizmus is kialakult. Ilyen a Cu/Zn szuperoxid-dizmutáz enzim (SOD1) és a glutation-peroxidázok rendszere, aminek eredményeképp a reaktív oxigéngyökök vízre és oxigénre bontva semlegesítődnek²⁸. ALS-ben a SOD1 gén mutációinak feltárását²⁸ követően kimutatták, hogy a mutáns SOD1 enzim kóros működése eredeti funkciójával ellentétesen fokozott oxidatív károsodáshoz vezet. Ugyan a felfedezés óta több mint két évtized telt el, az antioxidáns-stratégián alapuló terápiák sikertelenek maradtak. Így, bár a reaktív oxigéngyökök által kiváltott mechanizmusoknak az ALS-ben betöltött szerepe nyilvánvaló, de nem tekinthetők primer patofiziológiai eseménynek.

MITOCHONDRIALIS DISZFUNKCIÓK

Az oxidatív károsodáshoz hasonlóan, a gerincvelői mozgatóidegsejtek sejttestjében kialakuló mitochondriális elváltozásokat is először kóronctani vizsgálatok során írták le ALS-ben²⁹. Ezeket a vizsgálatokat később elektronmikroszkópos morfológiai módszerekkel is bizonyították, ahol megfigyelhetővé vált a mitochondriumok belső membránjai közötti terek térfogat-növekedése, illetve a mitochondriumok ultrastruktúrájának különféle elváltozásai³⁰. ALS-ben, a morfológiai megfigyeléseken kívül a mitochondriumok fiziológiai tulajdonságainak megváltozása, a citrát-szintáz és légzési lánc komplexeinek csökkent aktivitásával jellemezhető, ami visszavezethető a mitochondriális DNS-ben megjelenő mutációkra³¹. ALS-ben szenvedő bete-

vetlenül megemelni a kalcium mennyiségét a mozgatóidegsejtekben, de indirekt módon, reaktív oxigéngyökök képzésén keresztül mind a microgliák³⁶, mind az astrocyták⁴⁰ képesek rá. Az ALS progressziójában a humorális immunválasznak is kiemelkedő szerepe van, amint azt egy, a közelmúltban megjelent közlemény dokumentálja, a betegek szérumból 20, jelentősen megemelkedett autoantitest kimutatásával⁴¹. A betegek vérében, illetve gerincvelői folyadékában keringő anti-motoneuronális antitestek egy része feszültségfüggő kalciumcsatornákon keresztül képes növelni a rajtuk átfolyó áram erősségét és az intracelluláris kalcium mennyiségét a mozgatóidegsejtekben és az axonterminalisokban egyaránt. Ezekről az IgG-típusú antitestekről kimutatták, hogy az ALS sporadikus formájában a betegek 75%-ában fordulnak elő⁴², s melyek a kalciumcsatorna ionofor régióját tartalmazó $\alpha 1$ alegységéhez kötődnek⁴³. Modellrendszerben, elektrofiziológiai vizsgálatokkal kimutatták továbbá, hogy az ALS-betegek szérumból nyert IgG képes a neuronális N-/P-/Q-csatornákkal való kölcsönhatás útján az azokon átfolyó kalcium áram növelésére⁴⁴.

A megnövekedett intracelluláris kalciumszint az egyes patológiai folyamatok erősödéséhez vezet

Más kationokhoz képest a kalciumnak kimagasló jelentősége és kiterjedt szerepe van az élettani folyamatokban, aminek evolúciós háttere az lehet, hogy ez az ion kiemelkedően képes fehérjékkel reverzibilisen komplexeket képezni^{45, 46}. Általában a biokémiai reakciókra jellemzően az *in vivo* kalciumfüggő reakcióknak is van egy optimális koncentrációtartománya, vagyis mind az alacsony, mind a magas kalciumkoncentráció összeegyeztethetetlen az étellel. Alacsony koncentráció esetében a celluláris funkciók kóros megváltozásáról elsőként *Sidney Ringer* számolt be izolált szívpreparátumon végzett úttörő munkájában⁴⁷. A túlzott magas koncentráció élettani hatása a neuronokban tipikusan lezajló degeneráció⁴⁸, ami számos akut és krónikus neurológiai kórképben, mint ischaemiás vagy traumatikus agyi károsodást követően, sclerosis multiplexben, Huntington-, Parkinson- és Alzheimer-kórban is megfigyelhető. A megnövekedett kalciumszint több útvonalon keresztül is képes degeneratív folyamatok indukálására. Így elindíthatja a kalpain- és a kaszpárendszer aktivációját, aminek következtében a cytoskeletális elemek és a membránproteinek károsodása alakul ki⁴⁹. A kalciumszint megemelkedése ugyanakkor képes sejtpusztulást előidézni közvetlenül a kalciumfüggő apoptotikus fehérjék aktivációjával⁵⁰, vagy közvetve, egyes mito-

