

ΑΡΘΡΟ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ

Νέες μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι και βιοδείκτες για την Πλάγια Μυατροφική Σκλήρυνση (ALS)

Ειρήνη Σπαράκη¹, Γεώργιος Π. Πατρινός^{1,2*}

¹Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας, Πάτρα

²Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Ιατρικής και Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ηνωμένων Αραβικών Εμιράτων, Αλ Αϊν, ΗΑΕ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση ή αλλιώς νόσος του κινητικού νευρώνα (ALS) είναι μια σπάνια διαταραχή η οποία κατατάσσεται σε δύο μορφές: την οικογενή, με ποσοστό 5-10 % των περιπτώσεων, και την σποραδική. Αξίζει να σημειωθεί η κρισιμότητα της έγκαιρης διάγνωσης της για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας, η οποία βασίζεται σε μια κλινική αξιολόγηση που απαιτεί περίπου 12 μήνες. Συνέπεια αυτού αποτελεί η καθυστερημένη χορήγηση των κατάλληλων φαρμάκων, με αποτέλεσμα, νέες μέθοδοι για την διάγνωση της ALS να κρίνονται αναγκαίες. Ο έλεγχος παθογόνων γονιδίων που σχετίζονται με την ALS, αποτελεί ήδη διαγνωστι-

κό εργαλείο. Ωστόσο, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προσυμπτωματικό στάδιο. Επομένως απαιτούνται νέοι βιοδείκτες οι οποίοι θα ευνοήσουν την έγκαιρη ανίχνευση. Συγκεκριμένα, τα λιπίδια εμφανίζονται ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για τον πληθυσμιακό έλεγχο και για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Επιπλέον, η γενετική ανάλυση μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου μέσω της ανάλυσης γονιδίων που την τροποποιούν όπως, το ERHA4 και το CHGB. Στο παρόν κείμενο αναλύονται νέες τεχνικές οι οποίες είναι δυνατό να εφαρμοστούν για την διάγνωση της ALS.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΥΡΗΤΗΡΙΟΥ: Πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, γονιδιωματικοί βιοδείκτες, βιοδείκτες λιπιδίων

* Αντεπιστέλλων Συγγραφέας

Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας, Πανεπιστημιούπολη, Ρίο, 265 04, Πάτρα, Τηλέφωνο: 261 0962339, Email: gpatrinos@upatras.gr

Εισαγωγή

Η ALS χαρακτηρίζεται από έλλειψη των άνω και κάτω κινητικών νευρώνων στον εγκέφαλο και στην σπονδυλική στήλη. Αρχικά, η αδυναμία ξεκινάει εστιακά αλλά επεκτείνεται σε διάφορους μυς. Συνήθως ο θάνατος επέρχεται μέσα σε 3-5 χρόνια, ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις στις οποίες ο ασθενής έχει επιβιώσει έως και 40 χρόνια (Brown & Al-Chalabi, 2017). Η παγκόσμια συχνότητα αυτής της ασθένειας είναι 2 άτομα στα 100.000, εντούτοις, υπάρχουν ορισμένες περιοχές όπως η χερσόνησος Kii στην Ιαπωνία και η νήσος Guam στον Ειρηνικό στις οποίες οι συχνότητα είναι μεγαλύτερη (Brown και συν 2009). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει γίνει αποδεκτό ότι περίπου το 15-20% των ατόμων με ALS εμφανίζουν άνοια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι διάφορα βιολογικά μονοπάτια επηρεάζονται σε αυτή την ασθένεια, συμπεριλαμβανομένου, εκείνου της διεγερτοτοξικότητας που προκαλείται από την μεσολάβηση του υποδοχέα του γλουταμινικού οξέος ενώ, εμφανίζονται και δυσλειτουργίες στην δυναμική του κυτταροσκελετού, στην αξονική μεταφορά, στον μεταβολισμό του RNA, στην ομοιόσταση, στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, κ.λπ. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται επίσης από μη φυσιολογική συσσώρευση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα. Το ένζυμο TDP-43 υπάρχει στα περισσότερα από τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα ασθενών με ALS εκτός από τις περιπτώσεις που προκαλούνται από παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *SOD1* ή του *FUS*, εκείνα δηλαδή που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες *SOD1* και *FUS* (Blokhuys και συν 2013). Επί του παρόντος, η διάγνωση της ALS βασίζεται στην κλινική αξιολόγηση και την ηλεκτροφυσιολογική μελέτη. Συνήθως υπάρχει σημαντική καθυστέρηση μεταξύ της εμφάνισης των συμπτωμάτων και της τελικής διάγνωσης. Η εξέλιξη της ALS εκτιμάται από το ALSFRS-R, που είναι ένα ερωτηματολόγιο το οποίο αξιολογεί ορισμένες ικανότητες (ομιλία, σιελόρροια, κατάποση, γραφή, κοπή φαγητού, ντύσιμο και υγιεινή, συστοφή κατά τον ύπνο, περπάτημα, αναρρίχηση, δύσπνοια, ορθόπνοια και αναπνευστική ανεπάρκεια) για κάθε ικανότητα δίνεται μια βαθμολογία μεταξύ 0 και 4, με το 4 να είναι η φυσιολογική και το 0 να είναι η πλήρης ανικανότητα για την εκτέλεση. Γενικά, η ALS είναι μια εξαιρετικά γενετικά ετερογενής ασθένεια στην εξέλιξη της οποίας εμπλέκονται πολλά γονίδια (Chen και συν 2013; Dion και συν, 2009; Hardiman και συν, 2017).

Η ετερογένεια αυτή αυξάνεται περαιτέρω, αφού έχουν προταθεί ως αίτια εμφάνισης ενός υποσυνόλου περιπτώσεων της ALS και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Παραδείγματα περιβαλλοντικών παραγόντων που πι-

θανώς εμπλέκονται στην ALS είναι τα οργανοφωσφορικά, τα φυτοφάρμακα, τα βαρέα μέταλλα, οι νευροτοξίνες κ.λπ. Η έκθεση σε β-μεθυλαμινο-L-αλανίνη, μια νευροτοξίνη που βρίσκεται στα κυκαδόφυτα, οι σπόροι των οποίων καταναλώνονται στη νήσο Γκουάμ, θεωρείται ότι ευθύνεται για την αύξηση του αριθμού κρουσμάτων της ALS (Mitchell, 2000; Yu και συν 2017). Μια ευρεία μελέτη ανέλυσε δεδομένα από 6.274 ασθενείς με ALS και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η εκδήλωση της ALS είναι μια διαδικασία που αποτελείται από 6 βήματα (Al-Chalabi και συν, 2014).

