

# Genetski dejavniki v povezavi z amiotrofično lateralno sklerozo

Genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis

Katarina Vrabec,<sup>1</sup> Metka Ravnik-Glavač<sup>1,2</sup>

Medicinska fakulteta,  
Inštitut za patologijo,  
Oddelek za molekularno  
genetiko, Univerza  
v Ljubljani, SI-1000  
Ljubljana, Slovenija

Inštitut za biokemijo,  
Univerza v Ljubljani,  
SI-1000 Ljubljana,  
Slovenija

## Korespondenca/

### Correspondence:

Metka Ravnik-Glavač,  
e: metka.ravnik-glavac@  
mf.uni-lj.si

## Ključne besede:

vzročni geni za ALS; geni;  
ki povečajo nagnjenost  
za ALS; epigenetika;  
korelacija genotip-  
fenotip; fiziološka vloga  
mutiranih genov

## Key words:

ALS causative genes;  
ALS predisposing genes;  
epigenetics; genotype-  
phenotype correlation;  
physiological role of  
mutated genes

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2015;  
84: 617–27

Prispelo: 10. okt. 2014,  
Sprejeto: 31. maj. 2015

## Izvleček

Amiotrofična lateralna sklerozo (ALS) je redka neurodegenerativna bolezen, za katero je značilno propadanje motoričnih nevronov v cerebralnem korteksu, možganskem deblu in hrbtenjači. Večinoma se pojavlja v odrasli dobi med 50. in 60. letom starosti z značilnimi simptomi, kot so mišična šibkost, atrofija in kasneje mišična paraliza, ki privede do smrti zaradi dihalne nezadostnosti v 2–5 letih po pojavu prvih simptomov. Danes je še neozdravljiva. Simptomi se tipično pričnejo pojavljati v spodnjih ali zgornjih udih (spinalna oblika) ali pa bulbarno (bulbarna oblika). Večina ALS primerov je sporadičnih, le okrog 5 % je družinskih. V nastanek bolezni so, tako pri sporadični kot tudi pri družinski obliki, vključeni genetski dejavniki. Mutacije so do sedaj opisane v kar 126 različnih genih, vendar z največjo frekvenco v genih *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* in *C9ORF72*. Spremembe opisujemo v tem pregledu še v 13 drugih genih, ki so pogosteje vpleteni v razvoj bolezni. Za ALS obstaja tudi hipoteza o oligogenskem dedovanju bolezni, ki predvideva mutacije v dveh ali več genih hkrati. Poudarjamo tudi genetske dejavnike pri navidezno sporadični obliki bolezni ter drugih neurodegenerativnih boleznih, ki si z ALS delijo genetske in klinične značilnosti. Ker se pri družinskih oblikah 2/3 primerov pojasni z mutacijo, pri sporadični obliki pa le okoli 11 %, so raziskave usmerjene v odkrivanje novih genov s pomočjo asociacijskih študij po celotnem genomu, ali pa v epigenetske vzroke nastanka bolezni. V Sloveniji smo nedavno zaključili prvo reprezentativno genetsko analizo bolnikov z ALS, v teku pa so tudi raziskave na področju metilacije in mikro RNA.

## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare neurodegenerative disease characterized by degeneration of motor neurons in the cerebral cortex, brainstem and spinal cord. The disease mainly occurs in adults, typically between 50 and 60 years of age and presents with symptoms, such as muscular weakness, atrophy and later on paralysis, which lead to death due to respiratory insufficiency within 2–5 years from onset, and remains incurable. The symptoms typically start in the muscles of arms or legs (spinal onset) or bulbar muscles (bulbar onset). Most ALS cases are sporadic although about 5 % are familial. Genetic factors are involved in sporadic as well as in familial forms of the disease. Mutations have been found in 126 genes, among these with highest frequencies in *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* and *C9ORF72*. Besides mutations in those four genes we are also describing genetic changes in 13 other genes involved in the disease process. Oligogenic model has been hypothesized for ALS that considers mutations in two or more genes in one patient. We emphasize the genetic factors in a seemingly sporadic form of the disease, and in other neurodegenerative diseases that share genetic and clinical characteristics with ALS. Because about 2/3 of familial cases and only about 11 % of sporadic cases are explained by mutations, the research has been aimed at discovering new candidate genes using genome-wide association studies, and at the epigenetic causes of the disease. We have recently completed the first representative genetic analysis of patients with ALS in Slovenia, and research on methylation and microRNAs is currently in progress.

## Uvod

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je redka neurodegenerativna bolezen<sup>1,2</sup> s povprečno incidenco 2,8/100.000 prebivalcev v Evropi in 1,8/100.000 v Severni Ameriki.<sup>3</sup> Za ALS je značilno propadanje motoričnih nevronov v cerebralnem korteksu, možganskem deblu in hrbtenjači.<sup>2</sup> Klinično in genetsko gre za heterogeno bolezen,<sup>4</sup> ki danes še ni ozdravljiva in se večinoma pojavlja v odrasli dobi med 50. in 60. letom starosti z značilnimi simptomi, kot so mišična šibkost, atrofija, kasneje pa mišična paraliza, ki privede do smrti zaradi dihalne nezadostnosti v 2–5 letih po pojavu prvih simptomov.<sup>5</sup> Pri približno 10 % bolnikov se bolezen začne pred 45. letom in pri okoli 1 % bolnikov že pred 25. letom starosti.<sup>6</sup> Tipično se simptomi ALS pričnejo pojavljati na določenem delu telesa, v zgornjih ali spodnjih udih (spinalna oblika) ali pa bulbarno.