chondriális funkciókat érintve⁵¹. Az intracelluláris kalcium szintjének emelkedése továbbá lipidperoxidációt indukál szabadgyökök keletkezését és szuperoxid-anionok képződését elősegítve, vagy közvetve, mitochondriális kalciumakkumuláció eredményeként⁵², vagy közvetlenül, a nitrogén-monoxid-szintáz, a foszfolipáz A_2 és a xantinoxidáz aktivációja útján⁵³. A sérülés következtében aktiválódott intracelluláris jelátviteli utak továbbá olyan jelmolekulákat szabadítanak fel, amelyek széles körű gyulladási reakciót eredményeznek, melynek fenntartásában és progressziójában a neuronok, a microgliasejtek és astrocyták közötti reciprok kommunikáció igen jelentős szereppel bír (2. ábra)^{54, 55}. A fenti folyamatokon túlmenően, melyek degenerálódó idegsejtekre általánosan jellemzők, ALS esetén további specifikus kalciumfüggő patológiás folyamatok is megfigyelhetők. Így mutáns SOD1 transzgenikus egerekből preparált gerincvelői szinaptoszómapreparátumban *in vitro* emelkedett kalciumszint, és megnövekedett kalciumfüggő glutamátfelszabadulás volt mérhető, mely jelenség *in vivo* extrapolációja megnövekedett excitotoxicitásra utal⁵⁶. Biofizikai vizsgálatokkal a SOD1 enzim térszerkezetének olyan kalciumindukált konformációváltozását figyelték meg, mely elősegíti az enzim amorf aggregátumainak képződését, ami nemcsak hogy az ALS tipikus patológiai jegye, de az oxidatív stressz által közvetített degenerációhoz is aktívan hozzájárul⁵⁷. Ezek az eredmények alátámasztják a kalcium által indukált fehérjeterület-átalakítások fontosságát nem csak mutáns SOD1 típusú aggregátumok, azaz nemcsak a familiáris ALS-modellben, hanem sporadikus betegségforma esetén is⁵⁸.

A mozgatóidegsejt-populációk eltérő sérülékenységet befolyásoló belső mechanizmusok

ALS-ben nem minden mozgatóidegsejt-populáció degenerálódik azonos mértékben a betegség lefolyása során. A betegeken, a kis számban előforduló extrém hosszúságú túlélőktől eltekintve, a gerincvelő szakrális régiójában található *nucleus Onufrowicz*, és az agytörzsi *nucleus oculomotorius* motoros neuronjai tipikusan érintetlenek maradnak⁵⁹. A különböző érzékenység biológiai alapja rendkívül sokrétű lehet, befolyásolhatja a sejttest mérete, az axonok hossza, a metabolikus ráta, a corticális neuronokkal történő monoszynaptikus kapcsolatok száma és természetesen a kalcium-homeosztázis stabilitása, valamint a lehetséges intracelluláris kalciumszint emelkedését korrigálni képes pufferrendszerek terhelhetősége.