Επί του παρόντος, δύο φάρμακα έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία της ALS: η Ριλουζόλη και η Εδαράβονη. Η Ριλουζόλη καταστέλλει την υπερβολική διέγερση των νευρικών κινητικών ινών, παρέχοντας έτσι ελαφρά βελτίωση των συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, αδρανοποιεί τα τασεοεξαρτώμενα κανάλια νατρίου και είναι ένας μη ανταγωνιστικός αναστολέας των υποδοχέων του N-μεθυλο- γ -ασπαρτικού οξέος (NMDA). Ενώ η Εδαράβονη εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, μειώνει το οξειδωτικό στρες και ως αποτέλεσμα καθυστερεί την εξέλιξη της νόσου. Συνεπώς, συνήθως συστήνεται ένας συνδυασμός των δύο αυτών φαρμάκων (Sawada, 2017).

Διάγνωση της ALS

Η διαδικασία της διάγνωσης μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από ένα χρόνο, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική καθυστέρηση της θεραπείας. Η σημασία της έγκαιρης διάγνωσης έγκειται στο ότι αν και η Ριλουζόλη έχει χαμηλή θεραπευτική αποτελεσματικότητα, η έγκαιρη χορήγησή της έχει καλύτερα κλινικά αποτελέσματα (Zoung και συν 2006). Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη νέων μοριακών βιοδεικτών για τη διάγνωση της ALS έχει μεγάλη σημασία. Τα βιορευστά είναι τα πιο σημαντικά βιολογικά δείγματα για την πραγματοποίηση της κλινικής διάγνωσης. Συγκεκριμένα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) αποτελεί μια πολύ καλή πηγή βιοδεικτών για νευροεκφυλιστικές διαταραχές καθώς έρχεται σε επαφή με τον νευρικό ιστό. Συνεπώς, περιέχει πρωτεΐνες και μεταβολίτες που μπορούν να υποδείξουν την παρουσία και την έκταση του νευροεκφυλισμού. Από την άλλη πλευρά, η λήψη αίματος αποτελεί μια εύχρηστη τεχνική. Κατά συνέπεια, το αίμα είναι το κύριο βιολογικό υγρό που χρησιμοποιείται στην ανίχνευση βιοδεικτών διαφόρων διαταραχών (Robelin & De Aguilar, 2014). Επιπροσθέτως, τα ούρα δεν απαιτούν επεμβατικές μεθόδους για να συλλεχθούν και μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πηγή βιοδεικτών. Τέλος, υπό εξέταση βρίσκεται το ενδεχόμενο να αποτελέσουν οι βιοψίες πηγή βιοδεικτών.

Γονιδιωματικοί βιοδείκτες: Προσδιορισμός της γενετικής βάσης της ALS

Η γενετική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για :

1. Κλινική διάγνωση
2. Προσδιορισμό των παραλλαγών της ασθένειας
3. Προσδιορισμό του κινδύνου εκδήλωσης της ασθένειας
4. Προσδιορισμό του μηχανισμού υπό τον οποίο εξελίσσεται η ασθένεια
5. Καλύτερη ομαδοποίηση των ασθενών, το οποίο οδηγεί σε αποτελεσματικότερες κλινικές δοκιμές και θεραπευτικές στρατηγικές

Η έγκαιρη αναγνώριση των προσυμπτωματικών ατόμων που έχουν στο γονιδίωμά τους παθολογικές παραλλαγές ορισμένων γονιδίων θα οδηγήσει στην ταχύτερη έναρξη της θεραπείας, γεγονός που θα καθυστερήσει την έναρξη των συμπτωμάτων. Σύμφωνα με τις μελέτες, ο αριθμός των γονιδίων που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ALS αυξάνεται συνεχώς. Πρακτικά, κάθε γενετική παραλλαγή ορισμένων γονιδίων αποτελεί έναν νέο γενετικό βιοδείκτη, ο οποίος μπορεί να αξιοποιηθεί στην διάγνωση της ασθένειας. Επί του παρόντος, οι δύο κύριες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση νέων παθογόνων μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ALS είναι η μελέτη συσχέτισης των πολυμορφισμών των γονιδίων με χαρακτηριστικά του φαινοτύπου, σε γονιδιωματικό εύρος (GWAS) και η διαδικασία της αλληλούχησης όλων των εξωνίων του γονιδιώματος (WES). Στον Πίνακα 1 Παρουσιάζονται γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της ALS σε χρονολογική σειρά.

Πρόσφατα, μια μετα-ανάλυση έδειξε ότι η πιο συχνή παραλλαγή γονιδίου στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι η επανάληψη του εξανουκλεοτιδίου GGGGCC στο γονίδιο *C9ORF72* ενώ ακολουθούν οι παθογόνες παραλλαγές των γονιδίων *SOD1*, *TDP-43* και στην συνέχεια του *FUS*. Στους ασιατικούς πληθυσμούς, η πιο κοινή παθογόνος παραλλαγή είναι του γονιδίου *SOD1* μετά είναι του *FUS* και ακολουθεί η επανάληψη του εξανουκλεοτιδίου GGGGCC στο *C9ORF72*. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, πάνω σε παραλλαγές γονιδίων που έχουν παρατηρηθεί, οι παθογόνες παραλλαγές του *KIF5A* φαίνεται να εμφανίζονται κατά κόρον στον ευρωπαϊκό πληθυσμό. Μεταξύ των παραλλαγών, που έχουν πρόσφατα παρατηρηθεί, οι παραλλαγές του γονιδίου *FTO* εντοπίζονται κυρίως στον ελληνικό πληθυσμό. Οι παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *NEK1* αποτελούν παράγοντα κινδύνου για τον πληθυσμό της Κίνας (Gratten και συν,

2017). Αυτά τα ευρήματα μπορούν να αξιοποιηθούν στην δημιουργία νέων γενετικών τεχνικών. Πρόσφατα η *NeuroX* τροποποιήθηκε ώστε να μπορεί να συντελέσει στην διάγνωση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μεταξύ αυτών και της ALS. Ενδεχομένως, οι προαναφερθείσες παραλλαγές να αποτελούν την αιτία άλλων νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Για παράδειγμα, μια παραλλαγή του γονιδίου *OPTN* είναι γνωστό ότι προκαλεί και πρωτοπαθές γλαύκωμα ανοικτής γωνίας. Επιπλέον, οι παραλλαγές στο N-τελικό άκρο του προϊόντος του *KIF5A* αναφέρεται ότι προκαλούν σπαστική παραπληγία (*HSP10*) και νόσο Charcot-Marie-Tooth τύπου 2 (*CMT2*), ενώ οι παραλλαγές στο C-τελικό άκρο συνδέονται με την εξέλιξη της ALS.