Ideja, da so v nastanek ALS vključeni genetski dejavniki, je prvič vzniknila v letih 1850, ko so poročali o številnih družinah, v katerih je zbolelo več sorodnikov.<sup>7</sup>

Vendar pa je večina primerov ALS sporadičnih, le okrog 5 % je dednih.<sup>8</sup> Čeprav ni končnega merila za družinsko obliko bolezni, je sprejet splošni dogovor, da prisotnost bolezni pri dveh sorodnikih prvega ali drugega reda predstavlja družinsko obliko bolezni.<sup>9</sup> V študijah, ki so vključevale blizu dvesto parov dvojčkov, od katerih je bil v paru vsaj en bolnik z ALS, so ocenili prispevek dednosti na okoli 76 %, kadar so upoštevali pare dvojčkov iz sporadičnih in družinskih primerov skupaj, in na okoli 61 %, kadar so upoštevali le sporadične primere. Ta najdenja nakazujejo, da tako pri družinski obliki (FALS) kakor tudi pri sporadični obliki (SALS) na nastanek bolezni ključno vpliva genetski dejavnik.<sup>10</sup>

Številne družinske oblike ALS se dedujejo na klasičen način dedovanja po Mendlu, večinoma na avtosomno dominanten način z visoko stopnjo penetrance, čeprav so opisani tudi primeri recesivnega in na kromosom X vezanega dedovanja.<sup>11</sup> S pomočjo metodologije genetske vezave je mogoče pri družinskih oblikah bolezni ugotoviti genetske lokuse, ki se dedujejo v povezavi z bole-

znijo. Na ta način so leta 1989 odkrili prvi genetski lokus na kromosomu 21 (ALS1), ki je povezan z dominantno družinsko obliko ALS.<sup>12</sup> V tem lokusu so kasneje identificirali gen *SOD1* in številne mutacije v njem v povezavi z ALS.<sup>13</sup> Sledili so številni različni genetski pristopi za identifikacijo novih genov in mutacij, povezanih z ALS. V splošno dostopni bazi ALSod (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>) je do sedaj opisanih že 558 mutacij v 126 genih, vendar je bila velika večina teh genov povezana z boleznijo v posameznih primerih, zato jih zaenkrat lahko uvrščamo le med kandidatne gene, za katere bo morebitno potrditev potrebno pokazati z dodatnimi študijami. S številnimi raziskavami pa so že potrdili visoko stopnjo tveganja za nastanek ALS in mutacijami v manjšem številu genov, ki jih zato uvrščamo med vzročne gene za ALS.<sup>9</sup> Ti geni so mutirani tako pri družinski kakor tudi pri sporadični obliki bolezni, čeprav pri družinski obliki mnogo pogosteje. Sporadična in družinska oblika se klinično ločita le po tem, da se družinska oblika bolezni pojavi v zgodnejši starosti.<sup>14</sup> Do 10 % bolnikov je dementnih, pri skoraj 50 % vseh bolnikov pa je oškodovanost kognitivnih funkcij mogoče ugotoviti z nevropsihološkim testiranjem.<sup>15</sup>

Pri dednih oblikah se pri kar približno dveh tretjinah bolnikov mutacija, ki je vzrok za bolezen, odkrije, pri sporadičnih oblikah pa le pri okoli 11 % bolnikov.<sup>16,17</sup>

V tem preglednem članku opisujemo 17 glavnih genov, vpletenih v razvoj ALS, med katerimi pa so pri ALS najpogosteje mutirani *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* in *C9ORF72*, naštetih po zaporedju njihovega odkrivanja. Poudarili bomo hipotezo o oligogenski osnovi bolezni, povezavo med genotipom in fenotipom, genetske dejavnike pri navidezno sporadični obliki ALS in drugih neurodegenerativnih boleznih, ki si z ALS delijo določene genetske in klinične značilnosti, pa tudi epigenetske dejavnike, ki vplivajo na patofiziologijo ALS.

## Glavni udeležni geni

Geni, za katere menimo, da povzročajo tipično obliko ALS, so *SOD1*,<sup>13</sup> *TARDBP*<sup>18,19</sup> in *FUS*.<sup>20,21</sup> Drugi, redkeje udeleženi geni,

med katerimi so nekatere povezali tudi z drugimi neurodegenerativnimi boleznimi, pa so še geni *OPTN*,<sup>22</sup> *VCP*,<sup>23-25</sup> *SQSTM1*,<sup>26</sup> *FIG4*,<sup>27</sup> *ATXN2*,<sup>28</sup> *DAO*,<sup>29</sup> *SPG11*,<sup>30</sup> *PFN1*,<sup>31</sup> *VAPB*,<sup>32</sup> *ALS2*,<sup>33</sup> *SETX*<sup>34</sup> in *ANG*.<sup>35</sup> Hkrati pa so lahko nekateri za ALS značilni geni odgovorni za kombinacijo ALS-FTD ali samo za FTD.<sup>8</sup> Takšna sta gena *UBQLN1*<sup>11</sup> in *C9ORF72*.<sup>25,36</sup> Odkritje vpletenosti slednjega je leta 2011 predstavljalo novo prelomnico v raziskovalnih odkritjih, saj spada glede na dosedanja spoznanja med najpogostejše genetske vzroke za razvoj te bolezni. Dodatno je tudi utrdilo domneve, da patogeneza ALS poteka po več različnih genetskih in molekularnih poteh.<sup>37</sup>

### **SOD1 (superoksid dismutaza 1)**

Identificiranje gena *SOD1* kot prvega z ALS povezanega gena je pred dobrimi dvajsetimi leti sprožila vpogled v razumevanje patogeneze ALS.<sup>13</sup> Odtlej so v tem genu našli več kot 180 različnih mutacij, vendar pa dokazi o njihovi patogenosti obstajajo za le nekaj od njih.<sup>38</sup> Populacijske študije kažejo, da so mutacije v tem genu vzrok za približno 20 % dednih oblik in 3 % sporadičnih primerov ALS<sup>2</sup> in so prisotne v vseh 5 eksonih gena.<sup>39</sup> Protein *SOD1* je konstitutivno in ubikvitarno izražen v vseh celicah.<sup>40</sup> Gre za močno ohranjen citoplazemski protein, ki kodira Cu/Zn superoksid dismutazo.<sup>39</sup> Mutacije v genu *SOD1* lahko povzročijo poškodbe nevronov zaradi akumuliranja toksičnih produktov, kar privede do hitre celične smrti.<sup>4</sup> Fenotipska heterogenost je velika, mutacija D90A je recesivna in bolniki, ki so homozigoti za to mutacijo, so manj prizadeti. Preživetje običajno preseže 10 let.<sup>41</sup> Na drugi strani pa je mutacija A4V povezana z dominantno, agresivno potekajočo boleznijo, ki se konča s smrtjo že v 1 letu.<sup>42</sup> Kognitivna prizadetost je redka, čeprav se lahko pojavi v poznih stadijih bolezni.<sup>43</sup> Patologija bolezni ALS, ki jo povzročijo mutacije v genu *SOD1*, je drugačna od vseh ostalih tipov bolezni v tem, da ni prisotne patologije TDP-43 in/ali *FUS*.<sup>44</sup>