A fehérjékben megtalálható EF-kéz motívum az egyik legismertebb kalciumkötésre alkalmas szerkezeti kompozíció⁶⁰. Ebből kifolyólag azok a fehérjék, amelyek rendelkeznek ezzel a motívummal, képesek befolyásolni a lokális kalciumkoncentrációt, bár némelyiküknek, mint a troponin C-nek és a kalmodulinnak a regulátor funkciója jóval markánsabb tulajdonsága, mint a kalciumkötő képesség. Különböző agyi régiók morfológiai vizsgálatával kimutatták, hogy az ALS-ben rezisztensnek tekinthető motoneuronok kiemelkedően magas parvalbumin- és/vagy kalbindin D_{28k}-tartalommal rendelkeznek⁶¹. A kalciumkötő fehérjék rezisztenciában betöltött szerepét, Keller és munkatársai túlélő agyi szelet preparátumon közvetlenül is bizonyították. Az úgynevezett „hozzáadott puffer” technikát alkalmazva megfigyelték, hogy a rezisztensnek tekinthető *nucleus oculomotorius*ból származó motoneuronok nagyobb pufferekapacitással rendelkeznek a sérülékeny gerincvelői és a *nucleus hypoglossus* területéről származó mozgatóidegsejtekhez viszonyítva⁶², mellyel összhangban, idegátvágás után a rezisztens idegsejtekben kisebb kalciumemelkedés volt kimutatható⁶³. A kalcium pufferekapacitásának megemelésén alapuló neuroprotektív eljárások hatékonyságát számos *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* kísérletekkel is bizonyították. *In vitro*, magas kalbindin-D_{28k}-tartalmú differenciálatlan VSC 4.1 motoneuronok rezisztensnek bizonyultak a betegből származó immunglobulinokkal kiváltott degeneratív modellben. Ugyanezek a sejtek rezisztenciájukat a differenciálódás után kalbindin-D_{28k}-tartalmukkal együtt elvesztették, mellyel párhuzamosan az intracelluláris kalciumszint kóros mértékben megemelkedett az ALS-betegekből származó IgG-vel történő expozíció után. Ez a sérülékenység visszafordíthatónak bizonyult kalbindin-D_{28k}-transzferkciót követően⁶⁴. *In vivo*, a parvalbumin túltermelésével létrehozott transzgenikus modellben a *nervus ischiadicus* roncsolásával⁶⁵ vagy a *nervus hypoglossus* átvágásával⁶⁶ járó akut laesiós modellben, és a SOD1-mutáns kísérleti állatokkal történő keresztezéssel kialakított kettős transzgenikus egerek krónikus stressz modelljében is jelentős neuroprotekciónak volt detektálható⁶⁷.

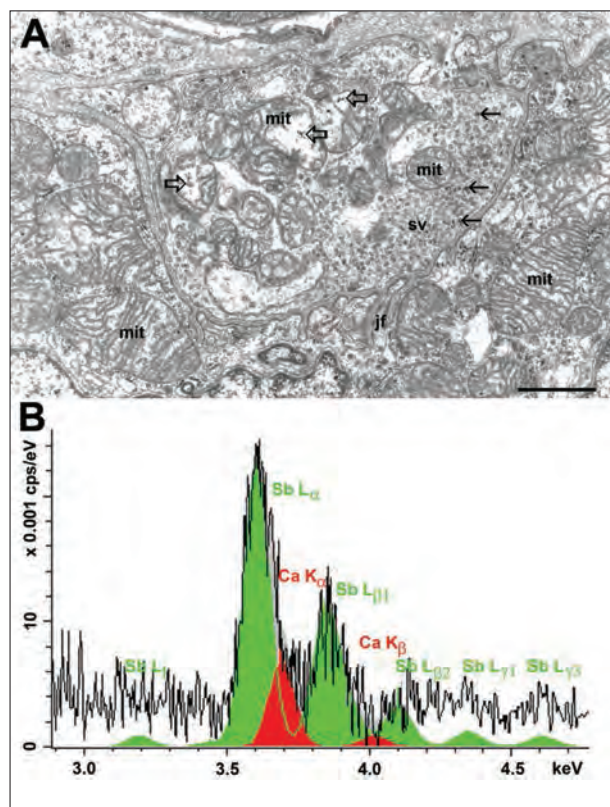
AZ AMPA-RECEPTOROK KALCIUMPERMEABILITÁSA
ÉS A MOTONEURONOK REZISZTENCIÁJA

ALS-ben a motoneuronális degeneráció folyamatát értelmező egyik vezető elmélet, az excitotoxicitás, a mozgatóidegsejtek plazmamembránjában találha-