Γονίδια τα οποία επηρεάζουν την εξέλιξη της ALS

Παραλλαγές ορισμένων γονιδίων μπορούν να επηρεάσουν την εξέλιξη της ALS και την επιβίωση ασθενών με ALS. Η ταυτοποίηση των γονιδίων που επηρεάζουν την επιβίωση ασθενών με ALS θα μπορούσε να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για τον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών, γιατί παρέχει νέους πιθανούς φαρμακολογικούς στόχους. Πιο αναλυτικά, το GWAS έχει εντοπίσει γονίδια που επηρεάζουν τον φαινότυπο της ALS, συγκεκριμένα το *CX3CR1* και το *EPHA4* είναι τα πιο εκτενώς μελετημένα. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι η αποσιώπηση ορισμένων παραλλαγών του *EPHA4* επηρεάζει το προσδόκιμο ζωής των ασθενών (Van Hoecke και συν, 2012). Επίσης, η έλλειψη ενός αλληλομόρφου του *EPHA4* σε διαγονιδιακά ποντίκια *SOD1G93A* συνέβαλε στην επιβίωσή τους. Οι ασθενείς με ALS που φέρουν το αλληλόμορφο *CX3CR1 249I/I* και το *V/I* σε σχέση με αυτούς που φέρουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο *V/V* φαίνεται να έχουν περίπου 25 μήνες μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης (Lopez-Lopez και συν, 2014).

Ακόμη, μελετάται ο ρόλος του *CXCR1* στην εξέλιξη της ALS σε ζώα. Πιο συγκεκριμένα, διασταυρώθηκαν ποντίκια *Cx3cr1-/-* με ποντίκια *Tg-SOD1G93A*, και πρόεκυψαν ποντίκια με *Tg-SOD1G93A Cx3cr1-/-* τα οποία εμφάνιζαν μικρότερο ποσοστό επιβίωσης (Cardona και συν, 2006). Πρόσφατα βρέθηκε ότι η παραλλαγή *V249I* του γονιδίου *CX3CR1* επηρεάζει την νόσο του Alzheimer. Ένας ακόμη βιοδείκτης κινδύνου για την ALS είναι η παραλλαγή *P413L* της χρωμογρανίνης *B4 (CHGB)* η οποία έχει συσχετιστεί με την πρόωμη έναρξη της ALS σε ασθενείς γαλλοκαναδικής καταγωγής (Gross-Louis και συν, 2009). Μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ότι η παραλλαγή

Πίνακας 1. Παρουσιάζονται γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της ALS σε χρονολογική σειρά.

Γονίδιο	Θέση στο Χρωμόσωμα	Χρονολογία	Γενετικός Υπότυπος	Συσχέτιση με άλλη ασθένεια	Αναφορές
ERLIN1	10q24.31	2018	Δ.Ε.	NAI	Tunca et al., 2018
KIF5A	12q13.3	2018	Δ.Ε.	NAI	Brenner et al., 2018
TIA1	2p13.3	2017	Δ.Ε.	NAI	Mackenzie et al., 2017
FTO	16q12.2	2017	Δ.Ε.	NAI	Mitropoulos et al., 2017
CFAP410 (C21ORF2)	21q22.3	2016	Δ.Ε.	NAI	van Rheenen et al., 2016
CCNF	16p13.3	2016	Δ.Ε.	Δ.Α.	Williams et al., 2016
NEK1	4q33	2016	Δ.Ε.	NAI	Kenna et al., 2016
TBK1	12q14.2	2015	ALS-FTD4	Δ.Α.	Cirulli et al., 2015
GLE1	9q34.11	2015	Δ.Ε.	NAI	Kaneb et al., 2015
CHCHD	22q11.23	2014	ALS-FTD2	NAI	Bannwarth et al., 2014
MATR3	5q31.2	2014	ALS21	NAI	Johnson et al., 2014
TUBA4A	2q35	2014	ALS22	Δ.Α.	Smith et al., 2014
HNRNPA1	12q13	2013	ALS20	NAI	Kim et al., 2013
HNRNPA1	7p15 2013	2013	Δ.Ε.	NAI	Kim et al., 2013
ERBB4	2q34	2013	ALS19	Δ.Α.	Takahashi et al., 2013
PFN1	17p13	2012	ALS18	Δ.Α.	Wu et al., 2012
C9ORF72	9p21	2011	ALS-FTD1	NAI	Renton et al., 2011; DeJesusHernandez et al., 2011
SQSTM1	5q35	2011	ALS-FTD3	NAI	Fecto et al., 2011
UBQLN2	Xp11	2011	ALS15	Δ.Α.	Deng et al., 2011
SIGMAR1	9p13.3	2011	ALS16	NAI	Al-Saif, Al-Mohanna, & Bohlega, 2011
TAF15	17q12	2011	Δ.Ε.	Δ.Α.	Couthouis et al., 2011
ATXN2	12q24	2010	ALS13	NAI	Elden et al., 2010
OPTN	10p13	2010	ALS12	NAI	Maruyama et al., 2010
SPG11	15q14	2010	ALS5	NAI	Orlacchio et al., 2010
VCP	9p13	2010	Δ.Ε.	NAI	Johnson et al., 2010
DAO	12q24	2010	Δ.Ε.	Δ.Α.	Mitchell et al., 2010
ELP3	8p21	2009	Δ.Ε.	Δ.Α.	Simpson et al., 2009
FUS	16p11	2009	ALS6	NAI	Vance et al., 2009
TARDBP	1p36	2009	ALS10	NAI	Sreedharan et al., 2008
FIG4	6q21	2009	ALS11	NAI	Chow et al., 2009
ANG	14q11	2006	ALS9	Δ.Α.	Greenway et al., 2006
CHMP2B	3p11	2006	Δ.Ε.	NAI	Parkinson et al., 2006
VAPB	20q13	2004	ALS8	NAI	Nishimura et al., 2004
DCTN1	2p13	2003	Δ.Ε.	NAI	Puls et al., 2003
ALS2, ALSIN	2q33	2001	ALS2	NAI	Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001
SETX	9q34	1998	ALS4	NAI	Chance et al., 1998
NEFH	22q12	1994	Δ.Ε.	NAI	Figlewicz et al., 1994
SOD1	21q22	1993	ALS1	Δ.Α.	Bowling, Schulz, Brown, & Beal, 1993