### **TARDBP (TAR DNA-vezavni protein)**

*TARDBP* kodira protein TDP-43, ki je pretežno jedrni ribonukleoprotein, ki uravnava transkripcijo, alternativno izrezovanje in stabilnost RNA.<sup>19</sup> Pomembno vlogo igra pri miRNA procesiranju in biogenezi.<sup>45</sup> Izraža se v vseh celicah in se lahko veže na DNA ali RNA.<sup>19</sup> Zmanjšanje količine proteina TDP-43 spremeni raven več kot 600 mRNA, med njimi tudi drugih z ALS povezanih genov, kot sta *FUS* in progranulin, ter številnih drugih genov, vključenih v prenos signalov, vnetne procese in celični obrambni sistem.<sup>46</sup> Leta 2006 so ugotovili, da se protein TDP-43 pri bolnikih prenese iz jedra v citoplazmo in je glavna komponenta povsod prisotnih proteinskih agregatov, ki nastajajo v citoplazmi propadajočih motoričnih nevronov tako pri ALS kot tudi pri FTD.<sup>47</sup> Izguba normalne jedrne funkcije, ki je povezana z metabolizmom RNA, ali pridobitev toksične funkcije, ki je povezana z motnjami stresnih zrc, agregacijo in akumuliranjem v citoplazmi, sta le dva od možnih mehanizmov, ki lahko privedeta do bolezni.<sup>48</sup> To so bili hkrati tudi ključni dokazi, da sta ti dve sicer dokaj različni bolezni del kontinuiranega spektra bolezni, ne pa dve popolnoma ločeni stanji, kar je nadalje neposredno vodilo tudi k odkritju mutacij v genu *TARDBP* pri dednih oblikah ALS in tudi v družinah s FTD.<sup>19,49</sup> Mutacije v genu *TARDBP* so odgovorne za približno 4 % družinske oblike ALS in manjši odstotek sporadičnih primerov.<sup>50</sup> Večina najdenih mutacij se nahaja v eksonu 6, ki kodira močno ohranjeno C-terminalno regijo,<sup>51</sup> vključeno v vezavo ribonukleoproteinov in izrezovanje RNA.<sup>48</sup> Bolniki z mutacijami v genu *TARDBP* kažejo klasičen fenotip bolezni ALS, vendar se bolezen rada pojavi prej in pogosteje s simptomi v zgornjih udih, trajanje bolezni pa je daljše kot pri sporadični obliki ALS.<sup>52</sup>

### **FUS (angl. »Fused in sarcoma«)**

Pred nekaj leti so bile kot vzrok za dedno obliko ALS odkrite še mutacije v genu *FUS*.<sup>20,21</sup> Čeprav spremembe v omenjenem genu predstavljajo vzrok le pri 4 % bolnikov, pa je vloga tega proteina pomembna že zato, ker ima strukturne in funkcionalne podob-

nosti s proteinom TDP-43. FUS je povsod izražen pretežno jedrni protein, ki je vpleten v popraviljanje DNA, uravnavanje prepisovanja, RNA izrezovanje in iznos v citoplazmo. Vlogo igra tudi pri procesiranju RNA in miRNA, pri prenosu mRNA in, podobno kot TDP-43, pri dinamiki stresnih zrnč.<sup>53</sup> Večina bolnikov z mutacijami v genu *FUS* kaže klasični potek bolezni brez kognitivne prizadetosti, vendar pa se bolezenski fenotipi celo pri bolnikih z enako mutacijo lahko precej razlikujejo.<sup>54,55</sup> Mutacije v genu *FUS* se prav tako kot pri *TARDBP* večinoma nahajajo v C-terminalnem delu, ki kodira RNA-vezavno domeno. Mutacije preprečijo vstop proteina FUS v jedro ter spodbudijo tvorbo netopnih agregatov v citoplazmi prizadetih nevronov.<sup>21</sup> Značilna naj bi bila odsotnost agregatov ubikvitina in TDP-43,<sup>20,21</sup> vendar pa so novejša raziskava pokazale, da je tudi FUS lahko kolokaliziran s TDP-43.<sup>56,57</sup> Agregacija proteinov v citoplazmi nevronskih celic in spremenjen RNA metabolizem sta očitno skupna patogeneza mehanizma, vpletena pri ALS in morda tudi pri drugih neurodegenerativnih boleznih.<sup>2,20,21</sup>

### **C9ORF72**

Pri razumevanju bolezni ALS in njenih vzrokov je izrednega pomena odkritje vpletenosti gena *C9ORF72* v letu 2011.<sup>25,36</sup> V prvem intronu gena imajo zdravi posamezniki prisotnih nekaj heksanukleotidnih ponovitev GGGGCC, medtem ko imajo bolniki z ALS lahko prisotnih več sto takšnih ponovitev.<sup>25,36</sup> Omenjena ekspanzija je vzrok za bolezen pri približno 5–6 % bolnikov s sporadično obliko bolezni in pri kar 40 % bolnikov z dedno obliko, kar pomeni, da je ta mutacija najpogostejši vzrok za bolezen tako pri družinskih kot tudi pri sporadičnih primerih.<sup>25,58</sup>

Večina bolnikov z ALS, ki imajo mutacijo v *C9ORF72*, se klinično razlikuje od ostalih oblik. Pogostejši je bulbarni začetek bolezni (40 %) kot pri ostalih (25 %), kognitivne težave, predvsem frontotemporalna demenca (FTD), ki se pojavijo pri skoraj polovici bolnikov (pri ostalih oblikah le v 10 %),<sup>50,59</sup> lahko pa izražajo tudi parkinsonizem ali

psihiatrične simptome, kot so psihoze in nagnjenost k samomoru.<sup>59,60</sup>

Mehanizem razvoja bolezni ni popolnoma pojasnjen. Neurodegeneracija naj bi bila posledica nastanka toksičnega produkta ali pa protein zaradi mutacije izgubi svojo funkcijo. Delna haploinsuficienca bi lahko bila vzrok, saj naj bi intronske ekspanzije povzročile izgubo enega ali vseh alternativno izrezanih transkriptov *C9ORF72*.<sup>25,36</sup> Nastajanje RNA vključkov znotraj celičnega jedra pa nakazuje, da zaradi te mutacije prihaja do napake pri izrezovanju RNA.<sup>61</sup> Najverjetneje je v patogenezo *C9ORF72* vpletenih več mehanizmov.