tó AMPA-receptorok specifikus módosulásán alapul. Az AMPA-receptorok négy alegységből épülnek fel, melyek közül a GluR2 meglete vagy épp hiánya kiemelkedő jelentőségű, mivel ez a régió határozza meg a receptor kalciumáteresztő képességét²¹. Bár a szakirodalomban ellentmondásos adatokat is találhatunk a GluR2 megletének vagy épp hiányának a mozgatóidegsejtek érzékenységre gyakorolt hatásáról, a GluR2 mRNS és fehérje expressziójának csökkenése a sérülékeny mozgatóidegsejtekben egyaránt megfigyelhető⁶⁸. Emellett nem ALS-betegekből származó humán mintákon végzett transzkripció profil analízise segítségével kimutatták, hogy a gerincvelői neuronokhoz képest a *nucleus oculomotorius* neuronjaiban mind a négy glutamát-receptor-alegység szignifikánsan nagyobb mennyiségben található meg, ahol magasban kiemelkedik a GluR2-alegység majdnem 2,5-szeres mennyiséggel⁶⁹. Az AMPA-receptorok permeabilitásának változását patkánygerincvelői és -agytrónsi szövetszeleteken végzett elektrofiziológiai módszerekkel is bizonyították. A GluR2-alegység hiányának egyik oka, hogy motoneuron-betegségben szenvedő betegek mintáiban a GluR2 mRNS módosítása a glutamin/arginin (Q/R) oldalláncokon hiányos⁷⁰. Mivel ezeket az mRNS-módosításokat az RNS-en ható adenosin deamináz 2 (ADAR2) végzi, így az ADAR2 működési elégtelensége fontos tényező lehet a motoneuron-betegség patológiás folyamataiban. Az enzim fontosságát bizonyítandóan, kondicionális ADAR2 *knock-out* mutánsokban, csak a gerincvelői neuronokban történő kiütés esetén kizárólag az itt található motoneuronok degenerálódtak, aminek hatása kivédhető volt módosított Q/R oldalláncot tartalmazó GluR2-alegységek endogéntermelésével⁷¹.

A kalcium megnövekedett mennyiségének igazolása degenerálódó motoneuronokban

A neuronális degeneráció során pusztulásnak indult idegsejtek intracelluláris kalciumszintje meghatározására irányuló vizsgálatoknak, így a kalcium neuronális degenerációban betöltött szerepe közvetlen igazolásának gátat szab, hogy érthető etikai megfontolásból, humán központi idegrendszerből vett mintákon nem lehet vizsgálatokat folytatni. Elméleti alternatívát jelenthetnek a *post mortem* vizsgálatok, viszont a kalcium diffúzibilis tulajdonsága és a halál utáni autolitikus degradáció miatt a még élő, degenerálódó sejteken belüli ioneloszlásra való következtetés nem lehetséges. Következésképpen, élő sejteken a neuronális degenerációval összefüggő,



3. ábra. Kalcium elektronmikroszkópos kimutatása G93A mSOD1 transzgenikus egér neuromuscularis szinapszisában. **A:** Speciális, oxalát-piroantimonát-ozmium-fixálással a szöveti kalcium elektrondenz csapadékként jeleníthető meg, melyek kisebb-nagyobb csoportokat alkothatnak a mitochondriumokban ($\Rightarrow$), vagy a szinaptikus vesiculákban ($\Leftarrow$). Mit: mitochondrium, sv: szinaptikus vesicula, jf: junctionális redő. Nagyítási marker: 0,5 μ m. **B:** Az elektrondenz csapadékok kalciumtartalmát elektrongerjesztéses röntgensugár-mikroanalízissel JEOL JEM-1400Plus elektronmikroszkópban igazoltuk. A folyamatos fekete vonallal ábrázolt röntgenspektrum matematikai dekonvolúciójával az átfedő antimon- és kalciumcsúcsok elválaszthatók

megváltozott kalciumkoncentráció-értékek alapvetően *in vitro* rendszerekből, mint gerincvelői organotipikus preparátumokból, neuronális sejtvonalakból, transzfektált neuroblastoma-sejtekből vagy különböző szöveti szeletekből származnak. ALS esetén viszont kihasználható, hogy a degenerálódó mozgatóidegsejtek izom-ideg szinapsziseket alkotó idegvégződése rutin izombiopsziás eljárással könnyen mintavételezhetők. A biopsziás minták értékeléséhez kidolgoztunk egy eljárást, ami a preparátumok gyors immerziós fixálása során a szöveti kalciumot megköti, majd elektrondenz csapadékká alakítja, mi által az idegvégzésekben a kalcium elektronmikroszkóppal kimutathatóvá válik, így mennyisége és eloszlása meghatározható. A mód-