Υποσημείωση: Δ.Ε. = Δεν εφαρμόζεται

P413L σχετίζεται με την καθυστερημένη έναρξη των συμπτωμάτων της ALS σε γυναίκες με Ιαπωνική ή Γαλλοκαναδική προέλευση (Ohta και συν, 2016). Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί συσχέτιση με Γάλλους (Blasco και συν, 2011a; Ohta και συν, 2016), Σουηδούς (Ohta και συν, 2016) και Ιταλούς (Ricci και συν, 2015) ασθενείς. Αντίστοιχα, ο πολυμορφισμός (SNP) rs11737023 στο γονίδιο *PPARGC1A* σχετίζεται με την κατά 8 χρόνια νωρίτερα εμφάνιση της ALS στον ανδρικό πληθυσμό (Eschbach και συν, 2013).

Επιπλέον, σύμφωνα με γαλλική μελέτη που επικεντρώνεται στον πολυμορφισμό rs407135 (αλληλόμορφο C) του γονιδίου *SLC11A2* που κωδικοποιεί τον μεταφορέα I δισθενούς σιδήρου, ο οποίος μεσολαβεί στη μεταφορά σιδήρου στα εγκεφαλικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα και η οποία περιελάμβανε 579 ασθενείς με ALS οι φορείς αυτού του αλληλομόρφου (A/C ή C/C) εμφάνιζαν επιβίωση μειωμένη κατά 17 μήνες. Τα SNPs που έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την επιβίωση ασθενών με ALS περιλαμβάνουν το rs1541160 στο γονίδιο *KIFAP3*, που σχετίζεται με μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης ασθενών με ALS κατά 14-14,9 μήνες (Landers και συν, 2009) και το rs12608932 στο γονίδιο *UNC13A*, που σχετίζεται με μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης 5-10 μήνες (Diekstra και συν, 2012).

Από την άλλη, μελέτη με 185 Ισπανούς ασθενείς με ALS κατέληξε στο ότι οι ασθενείς με ALS, η οποία ξεκινάει από τους προμηκικούς κινητικούς νευρώνες μυών, οι οποίοι έφεραν ομόζυγο γονότυπο (G/G) στον μονοουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs4148646 στο γονίδιο *ABCC8*, είχαν αυξημένη επιβίωση κατά 81 μήνες. Ομοίως, ασθενείς με ALS, η οποία ξεκινάει από τους προμηκικούς κινητικούς νευρώνες, οι οποίοι έφεραν T/T στον πολυμορφισμό rs5219 στο γονίδιο *KCNJ11*, παρουσίαζαν επιβίωση κατά 66 μήνες μεγαλύτερη. Το προϊόν του γονιδίου *KCNJ11* είναι ένα συστατικό του τασοευαίσθητου ATP διαύλου καλίου, και επομένως μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο για διαγνωστικές εφαρμογές όσο και για την ανάπτυξη μελλοντικών θεραπευτικών προσεγγίσεων (Vidal-Taboada και συν, 2018).

Μια μετα-ανάλυση 4.243 ασθενών με ALS και 5.112 μαρτύρων εντόπισε ότι ο γονιδιακός τόπος 1p34.1 σχετίζεται με την πρώιμη έναρξη της ALS (Fogh και συν, 2016). Επίσης, εντοπίστηκε ότι ο γονιδιακός τόπος 1p36 σχετίζεται με αυξημένο προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με ALS. Πιο συγκεκριμένα, πολλαπλά SNPs έχουν εντοπιστεί σε μια περιοχή 90 kb, που περιέχει 3 έως 4 εσώνια του γονιδίου *CAMTA1* και σχετίζονται με παρατεταμένη επιβίωση ασθενών με ALS. Επίσης, ορισμένες παθογόνες παραλλαγές σε γονίδια που σχετίζονται με την ALS μπορούν να καθορίσουν την πορεία

της ασθένειας. Επιπλέον, η παραλλαγή D91A του *SOD1* σχετίζεται με αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης. Συγκεκριμένα, οι ετεροζυγώτες μπορούν να επιβιώσουν πάνω από 40 έτη χωρίς να εμφανίσουν συμπτώματα ασθένειας. Από την άλλη πλευρά, η παραλλαγή A5V σχετίζεται με την μείωση του προσδόκιμου επιβίωσης, το οποίο οριοθετείται σε 12 μήνες από την πρώτη εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου. Οι τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις στο γονίδιο *ATXN2*, αυξάνουν τον κίνδυνο για εμφάνιση της ALS. Είναι ενδιαφέρον, ότι ≥ 34 επαναλήψεις στο *ATXN2* σχετίζονται με το σύνδρομο της παρεγκεφαλιδικής αταξίας (Sironiό και συν, 2017).

Υπάρχουν επίσης παραλλαγές στα γονίδια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό φυτοφάρμακων και βαρέων μετάλλων, τα οποία αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της ALS. Τέτοια γονίδια αποτελούν οι παραοξονάσες (*PON1*, *PON2*, *PON3*), οι μεταλλοθειονεΐνες και άλλα. Τέλος, οι παραλλαγές του γονιδίου *SP110* έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τον κίνδυνο για εμφάνιση εκφυλιστικής μυελοπάθειας σε σκύλους, που είναι το ανάλογο της ALS στους ανθρώπους. Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί αν οι παραλλαγές του *SP110* θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτες κινδύνου στους ανθρώπους (Ivansson και συν, 2016). Όπως έχει αναφερθεί, το εξανουκλεοτιδικό GGGGCC στο γονίδιο *C9ORF72* είναι η πιο κοινή παθολογική παραλλαγή που επηρεάζει την εξέλιξη της ALS. Φυσιολογικά, το γονίδιο *C9ORF72* περιέχει περίπου 30 επαναλήψεις GGGGCC μέσα στο πρώτο του εσώνιο ωστόσο, στους φορείς ALS αυτές οι επαναλήψεις είναι εκατοντάδες ή ακόμα και χιλιάδες (Brown & Al-Chalabi, 2017; Gitler & Tsuiji, 2016). Τα RNA που μεταγράφονται από το γονίδιο *C9ORF72* στη συνέχεια μεταφράζονται με έναν μηχανισμό, κατά τον οποίο δεν χρησιμοποιείται το κωδικόνιο έναρξης, και παράγονται πέντε διαφορετικά πολυπεπτίδια τα πολυ(GA), πολυ(GR), πολυ(GP), πολυ(PR) και πολυ(PA) τα οποία συσσωρεύονται στα κύτταρα και βρίσκονται στο ENY. Επομένως, ένας συνδυασμός του γενετικού ελέγχου και της μέτρησης των πολύ-διπεπτιδίων στο ENY θα ήταν ωφέλιμος για την κλινική διάγνωση. Ωστόσο, οι μέθοδοι μέτρησης πολυ-διπεπτιδίων σε κλινικά δείγματα πρέπει να τυποποιηθούν (συνθήκες, επιλογή αντισωμάτων, κ.λπ.), και να προσδιοριστεί η ακρίβεια των εργαστηριακών δοκιμών προτού μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλες κλινικές μελέτες.