## **Ostali geni, ki so pogosteje mutirani v povezavi z ALS**

### **SETX (Senataksin)**

Mutacije v genu *SETX* so povezali z avtosomalno-dominantno zgodnjo obliko ALS. Pojavi se že v otroštvu ali puberteti, napreduje počasi, zanj pa je značilna šibkost udov zaradi obsežnega propadanja mišic. Dihalno in bulbarno mišičje ponavadi ni prizadeto.<sup>34</sup> Gen *SETX* kodira DNA/RNA helikazo, ki je vključena v repliciranje DNA. Mutirani senataksin inducira okvarjene nevrotoksične strukture DNA in hibride DNA-RNA.<sup>62</sup>

### **UBQLN2 (Ubikvilin 2)**

Mutacije v genu *UBQLN2* so najprej odkrili v povezavi z dominantno dedno, na X-vezano obliko ALS in ALS-FTD<sup>11</sup> in so vzrok za bolezen pri približno 2 % bolnikov s FALS. Bolezen se lahko pojavi zgodaj, v pozni najstniški dobi, ali šele pri 70. letu starosti. Gen je zanimiv predvsem zaradi svoje vpletenosti v ubikvitinsko pot, saj je spremenjeni proces ubikvitinacije dokaj značilen za patološke proteinske vključke pri ALS.<sup>11</sup> Ubikvitinske vključke so dokazali v hrbtenjači bolnikov z ALS in ALS/FTD, pri katerih so našli mutacije v genu *UBQLN2*. Ti vključki pogosto vsebujejo tudi proteina TDP-43 in/ali FUS. Poleg tega pa so neobičajno patologijo *UBQLN2* opazili tudi pri bolnikih s sporadično obliko ALS in tistih, ki



imajo mutacijo v genu *FUS*.<sup>11,63</sup> Ti podatki nakazujejo, da je UBQLN2 pogosto tudi posredno vpleten v patogenezo ALS.

### VAPB (Z vezikli povezan membranski protein B)

Mutacije v genu *VAPB* povzročajo nekatere oblike ALS, kot je na primer ALS v kombinaciji s tremorjem, ali pa ALS s hitrim potekom bolezni.<sup>32</sup> V povezavi z boleznijo so znane tri mutacije, od katerih je najpogostejša mutacija p.Pro56Ser. Protein VAPB se povezuje z znotrajceličnimi membranami, kot je membrana endoplazemskega retikuluma, uravnava pa tudi prenos in sekrecijo med endoplazmatskim retikulumom in Golgijevim aparatom.<sup>32</sup> Mutirani VAPB povzročijo nastanek citozolnih agregatov in s tem poveča možnost nastanka ER stresa,<sup>64</sup> vključen pa je tudi v glutamatno nevrotoksičnost preko epinefrinske receptorske poti.<sup>65</sup>

### ATXN2 (ataksin-2)

Ekspanzije ponovitev CAG v genu *ATXN2*, ki kodira poliglutaminski trakt ataksina-2, so povezane s povečanim tveganjem za nastanek bolezni ALS. Normalno število ponovitev je 22 ali 23. Več kot 34 ponovitev CAG povzroči spinocerebelarno ataksijo tipa 2 (SCA2); s približno 5 % FALS in SALS skupaj pa so povezane ekspanzije v območju med 27 in 33 ponovitev<sup>28</sup>. Nedavno so dokazali, da je število ponovitev 29–32 še posebej statistično značilno povezano z boleznijo ALS.<sup>66</sup> Patološke analize so pokazale, da je ataksin-2 del citoplazemskih agregatov v nevronih hrbtenjače pri bolnikih z ALS.<sup>28</sup> Povečano izražanje ataksina-2 povleče mutirana TDP-43 in *FUS* v citoplazemske stresne granule, poveča fragmentacijo Golgijevega aparata in sproži mitohondrijsko inducirano apoptozo.<sup>67</sup>

### OPTN (Optinevrin)

Leta 2010 so v genu *OPTN* našli 3 mutacije, povezane z avtosomno recisivno obliko ALS na Japonskem.<sup>22</sup> Kasneje so pri evropski in japonski populaciji odkrili še nekaj mutacij. Kot vzrok za bolezen pa ostajajo spremembe v tem genu dokaj redke, pred-

vsem v evropski populaciji. Z *OPTN* povezana oblika bolezni se običajno pokaže s prizadetostjo spodnjih udov in odsotnostjo FTD pri starosti 25–70 let.<sup>50,68</sup> Optinevrin je vključen v številne celične procese, kot so uravnavanje prehodov skozi membrano, sekrecija proteinov, delitev celice, obramba celice pred patogeni.<sup>69</sup> Mutacije v genu *OPTN* so odkrili tudi v povezavi z drugimi bolezenskimi fenotipi, kot so glavkomi<sup>70,71</sup> in Pagetova bolezen kosti.<sup>72</sup> Optinevrinske vključke so določili v patoloških strukturah, povezanih z ALS, kakor tudi v povezavi z drugimi nevrodegenerativnimi boleznimi, kot so Parkinsonova, Alzheimerjeva in Creutzfeldt-Jakobova bolezen.<sup>22,71</sup>

### VCP (Valozin-vsebujoči protein)

S sekvenciranjem eksoma so odkrili mutacije v genu *VCP* pri avtosomno-dominantni obliki ALS. Mutacije v *VCP* povzročajo 1–2 % dednih oblik in manj kot 1 % sporadičnih oblik ALS.<sup>23,73</sup> Ta gen je bil že prej poznan v povezavi s FTD, miopatijo in Pagetovo boleznijo kosti.<sup>74</sup> Bolniki z mutacijo v tem genu izražajo različne fenotipe, razlikujejo se celo tisti z enakimi mutacijami.<sup>75</sup> *VCP* je ATPaza, vključena v uravnavanje več različnih celičnih procesov, kot so: sistem ubikvitin-proteasom, avtofagija, endosomno sortiranje, uravnavanje degradacije proteinov na zunanji mitohondrijski membrani in s kromatinom povezani procesi.<sup>76</sup> V prizadetih nevronih bolnikov z mutacijo v genu *VCP* so našli za TDP-43 pozitivne ubikvitinirane citoplazemske vključke.<sup>23</sup>