szerrel ALS-betegek izombiopsziás mintáiban található motoros idegvégzésekben a kontrollmintákhoz viszonyítva emelkedett kalciumszint volt kimutatható⁷². Ugyanezzel a módszerrel az ALS legelterjedtebben használt állatmodelljében – a G93A mSOD1 transzgenikus egértörzsben – megvizsgálva a gerincvelői mozgatóidegsejtek végződéseit, hasonlóan emelkedett kalciumszint volt kimutatható⁷³, amire egy tipikus képet a **3. ábrán** mutatunk be. Viszont a kísérleti állatokban a gerincvelői motoneuronok kalciumszintje is értékelhető volt, ami az axonterminalisokhoz hasonlóan emelkedett értéket mutatott⁷³. Így, az ALS-betegkből és az egérből származó idegvégzések kalciumtartalmának korrelációjára alapozva extrapolálható az ALS-betegek gerincvelői motoneuronjaiban is az emelkedett kalciumszint, vagyis a humán motoneuronális degeneráció és a megemelkedett kalciumszint kapcsolata közvetve igazolást nyert. A módszer alkalmazásával továbbá alátámasztható volt a különböző motoneuron-populációk eltérő sérülékenysége és a kalcium-háztartás stabilitásának összefüggése is, mely neuroprotektív stratégiák kidolgozását segítheti elő. Így, az mSOD1 transzgenikus egerek különbözőképpen sérülékeny *nucleus oculomotorius*ból származó és gerincvelői mozgatóidegsejtjeinek kalciumszintjét vizsgálva megállapítható volt, hogy korreláció áll fenn a sejtek kalciumköötőfehérje (parvalbumin) -tartalma és az mSOD1 által okozott stresszel szembeni ellenálló képessége között, ami tükröződik az ellenálló típusú sejtek alacsonyabb kalciumszintjében is⁷³. A motoneuronok kalcium-pufferkapacitásának növelésének, illetve a sejtekbe beáramló kalciummennyiség csökkentésének neuroprotektív hatása közvetlenül is igazolást nyert további vizsgálatok során. Korábbi kísérletekben kimutattuk, hogy egerekbe anti-motoneuronális IgG intraperitoneális injektálása jelentősen megnöveli a mozgatóidegsejtek végződéseiben és perikarionjaiban elektronmikroszkóposan kimutatható kalcium mennyiségét^{74–77}. Azokban az egerekben viszont, melyek mozgatóidegsejtjeiben a parvalbumin mesterségesen túltermelődött, ez a fajta akut stressz kalciumemelkedést nem idézett elő, illetve krónikus körülmények között, az állatokat mSOD1 transzgenikus egerekkel keresztezve, késleltette a betegségtünetek kialakulását⁶⁷. Az alternatív eljárás hatékonysága a sejtek kalciumszintje emelkedésének gátlására az mSOD1 modellben a kalciumpermeábilissá váló AMPA-receptorok kompetitív antagonistával (talampanellel) történő blokkolásával is igazolható volt, azonban ez a módszer csak akkor bizonyult hatékonynak, ha a kezelés megkezdése még a betegségtünetek megjelenése előtt történt⁷⁸. Mindkét

protektív próbálkozás során a stressz által indukált kalcium mennyiségi növekedését sikerült mérsékelni, de a beavatkozás a betegség progressziójára csak minimális mértékben volt hatással. Tekintettel a kalcium univerzális szerepére, az eljárások alacsony hatásfoka váratlan volt. A kezelés mérsékelt sikerének oka egyrészt lehet, hogy az előbb, vagy utóbb telítődő kalcium-pufferkapacitás növelése önmagában nem elegendő a folyamatos emelkedő kalciumbeáramlás kompenzálásához. Másrészt, ha az AMPA-receptorok antagonistá vegyületével történő kezelés túl későn kezdődik a betegség progressziójához képest, az astrocyta-microglia-neuron kommunikációban olyan folyamatok indulhatnak el, amelyek a lokális immunsejtek neuroprotektív szerepét irreverzibilisen a citotoxikus irányba tolják el^{54, 79}.

Összegzés

Az ALS-ben dokumentált egyes patológiai folyamatok a kórkép kialakításának szempontjából összehangoltan játszanak szerepet. A degeneratív

folyamatok kölcsönös kapcsolataiban ezek kalciumfüggése az, ami kialakíthat egy komplex öngerjesztő és önfenntartó patofiziológiai hálózatot, melynek eredményeképp a mozgatóidegsejtek degenerációja bekövetkezik a kiváltó októl, a degeneráció első lépésének helyétől, és idejétől függetlenül. A folyamatban azok a mozgatóidegsejtek esnek áldozatul a leghamarabb, amelyek alacsony kalcium-pufferkapacitással rendelkeznek és/vagy jelentősen megnövekedett kalciumbeáramlás figyelhető meg speciális receptorkonformációiknak köszönhetően.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A jelen közlemény alapjául szolgáló munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00001 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00001 program, valamint a Szegedi Orvosbiológiai Kutatások Jövőjéért Alapítvány Szegedi Tudós Akadémia programja támogatta az Emberi Erőforrások Minisztériumának pénzügyi hozzájárulásával (TSZ: 34232-3/2016/INTFIN). A szerzők köszönetüket fejezik ki dr. Régis Ravelle-Chapuisnak (JEOL (EUROPE) SAS) a röntgenmikroanalitikai mérések elvégzéséért.