Βιοδείκτες βασισμένοι σε πρωτεΐνες για την διάγνωση της ALS

Πολλές έρευνες ασχολούνται με τον εντοπισμό νέων

πρωτεϊνικών βιοδεικτών για τη διάγνωση της ALS (Mitropoulos και συν, 2018). Με βάση τις ακόλουθες έρευνες, φαίνεται ότι τα νευρονημάτια (NFs), πολυ-διπεπτιδία που προέρχονται από τις επεκτάσεις GGGGCC στο *C9ORF72*, και η TDP-43, αποτελούν εν δυνάμει πρόσφορους πρωτεϊνικούς βιοδείκτες για τη διάγνωση της ALS.

Νευρονημάτια

Τα NF είναι ενδιάμεσα νευρονημάτια που αποτελούνται από τέσσερις υπομονάδες, το βαρύ NF (NFH), το μεσαίο (NFM), το ελαφρύ (NFL) και α -ιντερνεξίνη στο ΚΝΣ ή περιφερική στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Yuan, Rao και συν 2017). Υποβάλλονται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ιδίως φωσφορυλίωση. Από πολυάριθμες μελέτες ερευνητικών ομάδων και μεγάλων κοορτών ασθενών έχει συναχθεί, ότι οι πρωτεΐνες NFL και οι φωσφορυλιωμένες NFH (pNFH), οι οποίες εμφανίζονται στο ΕΝΥ και στο αίμα θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει κατάλληλο βιοδείκτη (Costa & de Carvalho, 2016). Έχουν ξεκινήσει πολυκεντρικές μελέτες για την αξιολόγηση της χρήσης των πρωτεϊνών NF στη διάγνωση της ALS. Επιπλέον, έχουν πραγματοποιηθεί μετα-αναλύσεις σύμφωνα με τις οποίες οι pNFH και NFL είναι αυξημένες στο ΕΝΥ ασθενών με ALS, ενώ στο αίμα ήταν αυξημένη τη NFL. Άρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση της ALS.

Η λειτουργία της πρωτεΐνης TDP-43

Η TDP-43 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη, ένα μικρό ποσοστό της οποίας βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν η TDP-43 έχει μεταφραστεί από παραλλαγμένο γονίδιο ή υπό κατάσταση στρες, μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, όπου υποβάλλεται σε υπερφωσφορυλίωση και συσσωμάτωση, σχηματίζοντας συσσωματώματα θετικά στην ουβικουτίνη (Neumann και συν, 2006 & 2009). Επιπροσθέτως, σε ασθενείς με ALS η TDP-43 είναι κατακερματισμένη και τα C-τελικά άκρα των θραυσμάτων είναι επιρρεπή σε συσσωμάτωση (Yang και συν, 2010). Συσσωματώματα που αποτελούνται από την TDP-43 βρίσκονται στο >97% των περιπτώσεων ασθενών με ALS. Εξαιρέσεις αποτελούν οι ασθενείς με ALS που προκαλείται από παθογόνες παραλλαγές του γονιδίου *SOD1* ή του *FUS* (Feneberg και συν, 2018b). Τα ευρήματα σχετικά με τη χρήση της TDP-43 ως βιοδείκτη για τη διάγνωση της ALS αποτέλεσαν αντικείμενο πρόσφατης μελέτης, όπου δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ των επιπέδων της TDP-43 στο ΕΝΥ σε ασθενείς με ALS η οποία να σχετίζεται με τις επεκτάσεις εξανουκλεοτιδίου GGGGCC

στο γονίδιο *C9ORF72* (Junttila και συν, 2016). Σε μια πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα που μπορούσαν να στοχεύσουν διαφορετικές μορφές της TDP-43 (Williams και συν, 2017). Η ίδια μελέτη έδειξε ότι υπάρχουν παραλλαγές της TDP-43 οι οποίες σχετίζονται ειδικά με τη νόσο. Δηλαδή, οι φορείς του γονιδίου *C9ORF72* με επέκταση εξανουκλεοτιδίων έχουν διαφορετικές μορφές TDP-43 στο πλάσμα τους σε σύγκριση με άλλους ασθενείς με ALS. Επομένως, αυτά τα αντισώματα θα μπορούσαν να βοηθήσουν όχι μόνο στη διάγνωση της ALS αλλά και στην κατανομή των ασθενών σε διαφορετικούς υποτύπους