### PFN1 (Profilin 1)

Leta 2012 so pri bolnikih z avtosomno-dominantno dedno obliko ALS našli mutacijo v genu *PFN1*, ki je segregirala z boleznijo v več družinah z ALS.<sup>31</sup> V omenjenem genu so znane štiri mutacije,<sup>31</sup> vendar pa se redko pojavljajo kot vzrok za bolezen ALS, saj so nedavne študije na številnih populacijah ALS in FTD bolnikov pokazale, da mutacije v tem genu verjetno niso vzrok za nevrodegeneracijo.<sup>77</sup> Kljub temu pa odkritje tega gena v povezavi z boleznijo kaže na morda nov mehanizem pri patogenezi ALS, ki vključuje spremembe v dinamiki aktinske

poti in zato motnjo citoskeletne arhitekture nevronov.

### ALS2 (Alzin)

Mutacije v genu *ALS2* so povezane z recesivno mladostniško obliko ALS, primarno lateralno sklerozo (PLS) in dedno spastično paraplegijo.<sup>33,78</sup> Izguba funkcionalnega proteina *ALS2* je najverjetneje povezana z nevrotoksičnostjo. Protein *ALS2* medsebojno deluje z mutiranim proteinom *SOD1* in tako poveča toksičnost zaradi reaktivnih kisikovih zvrsti.<sup>79</sup> Utišanje gena *ALS2* privede do znižanja hitrosti rasti motoričnih nevronov in skrajšanja njihove življenjske dobe.<sup>80</sup>

### SPG11 (Spataksin)

Klinično prekrivanje med ALS in dedno spastično paraplegijo je vodilo do odkritja mutacij v genu *SPG11* pri redki obliki avtosomno-recesivne zgodnje oblike ALS.<sup>30</sup> Zanj je značilno počasno napredovanje bolezni in dolgo preživetje. Večina bolnikov ima bulbarne simptome bolezni brez kognitivnih pomankljivosti.<sup>30</sup> Fiziološka funkcija spataksina še ni pojasnjena.

### ANG (Angiogenin)

Mutacije v genu *ANG* se pojavljajo pri približno 0,5 % bolnikov z ALS in v enakem odstotku pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo.<sup>81</sup> Bolezen se pri 60 % bolnikov ALS z mutacijo v tem genu prične bulbarno.<sup>35</sup> Protein *ANG* spada v družino pankreatične

**Tabela 1:** Geni, ki so udeleženi pri nastanku bolezni ALS (prirejeno po Su in sod. 2014,<sup>84</sup>)

Gen	Funkcija	Fenotip	Epidemiologija	Referenca
<i>ALS2</i>	celični transport*	j-ALS, PLS, HSP	<1 % FALS	33
<i>ANG</i>	metabolizem RNA	ALS, PD	<1 % ALS	35
<i>ATXN2</i>	metabolizem RNA*	ALS, SCA2	ni podatkov	28
<i>C9ORF72</i>	metabolizem RNA*	ALS, FTD	40 % FALS, 5–6 % SALS	36
<i>DAO</i>	glutamatergično signaliziranje	ALS	<1 % FALS	29
<i>FIG4</i>	metabolizem proteinov*	ALS, PLS, CMT	2 % ALS	83
<i>FUS</i>	metabolizem DNA/RNA	ALS, j-ALS, FTD	5 % FALS, <1 % SALS	21
<i>OPTN</i>	metabolizem proteinov	ALS	<1 % FALS	22
<i>PFN1</i>	rast aksonov	ALS	<1 % FALS	31
<i>SETX</i>	metabolizem DNA/RNA	j-ALS	<1 % FALS	34
<i>SOD1</i>	preprečevanje poškodb zaradi kisikovih zvrsti	ALS, FTD, PMA	20 % FALS, 3 % SALS	13
<i>SPG11</i>	funkcija pri zorenju nevronov*	j-ALS, HSP	ni podatkov	30
<i>SQSTM1</i>	metabolizem proteinov	ALS, FTD, IBMPFD	<2 % ALS	82
<i>TARDBP</i>	metabolizem DNA/RNA	ALS, FTD	3 % FALS, 2 % SALS	19
<i>UBQLN2</i>	metabolizem proteinov	ALS, FTD	<2 % FALS	11
<i>VAPB</i>	celični transport	ALS, PMA	<1 % FALS	32
<i>VCP</i>	metabolizem proteinov	ALS, FTD, IBMPFD	1–2 % FALS	23

Legenda: ALS – amiotrofična lateralna skleroz; FALS – dedna oblika ALS; FTD – frontotemporalna demenca; j – mladostniška oblika ALS; HSP – dedna spastična paraplegija; PD – Parkinsonova bolezen; PLS – primarna lateralna skleroz; PMA – progresivna mišična atrofija; SALS – sporadična oblika ALS; IBMPFD – miopatija z inkluzijskimi telesci, Pagetova bolezen in frontotemporalna demenca; SCA2 – spinocerebralna ataksija; CMT – Charcot-Marie-Tooth  
\*predvidena funkcija

ribonukleaze A (RNAza A). Pri bolnikih z ALS, ki imajo mutacijo v tem genu, so opazili izgubo RNAzne aktivnosti. Mutiran gen naj bi torej povzročal bolezen zaradi izgube funkcije endogenega angiogenina.