IRODALOM

1. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésion de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. Arch Physiol Neurol Path 1869;2:744-54.
2. Rowland LP. Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 1998;160(Suppl 1):S6-24. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(98\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00193-2)
3. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. J Neurol Sci 1994;124(Suppl 1):96-107. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X\(94\)90191-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X(94)90191-0)
4. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2000;1:293-9. <http://dx.doi.org/10.1080/146608200300079536>
5. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. Clin Neurophysiol 2008;119:497-503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2007.09.143>
6. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airline House diagnostic criteria. A population-based study. Arch Neurol 2000;57:1171-6. <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.57.8.1171>
7. Swinnen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. Nature Rev Neurol 2014;10:661-70. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/nrneurol.2014.184>
8. Roggenbuck J, Quick A, Kolb SJ. Genetic testing and genetic counseling for amyotrophic lateral sclerosis: an update for clinicians. Genet Med 2017;19:267-74. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/gim.2016.107>
9. Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. Nature Rev Neurosci 2013;14:248-64. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/nrn3430>
10. Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. Neuron 2006;52:39-59. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.neuron.2006.09.018>
11. Vucic S, Rothstein JD, Kiernan MC. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. Trends Neurosci 2014;37:433-42. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tins.2014.05.006>
12. Troakes C, Maekawa S, Wijesekera L, Rogelj B, Siklós L, Bell C, et al. An MND/ALS phenotype associated with C9orf72 repeat expansion: abundant p62-positive, TDP-43-negative inclusions in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum but without associated cognitive decline. Neuropathology 2012;32:505-14. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1789.2011.01286.x>

13. Spalloni A, Nutini M, Longone P. Role of the N-methyl-D-aspartate receptors complex in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:312-22. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bbdis.2012.11.013>
14. Butterfield DA, Pocernich CB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 2003;17:641-52. <https://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00004>
15. Johnson KA, Conn PJ, Niswender CM. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009;6:475-91. <https://doi.org/10.2174/187152709789824606>
16. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2000;6:67-70. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/71555>
17. Ghanizadeh A. Increased glutamate and homocysteine and decreased glutamine levels in autism: a review and strategies for future studies of amino acids in autism. *Dis Markers* 2013;35:281-6. <http://dx.doi.org/doi:10.1155/2013/536521>
18. Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Hovda DA. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg* 1990;73:889-900. <http://dx.doi.org/doi:10.3171/jns.1990.73.6.0889>
19. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969;164:719-21. <https://doi.org/10.1126/science.164.3880.719>
20. Mitsumoto H, Chad DA, Pioro EP. Excitotoxicity and oxidative damage in ALS pathogenesis. In: Mitsumoto H, Chad DA, Pioro EP (eds.). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Philadelphia: F.A. Davis Company; 1997. p. 197-225.
21. Sommer B, Köhler M, Sprengel R, Seeburg PH. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 1991;67:11-9. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90568-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90568-J)
22. Liu SJ, Zukin RS. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in Neurosci* 2007;30:126-34. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.tins.2007.01.006>
23. Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1997;69:2064-74. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052064.x>
24. D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Rad Biol Med* 2013;65:509-27. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.029>
25. Balmus IM, Ciobica A, Antiochm I, Dobrin R, Timofte D. Oxidative stress implications in the affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. *Oxid Med Cell Longev* <http://dx.doi.org/doi:10.1155/2016/3975101>
26. Melachroinou K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Masgrau R, Papazafiri P, Stefanis L, et al. Deregulation of calcium homeostasis mediates secreted α -synuclein-induced neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 2013;34:2853-65. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.006>
27. Li A, Ségué J, Heinemann SH, Hoshi T. Oxidation regulates cloned neuronal voltage-dependent Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 1998;18:6740-7.
28. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/364362c0>
29. Atsumi T. The ultrastructure of intramuscular nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1981;55:193-8. <https://doi.org/10.1007/BF00691318>
30. Sasaki S, Iwata M. Mitochondrial alteration in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:10-16. <http://dx.doi.org/doi:10.1097/nen.0b013e31802c396b>
31. Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* 2002;80:616-25. <http://dx.doi.org/doi:10.1097/nen.0b013e31802c396b>
32. Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:45-51. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.bbdis.2009.08.012>
33. Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prella A, Moggio M, Braga M, et al. Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J Neurol Sci* 2001;191:25-33. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(01\)00627-X](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(01)00627-X)
34. Carri MT, Ferri A, Battistoni A, Famhy L, Gabbianelli R, Poccia F, et al. Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Letters* 1997;414:365-8. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01051-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01051-X)
35. Schiffer D, Cordera S, Cavalla O, Migheli A. Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1996;139:(Suppl):27-33.
36. Farina C, Aloisi F, Meinel E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007;28:138-45. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.it.2007.01.005>
37. Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: The good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009;4:389-98. <http://dx.doi.org/doi:10.1007/s11481-009-9171-5>
38. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neurosci* 2007;10:1387-94. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/nn1997>
39. Turner MR, Cagnin A, Turkeheimer FE, Miller CCJ, Shaw CE, Brooks DJ, et al. Evidence for widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an ¹¹C(R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 2004;15:601-9. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.nbd.2003.12.012>
40. Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 2013;53:34-41. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.mcn.2012.10.008>
41. May C, Nordhoff E, Casjens S, Turewicz M, Eisenacher M, Gold R, et al. Highly immunoreactive IgG antibodies directed against a set of twenty human proteins in the sera of patients with amyotrophic lateral sclerosis identified by protein array. *Plos One* 2014;9:e89596. <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0089596>
42. Smith RG, Hamilton S, Hoffmann F, Schneider T, Nastainczyk W, Birnbaumer L, et al. Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *New Eng J Med* 1992;327:1721-8. <http://dx.doi.org/doi:10.1056/NEJM199212103272405>
43. Kimura F, Smith RG, Delbono O, Nyormoi O, Schneider T, Nastainczyk W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis patient antibodies label Ca²⁺ channel α 1 subunit. *Ann Neurol* 1994;35:164-71. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/ana.410350207>
44. Llinás R, Sugimori M, Cherksey BD, Smith RG, Delbono O,