Μεταβολικές αλλαγές στα λιπιδικά προφίλ ασθενών με ALS

Μια μελέτη κατέληξε στο ότι οι ασθενείς με ALS είναι υπολιπιδαιμικοί με χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, LDL και αναλογίας LDL/HDL. Η υπολιπιδαιμία φαίνεται να σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της ασθένειας και όχι με τη διατροφική πρόσληψη (Yang και συν, 2013). Η έρευνα κατέληξε στο ότι δίαιτα πλούσια σε λιπαρά επέκτεινε την επιβίωση των διαγονιδιακών ποντικών Tg-SODG86R κατά 20%. Αντίστοιχα, μελέτη σε πληθυσμό της Κίνας (413 ασθενείς με ALS και 400 μάρτυρες) έδειξε ότι αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό σχετίζονται με μεγαλύτερη επιβίωση (5,8 μήνες αύξησης του προσδόκιμου ζωής σε ασθενείς με επίπεδα τριγλυκεριδίων πάνω από 127,5 mg/dl). Παρατηρείται ακόμη, ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη μέση ολική χοληστερόλη, στην LDL και στην αναλογία LDL/HDL. Ως αποτέλεσμα, τα τριγλυκερίδια μπορεί να αποτελούν προστατευτικό παράγοντα (Huang και συν, 2015). Όταν οι συγγραφείς της παραπάνω μελέτης έκαναν την μετα-ανάλυσή της, η οποία δημοσιεύτηκε μαζί με την αρχική μελέτη, στην οποία συμπεριλήφθηκαν 1.930 δείγματα ασθενών με ALS και 3.635 δείγματα ελέγχου, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των λιπιδίων σε υγιείς μάρτυρες και σε ασθενείς με ALS (Huang και συν, 2015). Η παραπάνω υπόθεση θα μπορούσε να διερευνηθεί σε μετα-αναλύσεις που περιλαμβάνουν ασθενείς με ALS από διαφορετικές εθνότητες (π.χ. Κάτω Χώρες, Ιταλοί, Κορεάτες, Κινέζοι). Ως εκ τούτου, οι αλλαγές ανάλογα με την εθνότητα στα λιπιδικά προφίλ ασθενών θα πρέπει να διερευνηθούν στο μέλλον. Επίσης, τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος ποικίλλουν σε υγιή άτομα διαφορετικής καταγωγής. Μάλιστα μια μελέτη στη Γερμανία με 488 ασθενείς, κατέληξε στο ότι τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στον ορό παρατείνουν

την επιβίωση ασθενών με ALS (Dorst και συν, 2011). Συγκεκριμένα, συσχετίστηκαν τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στον ορό $\geq 1,47$ mmol/L με 14 μήνες αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης, ενώ τα επίπεδα χοληστερόλης $\geq 5,23$ mmol/L με αύξηση του προσδόκιμου ζωής κατά 11 μήνες (Dorst και συν, 2011). Οι Dupuis και συν (2008) πρότειναν ότι η δυσλιπιδαιμία αποτελεί προστατευτικό παράγοντα σε ασθενείς που πάσχουν από ALS. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η ηπατική στεάτωση είναι πιο συχνή σε ασθενείς με ALS παρά σε ασθενείς με Πάρκινσον. Η αυξημένη αναλογία LDL/HDL συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση της επιβίωσης (περισσότερο από 12 μήνες). Έτσι, η υπερλιπιδαιμία είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών με ALS. Σε μια μελέτη πληθυσμού Ιταλών και συγκεκριμένα 275 ασθενών με ALS, τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο αίμα φάνηκε να έχουν αντιστρόφως ανάλογες σχέσεις με τις πιθανότητες θανάτου (Mandrioli και συν, 2017). Μια άλλη μελέτη πληθυσμού Ιταλών και συγκεκριμένα 658 ασθενών έδειξε ότι τα μέσα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL, LDL και LDL/HDL ήταν παρόμοια σε ασθενείς με ALS και στους μάρτυρες. Ωστόσο, η ολική χοληστερόλη, η HDL, τα τριγλυκερίδια και η LDL/HDL μειώθηκαν σε ασθενείς με εξαναγκασμένη ζωτική ικανότητα (FVC) < 70 σε σύγκριση με ασθενείς με FVC $\geq 90\%$. Συνεπώς, συσχετίστηκε η έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας με τον χαμηλότερο λόγο LDL/HDL (Chio και συν, 2009). Σε μια σουηδική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 636.132 άνδρες και γυναίκες, τα υψηλά επίπεδα LDL και οι υψηλές αναλογίες LDL/HDL συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ALS (Marjosa και συν, 2017). Με βάση αυτά έχουν σχεδιαστεί μελέτες και κλινικές δοκιμές που εξετάζουν την επίδραση της διαίτας υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά στην εξέλιξη της ALS.

Λιπιδομική

Η Λιπιδομική (Lipidomics) είναι, η μεγάλης κλίμακας μελέτη της σύνθεσης των λιπιδίων σε βιολογικά συστήματα, κύτταρα, ιστούς και βιορευστά. Η σύνθεση λιπιδίων έχει μελετηθεί κυρίως με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC / MS), αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC / MS), Πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) και αποτελεί μέρος της μεταβολομικής (Wenk, 2005). Αν και αυτές οι τεχνικές είναι αναγκαίες για αναλύσεις που απαιτούν υψηλή απόδοση, μεμονωμένα μόρια λιπιδίων μπορούν να αναλυθούν με λιγότερο περίπλοκο τρόπο

για την κλινική διάγνωση ρουτίνας. Στο Εγκεφαλονωτιαίο υγρό τα επίπεδα της 24-υδροξυχοληστερόλης (HC) και της 25-HC ήταν υψηλότερα στην ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία για την ALS σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε ως θεραπεία για την ALS την Ριλουζόλη και με τους μάρτυρες. Στον ορό, τα επίπεδα 27-HC και τα επίπεδα 25-HC ήταν υψηλότερα σε ασθενείς που έπασχαν από ALS σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Αυτή η μελέτη περιελάμβανε 30 ασθενείς με ALS, 9 ασθενείς με ALS που έλαβαν θεραπεία με Ριλουζόλη και 33 μάρτυρες. Το επίπεδο της 25-HC στον ορό ασθενών με ALS σχετίστηκε σημαντικά με τη σοβαρότητα και την εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, μόνο τα επίπεδα της 25-HC έδειξαν σημαντική συσχέτιση με τη βαθμολογία ALSFRS-R που όπως αναφέρθηκε καθορίζει τον ρυθμό εξέλιξης. Ως αποτέλεσμα, η 25-HC θα μπορούσε να αποτελεί έναν νέο βιοδείκτη (Kim και συν, 2017).

Επιπλέον, η 25-HC προκαλεί απόπτωση και νευρικό θάνατο στην υβριδική κυτταρική γραμμή NSC34, δηλαδή την κυτταρική γραμμή που λαμβάνεται από εμβρυϊκά κύτταρα νωτιαίου μυελού ποντικού και νευροβλαστώματος με χαρακτηριστικά πρωτοπαγών κινητικών νευρώνων, και επομένως φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ALS. Επίσης, η έκφραση των ενζύμων που συνθέτουν την 25-HC είναι σημαντικά αυξημένη στους εγκεφάλους των διαγονιδιακών ποντικών SOD1G93A με πρώιμα συμπτώματα (Kim και συν, 2017). Επιπλέον, ένας συνδυασμός της μελέτης της αλληλουχίας RNA και του λιπιδιομικού προφίλ έδειξε ότι ο μεταβολισμός των σφιγγολιπιδίων ήταν μειωμένος στον νωτιαίο μυελό των συμπτωματικών διαγονιδιακών ποντικών Tg-SOD1G86R σε σύγκριση με των ποντικών WT (άγριου τύπου). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα σφιγγομυελίνης, φωσφορυλιωμένου κεραμιδίου (κεραμιδίου-P) και κεραμιδίου βρέθηκαν εξαιρετικά μειωμένα. Επιπρόσθετα, οι μεταβολίτες των φωσφολιπιδίων απορρυθμίστηκαν.