### SQSTM1 (Sekvestosom 1)

Glavni patogeni protein, ki se nalaga pri nevrodegeneraciji, je p62, ki ga kodira gen *SQSTM1*. Znano je, da mutacije v tem genu povzročijo Pagetovo bolezen kosti,<sup>82</sup> mutirani *SQSTM1* pa so kasneje določili tudi v približno 1 % bolnikov z ALS.<sup>26</sup> P62 uravnava vezavo ubikvitina in aktiviranje signaliziranja jedrnega dejavnika kappa-B.<sup>82</sup>

### FIG4 (Fig4 fosfoinozitol 5-fosfataza)

Mutacija v genu *FIG4* je vzrok za bolezen Charcot-Marie-Tooth tipa 4J. Gre za avtosomalno recesivno motorično in senzorno nevropatijo.<sup>83</sup> Kasneje pa so mutacije v tem genu povezali tudi z avtosomno-dominantno dedno obliko ALS in sporadično obliko ALS. Mutacije so našli pri 2 % evropske populacije z ALS in primarno lateralno sklerozo (PLS).<sup>27</sup>

### DAO (D-aminokislinska oksidaza)

Nekaj mutacij so odkrili v genu *DAO*. Mutacija R199W povzroča avtosomno-dominantno dedno obliko ALS. Ko se mutacija izraža v nevronskih celičnih linijah, pride do zmanjšane viabilnosti celic, hkrati pa spodbuja tvorbo ubikvitiniranih agregatov.<sup>29</sup>

Tabela 1 povezuje pri bolezni ALS najpogostejše mutirane gene z njihovo fiziološko funkcijo, fenotipom bolezni in epidemiologijo.

## Asociacijske študije po celotnem genomu – GWAS (angl. Genome-Wide Association Studies)

Pri pristopu GWAS se pregleda celotni genom, da bi identificirali skupne alele, ki imajo nizko penetranco. Primerjajo se frekvence alelov številnih skupnih polimorfizmov posameznega nukleotida – SNP (angl.

Single Nucleotide Polymorphism) med veliko skupino bolnikov in zdravo populacijo. Rezultat takšnih študij je nabor kandidatnih genov, ki jih lahko potrdimo npr. s sekvenciranjem. Študije GWAS so pomembno orodje v genetiki, saj omogočajo vpogled v arhitekturo alelov pri kompleksnih boleznih. Na primeru bolezni ALS je bilo narejenih že kar nekaj takšnih študij. Nekateri od kandidatnih genov pa so *FLJ1098675*, *ITPR2*, *DPP6*, *ELP3* in *UNC13*.<sup>9</sup> Vendar pa zaenkrat pri bolnikih še niso uspeli dokazati nobenih pomembnih sprememb v teh genih.<sup>24</sup> Pri heterogenih boleznih, kot je ALS, to ni presenetljivo, saj se verjetno skupni SNP ne pojavljajo dovolj pogosto, da bi lahko potrdili povezavo z boleznijo.<sup>9</sup> Vendar pa je bilo s pomočjo GWAS potrjeno z ALS povezano področje na kromosomu 9p21, kar je vodilo do odkritja ekspanzije heksanukleotidne ponovitve v genu *C9ORF72*, najpogostejše doslej poznane genetske okvare, povezane z ALS.<sup>25,36</sup> Pred kratkim pa so z obsežno GWAS metaanalizo določili še en nov z ALS povezani lokus na kromosomu 17q11.<sup>85</sup>

## Oligogenska hipoteza dedovanja pri ALS

Po oligogenskem modelu so za nastanek bolezni potrebne mutacije v dveh ali več genih hkrati. V zadnjem času so v več študijah poročali o odkritju mutacij v več kot enem z ALS povezanim genom pri bolnikih z ALS. Ponavadi gre za ekspanzijo ponovitev v genu *C9ORF72* in še eno mutacijo v enem od naslednjih genov: *GRN*, *ANG*, *DAO*, *MAPT*, *TARDBP*, *OPTN*, *UBQLN2*, *VAPB*, *SOD1* ali *FUS*. Poleg mutacije v genu *ANG* pa so odkrili tudi mutacijo v genu *SOD1*, *FUS* ali *TARDBP*. Ti izsledki nakazujejo na morebitni oligogenski model razvoja bolezni ALS.<sup>9</sup>

Vendar obstaja tudi več drugih možnih predpostavk, namreč da ena od mutacij ni patogena, ali da je ena od mutacij primarna, druga mutacija pa le vpliva na začetek pojava bolezni, njene simptome in napredovanje ali pa celo, da med mutacijami ni nobene medsebojne genetske interakcije.<sup>9</sup> Za potrditev oligogenskega modela v povezavi z ALS bo potrebno narediti obširne študije po

celotnem genomu na velikem številu bolnikov.<sup>17</sup>

## Genetsko in fenotipsko prekrivanje FALS, SALS in drugih bolezni

Odkritje, da so konstitutivne spremembe v genu *C9ORF72* odgovorne za sorazmerno velik delež sporadičnih primerov ALS, je vodilo do spoznanja, da je genetska komponenta ključna za nastanek vseh oblik bolezni ALS, družinskih in sporadičnih, in da vplivi okolja verjetno le dodajo svoj prispevek k posameznikom, genetsko dovzetnim za bolezen.<sup>17</sup>

Čim več odkrijemo o genetiki ALS, s tem bolj kompleksnimi fenotipi jo lahko povežemo. Klinična opažanja, da se bolezen ALS in FTD prekrivata v nekaterih simptomih, so se potrdila tudi na genetski ravni z napakami v skupnih genih, kot so *C9ORF72*, *FUS*, *SOD1*, *TARDBP* (Tabela 1). Poleg tega pa se ALS vsaj v nekaterih primerih, kadar so prisotne napake v genih *VCP* in *SQSTM1*, izraža ne samo v centralnem živčnem sistemu, ampak so prizadeta tudi tkiva mišic in kosti. Po drugi strani pa so geni, ki so vključeni v druge bolezni motoričnih nevronov, kot sta bolezen Charcot-Marie-Tooth in dnevna spastična paraplegija, povezani tudi z ALS (Tabela 1). Razširitev poliglutaminskih ponovitev v kodirajočem področju gena *ATXN2* povzroči eno od oblik spinocerebralne ataksije (SCA2), ki si z ALS deli določene klinične pa tudi genetske značilnosti, saj razširjene poliglutaminske ponovitve v genu *ATXN2* povečajo dovzetnost za nastanek ALS.<sup>28</sup> Gen *ANG* pa je vključen tako v patogenezo ALS kakor tudi Parkinsonove bolezni<sup>81</sup> (Tabela 1).