- Stefani E, et al. IgG from amyotrophic lateral sclerosis patients increases current through P-type calcium channels in mammalian cerebellar Purkinje cells and isolated channel protein in lipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11743-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11743>
45. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1115-22.
<http://dx.doi.org/doi:10.1073/pnas.032427999>
 46. Brini M, Carafoli E. Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:354-70.
<http://dx.doi.org/doi:10.1007/PL00000698>
 47. Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol* 1883;4:29-42.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1883.sp000120>
 48. Gleichmann M, Mattson MP. Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antiox Redox Signaling* 2011;14:1261-73. <http://dx.doi.org/doi:10.1089/ars.2010.3386>
 49. Chan SL, Mattson MP. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* 1999;58:167-90.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19991001\)58:1<167::AID-JNR16>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19991001)58:1<167::AID-JNR16>3.0.CO;2-K)
 50. Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, Cho DH, et al. Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9870-5.
<http://dx.doi.org/doi:10.1073/pnas.152336999>
 51. Kruman II, Mattson MP. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 1999;72:529-40.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720529.x>
 52. Dykens JA. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 1994;63:584-91.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63020584.x>
 53. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med* 1985;312:159-63.
<http://dx.doi.org/doi:10.1056/NEJM198501173120305>
 54. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and toxic neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* 2015;12:364-75.
<http://dx.doi.org/doi:10.1007/s13311-014-0329-3>
 55. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761-72.
<http://dx.doi.org/doi:10.1083/jcb.200908164>
 56. Milanese M, Zappettini S, Onofri F, Musazzi L, Tardito D, Bonifacino T, et al. Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2011;116:1028-42.
<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07155.x>
 57. Leal SS, Cardoso I, Valentine JS, Gomes CM. Calcium ions promote superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation into non-fibrillar amyloid. A link to toxic effects of calcium overload in amyotrophic lateral sclerosis? *J Biol Chem* 2013;288:25219-28.
<http://dx.doi.org/doi:10.1074/jbc.M113.470740>
 58. Leal SS, Gomes CM. Calcium dysregulation links ALS defective proteins and motor neuron selective vulnerability. *Front Cell Neurosci* 2015;9:Article225.
<http://dx.doi.org/doi:10.3389/fncel.2015.00225>
 59. Swash M. Clinical features and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. In: Brown Jr. RH, Meininger V, Swash M (eds.). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Sao Paulo: Maldem Winnipeg, Martin Dunitz; 2000. p. 3-30.
 60. Lewit-Bentley A, Réty S. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:637-43.
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00142-1)
 61. Ren K, Ruda MA. A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Res Rev* 1994;19:163-79.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8)
 62. Vanselow BK, Keller BU. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease. *J Physiol* 2000;525:433-45.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00433.x>
 63. Obál I, Engelhardt JI, Siklós L. Axotomy induces contrasting changes in calcium and calcium-binding proteins in oculomotor and hypoglossal nuclei of Balb/c mice. *J Comp Neurol* 2006;499:17-32.
<http://dx.doi.org/doi:10.1002/cne.21041>
 64. Ho BK, Alexianu ME, Colom LV, Mohamed AH, Serrano F, Appel SH. Expression of calbindin-D_{28k} in motoneuron-hybrid cells after retroviral infection with calbindin-D_{28k} cDNA prevents amyotrophic lateral sclerosis IgG-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6796-801.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6796>
 65. Dekkers J, Bayley P, Dick JR, Schwaller B, Berchtold MW, Greensmith L. Over-expression of parvalbumin in transgenic mice rescues motoneurons from injury-induced cell death. *Neuroscience* 2004;123:459-66.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.07.013>
 66. Paizs M, Engelhardt JI, Katarova Z, Siklós L. Hypoglossal motor neurons display a reduced calcium increase after axotomy in mice with upregulated parvalbumin. *J Comp Neurol* 2010;519:1946-61.
<http://dx.doi.org/doi:10.1002/cne.22312>
 67. Beers DR, Ho BK, Siklós L, Alexianu ME, Moiser DR, Mohamed AH, et al. Parvalbumin overexpression alters immune-mediated increases in intracellular calcium, and delays disease onset in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2001;79:499-509.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00582.x>
 68. Shaw PJ, Williams TL, Slade JY, Egett CJ, Ince PG. Low expression of GluR2 AMPA receptor subunit protein by human motor neurons. *NeuroReport* 1999;10:261-5.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199902050-00011>
 69. Brockington A, Ning K, Heath PR, Wood E, Kirby J, Fusi N, et al. Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: motor neuron resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity. *Acta Neuropathol* 2013;125:95-109.
<http://dx.doi.org/doi:10.1007/s00401-012-1058-5>
 70. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 2004;427:801.
<http://dx.doi.org/doi:10.1038/427801a>
 71. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, et al. Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* 2010;30:11917-25.
<http://dx.doi.org/doi:10.1523/JNEUROSCI.2021-10.2010>
 72. Siklós L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joó F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:203-16.
<http://dx.doi.org/doi:10.1002/ana.410390210>