Στο αίμα διαγονιδιακών ποντικών Tg-SOD1G93A, η συγκέντρωση του 12-υδροξυεικοσατετρανοϊκού οξέος (12-HETE), παράγωγου της οδού της λιποξυγενάσης, έχει βρεθεί ότι αυξάνεται, όταν τα συμπτώματα της ALS εμφανίζονται (Trostchansky και συν, 2016). Μια μελέτη που περιελάμβανε 40 ασθενείς με ALS και 45 μάρτυρες διαπίστωσε ότι τα επίπεδα φωσφατιδυλοχολίνης ήταν υψηλότερα στους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες, στο ENY (Blasco και συν, 2017). Τα επίπεδα χοληστερόλης στο ENY ασθενών με ALS είναι αυξημένα σε σύγκριση με των μαρτύρων (20 ασθενείς, 15 μάρτυρες). Γενικά, οι μεταβολίτες της χοληστερόλης είναι

μειωμένοι στο ENY των ασθενών με ALS. Άλλα μόρια μειωμένα στο ENY ασθενών με ALS αποτελούν η 24-HC και η 25-υδρόξυ βιταμίνη D3 (Καλιφεδιόλη). Συμπληρωματικά, ο μεταβολίτης της 26-HC εμφανίζει σημαντική μείωση στον ορό ασθενών με ALS (Abdel-Khalik και συν, 2017). Μια μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της 27-HC είναι μειωμένα στο πλάσμα ασθενών με ALS σε σύγκριση με αυτό των υγιών μαρτύρων (Wuolikainen και συν, 2014). Ένα δείγμα πλάσματος από έναν ασθενή (με επιβεβαιωμένη παθολογία παραλλαγή SOD1A4V) που λήφθηκε 8 χρόνια πριν από την εμφάνιση της ALS αναλύθηκε και έδειξε μειωμένα την χοληστερόλη, την VLDL-χοληστερόλη, τα VLDL-τριγλυκερίδια και την 27-HC (Wuolikainen και συν, 2014). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να υποδηλώνει ότι ορισμένα από αυτά τα μικρά μόρια είναι πιθανό να αλλοιωθούν στην προσυμπτωματική φάση.

Άλλοι μέθοδοι για την μελλοντική διάγνωση της ALS

Εκτός από τους προαναφερθέντες βιοδείκτες, με πιθανές εφαρμογές για τη διάγνωση της ALS στο άμεσο μέλλον, υπάρχουν πρόσθετες ανακαλύψεις που θα μπορούσαν να συντελέσουν στην διάγνωση αλλά βρίσκονται ακόμη σε πρώιμα στάδια.

Οι βιοψίες δέρματος στη διάγνωση της ALS

Η εμβρυϊκή προέλευση του δέρματος και των νευρικών ιστών είναι κοινή, από το εξώδερμα. Αυτός είναι πιθανώς ο λόγος για τον οποίο οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές συνοδεύονται από αλλαγές στην δομή του δέρματος. Δερματικές αλλοιώσεις στην ALS αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τον Charcot τον 19ο αιώνα, όταν παρατήρησε ότι οι ασθενείς με ALS δεν παρουσίαζαν έλκη (Paré & Gros-Louis, 2017). Οι αλλαγές περιλαμβάνουν διαφοροποιήσεις στις ίνες κολλαγόνου: συγκεκριμένα στην διάμετρο, στην πυκνότητα, στη σύνδεση κολλαγόνου και ελαστίνης, κ.λπ. (Paré & Gros-Louis, 2017). Πολλές πρωτεΐνες έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται εσφαλμένα στο δέρμα ασθενών με ALS. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση του γονιδίου *FUS* στον πυρήνα αυξήθηκε στα επιδερμικά κύτταρα ασθενών με ALS σε σύγκριση με αυτά των ατόμων που πάσχουν από κάποια άλλη νευρολογική διαταραχή και έχουν εκφράσει δερματολογικές διαταραχές και με τους μάρτυρες (μελέτη με 22 ασθενείς με ALS και 22 μάρτυρες με άλλες νευρολογικές διαταραχές, όπως Πάρκινσον, νόσο Alzheimer, κ.λπ.). Η έκφραση αυξήθηκε καθώς προχωρούσε η ασθένεια (Oketa και συν 2013). Ωστόσο,

οι αλλαγές στο δέρμα δεν μπορούν να συνδεθούν αποκλειστικά με την ALS επομένως, δεν έχουν διαγνωστική σημασία την παρούσα στιγμή. Εντούτοις, η περίπτωση με την TDP-43 μπορεί να είναι διαφορετική καθώς η TDP-43 είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο κλινικό εύρημα. Σε ασθενείς με ALS, αποθέσεις TDP-43 παρατηρούνται σε ιστούς και μετά τον θάνατό τους. Ωστόσο, η βιοψία εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού για ανάλυση είναι μια πολύ επεμβατική τεχνική και επομένως περιορισμένης εφαρμογής στη διάγνωση. Πρόσφατα, μια ομάδα ανέπτυξε ένα τεχνητό μοντέλο δέρματος ιστοειδικό για την ALS (ALS-TES) με κύτταρα ασθενών (6 ασθενείς με ALS και 6 ασθενείς με ALS και φορείς του *C9ORF72* με επαναλαμβανόμενη επέκταση του GGGGCC και 6 μάρτυρες), προκειμένου να παρέχει μια απεριόριστη πηγή ανθρώπινου ιστού ώστε να βοηθήσει στην αναγνώριση βιοδεικτών και στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Το ALS-TES περιείχε τόσο ινοβλάστες όσο και κερατινοκύτταρα. Στο ALS-TES, παρατηρούνται συσσωματώματα TDP-43, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα συσσωματώματα μπορούν να ανιχνευθούν εκτός του νευρικού συστήματος. Επιπλέον, σε TES ανακατασκευασμένο από ασυμπτωματικούς φορείς *C9ORF72* με επαναλαμβανόμενη επέκταση του GGGGCC παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με την παθολογική παραλλαγή *TDP43* (A315T) είχαν αυξημένα επίπεδα της TDP-43, των πρωτεϊνικών δεικτών ER (GRP-78) και των πρωτεϊνών της οδού της αυτοφαγίας (LC3) στο δέρμα (Wang και συν, 2015). Ωστόσο αυτό δεν φάνηκε να ισχύει σε όλες τις μελέτες και συνεπώς παραμένουν ανοιχτά ερωτήματα, σχετικά με το εάν η TDP-43 παρουσιάζει σχηματισμό συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για την επικύρωση των ευρημάτων της λειτουργίας της TDP-43 στο δέρμα ασθενών με ALS καθώς η χρήση βιοψιών δέρματος χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.