## Epigenetski dejavniki z vplivom na ALS

Na ALS patofiziologijo lahko vplivajo tudi epigenetski dejavniki. Epigenetski dejavniki so dejavniki, ki vplivajo na izražanje genov neodvisno od zaporedja DNA. Najbolj znan epigenetski mehanizem je metilacija DNA, ki vpliva (zavira) na transkripcijo

in tako zmanjša ali celo prepreči izražanje gena.<sup>86</sup> Na bolnikih z ALS je bilo narejenih nekaj raziskav, ki kažejo na spremenjene vzorce metilacije DNA. Pride do povečanega izražanja DNA-metil transferaz (Dnmt), ki so sicer nujne za normalen razvoj živčnega sistema in tako do povečane metilacije DNA, kar lahko vodi v apoptozo motoričnih nevronov.<sup>87</sup> Spremenjene vzorce metilacije v genih, ki uravnavajo ravni kalcija, ekzitotoksičnost, oksidativni stres, vnetje živcev, razvoj možganov, življenjsko dobo celic in apoptozo pa so dokazali tudi v možganih bolnikov ALS po smrti.<sup>88,89</sup> Xi in sodelavci v nedavni raziskavi poročajo o hipermetilaciji otoka CpG pred ponovitvami GGGGCC v prvem intronu gena *C9ORF72*. Pokazali so, da je hipermetilacija te regije povezana s pojavom ekspanzije heksanukleotidnih ponovitev. Višja stopnja metilacije pomeni tudi krajše preživetje bolnikov od začetka simptomov bolezni ALS.<sup>90</sup>

Izražanje genov pa preko epigenetskih mehanizmov uravnavajo tudi mikroRNA (miRNA). Buratti in sod. so utišali gen *TDP-43* in opazovali, kakšne so spremembe v populaciji miRNA v celicah. Prišlo je do povečanega izražanja miR-663 in zmanjšanega izražanja let-7b. Obe miRNA se neposredno vežeta na TDP-43. Jedrni kompleks Drosha je eden glavnih encimov, ki so udeleženi pri biogenezi miRNA. Vplivi TDP-43 na miRNA populacijo so zanimivi tudi zaradi prejšnjih ugotovitev, da je TDP-43 komponenta kompleksa Drosha in tudi zaradi vedno večje vloge miRNA izražanja pri mnogih neurodegenerativnih boleznih.<sup>91</sup> Pred kratkim pa je bila objavljena študija, v kateri so preučevali profile miRNA v serumu bolnikov z družinsko obliko bolezni ALS. Ugotovili so, da je profil miRNA homogen ne glede na to, v katerem genu ima bolnik prisotno mutacijo. Zaznali so kar 24 miRNA z zmanjšanim izražanjem celo pri osebah, ki imajo mutacijo, vendar še ne kažejo simptomov bolezni. Izsledki te študije nakazujejo, da obstajajo povezave med različnimi geni, ki so mutirani v povezavi z ALS, in da so ti skupni imenovalci tudi molekule miRNA.<sup>92</sup>



## Zaključek

Od odkritja prvega gena, povezanega z ALS pred 20 leti, se je znanje močno poglobilo in področje genomike bo verjetno tudi v prihodnosti najpomembnejše pri odkrivanju neznanega v povezavi z ALS. Sekvenciranje genoma bolnikov bo dalo še podrobnejši vpogled v genetsko arhitekturo ALS, ko bodo odkrite redke variante in bo možno raziskovati vpliv nekodirajočih in medgen-

skih regij na degeneracijo motoričnih nevronov. Veliko obetajo tudi raziskave epigenetskih procesov. V kombinaciji z genetskim zdravljenjem je upati, da bodo v prihodnjih 20 letih zdajšnja teoretična znanja o bolezni postala učinkovita terapijska dejstva.

V Sloveniji smo nedavno zaključili prvo genetsko analizo bolnikov z ALS,<sup>93</sup> v teku pa so tudi epigenetske raziskave, predvsem metilacije in mikroRNA.

## Literatura

1. Wijesekera, L.C. & Leigh, P.N. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009; 4: 3.
2. Colombrita, C. RNA-binding proteins and RNA metabolism: a new scenario in the pathogenesis of Amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol* 2011; 149: 83–99.
3. Chio, A. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* 2013; 41: 118–30.
4. Bocci, T. et al. Differential motor neuron impairment and axonal regeneration in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations: lessons from neurophysiology. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 9203–15.
5. Kabashi, E. et al. FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002214.
6. Logroscino, G. et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 385–90.
7. Strong, M.J., Hudson, A.J. & Alford, W.G. Familial amyotrophic lateral sclerosis, 1850–1989: a statistical analysis of the world literature. *Can J Neurol Sci* 1991; 18: 45–58.
8. Byrne, S. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 623–7.
9. Leblond, C.S., Kaneb, H.M., Dion, P.A. & Rouleau, G.A. Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2014; 262:91–101
10. Aaltonen, L.A. et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812–6.
11. Deng, H.X. et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 2011; 477: 211–5.
12. Siddique, T. et al. Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1989; 39: 919–25.
13. Rosen, D.R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 364: 362.
14. Li, T.M., Alberman, E. & Swash, M. Comparison of sporadic and familial disease amongst 580 cases of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 778–84.
15. Liscic, R.M., Grinberg, L.T., Zidar, J., Gitcho, M.A. & Cairns, N.J. ALS and FTL: two faces of TDP-43 proteinopathy. *Eur J Neurol* 2008; 15: 772–80.
16. Andersen, P.M. & Al-Chalabi, A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 603–15.
17. Renton, A.E., Chio, A. & Traynor, B.J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 2014; 17: 17–23.
18. Kabashi, E. et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008; 40: 572–4.
19. Sreedharan, J. et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668–72.
20. Kwiatkowski, T.J. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205–8.
21. Vance, C. et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009; 323: 1208–11.
22. Maruyama, H. et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010; 465: 223–6.
23. Johnson, J.O. et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 2010; 68: 857–64.
24. Koppers, M. et al. Screening for rare variants in the coding region of ALS-associated genes at 9p21.2 and 19p13.3. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 1518.e5–7.
25. DeJesus-Hernandez, M. et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9orf72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245–56.
26. Fecto, F. et al. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2011; 68: 1440–6.
27. Chow, C.Y. et al. Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 85–8.
28. Elden, A.C. et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 2010; 466: 1069–75.
29. Mitchell, J. et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7556–61.
30. Orlacchio, A. et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2010; 133: 591–8.
31. Wu, C.H. et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2012; 488: 499–503.