73. Siklós L, Engelhardt JI, Alexianu ME, Gurney ME, Siddique T, Appel SH. Intracellular calcium parallels motoneuron-degeneration in SOD1 mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:571-87.
<https://doi.org/10.1097/00005072-199806000-00005>
74. Engelhardt JI, Siklós L, Kőműves L, Smith RG, Appel SH. Antibodies to calcium channels from ALS patients passively transferred to mice selectively increase intracellular calcium and induce ultrastructural changes in motoneurons. *Synapse* 1995;20:185-99.
<http://dx.doi.org/doi:10.1002/syn.890200302>
75. Appel SH, Smith RG, Alexianu M, Siklós L, Engelhardt J, Colom LV. Increased intracellular calcium triggered by immune mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurosci* 1996;3:368-74.
76. Engelhardt JI, Siklós L, Appel SH. Altered calcium homeostasis and ultrastructure in motoneurons of mice caused by passively transferred anti-motoneuronal IgG. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:21-39.
<https://doi.org/10.1097/00005072-199701000-00003>
77. Obál I, Siklós L, Engelhardt JI. Altered calcium in motoneurons by IgG from human motoneuron-diseases. *Acta Neurol Scand* 2002;106:282-91.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2002.01252.x>
78. Paizs M, Tortarolo M, Bendotti C, Engelhardt JI, Siklós L. Talampanel reduces the level of motoneuronal calcium in transgenic mutant SOD1 mice only if applied presymptomatically. *Amyotroph Lat Sclr* 2011;12:340-4.
<http://dx.doi.org/doi:10.3109/17482968.2011.584627>
79. Irwin CW, Kim RB, Mitchell CS. Seeking homeostasis: temporal trends in respiration, oxidation, and calcium in SOD1 G93A amyotrophic lateral sclerosis mice. *Front Cell Neurosci* 2015;9:Article248.
<http://dx.doi.org/doi:10.3389/fncel.2015.00248>