32. Nishimura, A.L. et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 822–3.
33. Yang, Y. et al. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2001; 29: 160–5.
34. Chen, Y.Z. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1128–35.
35. Greenway, M.J. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2006; 38: 411–3.
36. Renton, A.E. et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257–68.
37. Rothstein, J.D. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 65 Suppl 1: S3–9.
38. Andersen, P.M. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006; 6: 37–46.
39. Ticozzi, N. Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol* 2011; 149: 65–82.
40. Felbecker, A. Four familial ALS pedigrees discordant for two SOD1 mutations: are all SOD1 mutations pathogenic? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 572–7.
41. Andersen, P.M. Autosomal recessive adult-onset amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for Asp90Ala CuZn-superoxide dismutase mutation. A clinical and genealogical study of 36 patients. *Brain* 1996; 119 ( Pt 4): 1153–72.
42. Cudkovicz, M.E. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1997; 41: 210–21.
43. Turner, M.R. Distinct cerebral lesions in sporadic and 'D90A' SOD1 ALS: studies with [<sup>11</sup>C]flumazenil PET. *Brain* 2005; 128: 1323–9.
44. Mackenzie, I.R. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007; 61: 427–34.
45. Ling, S.C. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 13318–23.
46. Polymenidou, M. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* 2011; 14: 459–68.
47. Neumann, M. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130–3.
48. Buratti, E. & Baralle, F.E. The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration. *Adv Genet* 2009; 66: 1–34.
49. Chio, A. Amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal lobar dementia in 3 families with p.Ala382Thr TARDBP mutations. *Arch Neurol* 2010; 67: 1002–9.
50. Chio, A. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain* 2012; 135: 784–93.
51. Rutherford, N.J. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000193.
52. Wang, H.Y., Wang, I.F., Bose, J. & Shen, C.K. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics* 2004; 83: 130–9.
53. Lagier-Tourenne, C. & Cleveland, D.W. Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* 2009; 136: 1001–4.
54. Yan, J. Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology* 2010; 75: 807–14.
55. Hara, M. Lower motor neuron disease caused by a novel FUS/TLS gene frameshift mutation. *J Neurol* 2012; 259: 2237–9.
56. Deng, H.X. et al. FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67: 739–48.
57. Keller, B.A. Co-aggregation of RNA binding proteins in ALS spinal motor neurons: evidence of a common pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 733–47.
58. Majounie, E. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 323–30.
59. Byrne, S. Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 232–40.
60. Floris, G. Frontotemporal dementia with psychosis, parkinsonism, visuo-spatial dysfunction, upper motor neuron involvement associated to expansion of C9ORF72: a peculiar phenotype? *J Neurol* 2012; 259: 1749–51.
61. Cooper-Knock, J. Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain* 2012; 135: 751–64.
62. Alzu, A. et al. Senataxin associates with replication forks to protect fork integrity across RNA-polymerase-II-transcribed genes. *Cell* 2012; 151: 835–46.
63. Williams, K.L. UBQLN2/ubiquilin 2 mutation and pathology in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 2527.e3–10.
64. Chen, H.J. Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2010; 285: 40266–81.
65. Tsuda, H. The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors. *Cell* 2008; 133: 963–77.
66. Daoud, H. Association of long ATXN2 CAG repeat sizes with increased risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2011; 68: 739–42.
67. Farg, M.A. Ataxin-2 interacts with FUS and intermediate-length polyglutamine expansions enhance FUS-related pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 717–28.
68. Del Bo, R. Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 1239–43.

69. Kachaner, D., Genin, P., Laplantine, E. & Weil, R. Toward an integrative view of Optineurin functions. *Cell Cycle* 2012; 11: 2808–18.
70. Rezaie, T. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002; 295: 1077–9.
71. Osawa, T. Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 2011; 31: 569–74.
72. Albagha, O.M. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 2010; 42: 520–4.
73. Koppers, M. VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 837.e7–13.
74. Watts, G.D. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 2004; 36: 377–81.
75. Rohrer, J.D. A novel exon 2 I27V VCP variant is associated with dissimilar clinical syndromes. *J Neurol* 2011; 258: 1494–6.
76. Meyer, H., Bug, M. & Bremer, S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 117–23.
77. Lattante, S., Le Ber, I., Camuzat, A., Brice, A. & Kabashi, E. Mutations in the PFN1 gene are not a common cause in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration in France. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 1709.e1–2.
78. Chandran, J., Ding, J. & Cai, H. Alsin and the molecular pathways of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol* 2007; 36: 224–31.
79. Kanekura, K. Alsin, the product of ALS2 gene, suppresses SOD1 mutant neurotoxicity through RhoGEF domain by interacting with SOD1 mutants. *J Biol Chem* 2004; 279: 19247–56.
80. Jacquier, A. Alsin/Rac1 signaling controls survival and growth of spinal motoneurons. *Ann Neurol* 2006; 60: 105–17.
81. van Es, M.A. Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2011; 70: 964–73.
82. Laurin, N., Brown, J.P., Morissette, J. & Raymond, V. Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1582–8.
83. Chow, C.Y. et al. Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 2007; 448: 68–72.
84. Su, X.W., Broach, J.R., Connor, J.R., Gerhard, G.S. & Simmons, Z. Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical practice and research. *Muscle Nerve* 2014; 49: 786–803.
85. Fogh, I. A genome-wide association meta-analysis identifies a novel locus at 17q11.2 associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2220–31.
86. Urduinguio, R.G., Sanchez-Mut, J.V. & Esteller, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 2009; 8: 1056–72.
87. Chestnut, B.A. Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *J Neurosci* 2011; 31: 16619–36.
88. Morahan, J.M., Yu, B., Trent, R.J. & Pamphlett, R. A genome-wide analysis of brain DNA methylation identifies new candidate genes for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; 10: 418–29.
89. Figueroa-Romero, C. Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2012; 7: e52672.
90. Xi, Z. Hypermethylation of the CpG Island Near the GC Repeat in ALS with a C9orf72 Expansion. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 981–9.
91. Buratti, E. Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS J* 2010; 277: 2268–81.
92. Freischmidt, A. Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain* 2014; 137: 2938–50.
93. Vrabec, K. Genetic analysis of amyotrophic lateral sclerosis in the Slovenian population. *Neurobiol Aging* 2015; 36: 1601.e17–20.