ΣΥΝΟΨΗ

Οι γενετικοί βιοδείκτες παρέχουν οριστική διάγνωση της ALS, περιορισμένης όμως εφαρμοσιμότητας καθώς αυτή περιορίζεται μόνο σε μια μικρή υποομάδα ασθενών με ALS. Γενικά, ο γενετικός έλεγχος δεν αποτελεί μια δοκιμασία ρουτίνας για προσυμπτωματικό έλεγχο του γενικού πληθυσμού. Επομένως, η επιβεβαίωση των πρωτεϊνικών βιοδεικτών θα προτιμάται για εξέταση πληθυσμού μεγάλης κλίμακας, ενώ για την παρακολούθηση ατόμων με υψηλό δείκτη κινδύνου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν βιοδείκτες λιπιδίων για την ιχνηλάτηση της εξέλιξης της νόσου. ●

ABSTRACT

New molecular diagnostic trends and biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

Eirini Sparaki¹, George P. Patrinos^{*1,2}

¹University of Patras School of Health Sciences, Department of Pharmacy, Laboratory of Pharmacogenomics and Individualized Therapy, Patras, Greece

²Department of Pharmacy, College of Medicine and Health Sciences, United Arab Emirates University, Al Ain, UAE

ALS is a rare disorder which is divided into two categories. The first one is familial, with 5-10 % of cases and the second one is sporadic. Prompt diagnosis is crucial to improving therapeutic efficacy. Diagnosis is based on clinical assessment that requires 12 months. As a result, the treatment is delayed and hence new methods of diagnosis are necessary. The testing of genes that are related to ALS is already a tool. Nevertheless, it

is not used for initial screening and therefore new biomarkers are needed. Specifically, lipids are considered to be promising biomarkers for population-based screening and for monitoring disease progression. In addition, genetic analysis can help the prediction of disease progression by analyzing disease-modifying genes as EPHA4 and CHGB. This paper addresses current diagnostic strategies.

KEY WORDS: Amyotrophic lateral sclerosis, biomarkers, genomic biomarkers, lipid biomarkers

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Khalik, J., Yutuc, E., Crick, P. J., Gustafsson, J. A., Warner, M., Roman, lateral sclerosis. *Journal of Lipid Research*, 58(1), 267–278.
- Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Yoshino, H. (2017a). Safety and efficacy of edaravone in well-defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurology*, 16(7), 505–512.
- Abe, K., Ohkubo, T., & Yokota, T. (2017b). TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of Medical and Dental Sciences*, 64(1), 9–17.
- Ahmeti, K. B., Ajroub-Driss, S., Al-Chalabi, A., Andersen, P. M., Armstrong, J., Birve, A., Zheng, J. G. (2013). Age of onset of amyotrophic lateral sclerosis is modulated by a locus on 1p34.1. *Neurobiology of Aging*, 34(1), 357.e7–19.
- Al-Chalabi, A., Calvo, A., Chio, A., Colville, S., Ellis, C. M., Hardiman, O., Pearce, N. (2014). Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: A population-based modeling study. *Lancet Neurology*, 13(11), 1108–1113.
- Al-Saif, A., Al-Mohanna, F., & Bohlega, S. (2011). A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 70(6), 913–919.
- Andersen, P. M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Käranen, M.-L., Tarvainen, I., Haltia, T., Marklund, S. L. (1995). Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 10(1), 61–66.
- Andersen, P. M., Nilsson, P., Keränen, M. L., Forsgren, L., Hägglund, J., Ronnevi, L. O., Marklund, S. L. (1997). Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain*, 120(Pt 10), 1723–1737.
- Balendra, R., Moens, T. G., & Isaacs, A. M. (2017). Spe-

cific biomarkers for C9orf72 FTD/ALS could expedite the journey towards effective therapies. *EMBO Molecular Medicine*, 9(7), 853–855.

- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chaussent, A., Genin, E. C., LacasGervais, S., Fragaki, K., ... Paquis Flucklinger, V. (2014). A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, 137(Pt 8), 2329–2345.
- Benatar, M., Wu, J., Andersen, P. M., Lombardi, V., & Malaspina, A. (2018). Neurofilament light: A candidate biomarker of pre-symptomatic ALS and phenocopy. *Annals of Neurology*, 84(1), 130–139.
- Blasco, H., Corcia, P., Veyrat-Durebex, C., Coutadeur, C., Fournier, C., Camu, W., Praline, J. (2011a). The P413L chromogranin B variation in French patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 12(3), 210–214.
- Blasco, H., Veyrat-Durebex, C., Bocca, C., Patin, F., Vourc'h, P., Kouassi Nzoughe, J., Reynier, P. (2017). Lipidomics reveals cerebrospinal fluid signatures of ALS. *Scientific Reports*, 7(1), 17652.
- Blasco, H., Vourc'h, P., Nadjar, Y., Ribourtout, B., Gordon, P. H., Guettard, Y. O., Praline, J. (2011b). Association between divalent metal transport1 encoding gene (SLC11A2) and disease duration in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 303(1-2), 124–127.
- Blauwendraat, C., Faghri, F., Pihlstrom, L., Geiger, J. T., Elbaz, A., Lesaga, S., Scholz, S. W. (2017). Neuron-Chip, an updated version of the NeuroX genotyping platform to rapidly screen for variants associated with neurological diseases. *Neurobiology of Aging*, 57, 247.e9–e247.
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., van den Berg, L., & Pasterkamp, J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 125(6), 777–794.
- Bowling, A. C., Schulz, J. B., Brown, R. H. Jr., & Beal, M. F. (1993). Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 61(6), 2322–2325.
- Brenner, D., Yilmaz, R., Müller, K., Grehl, T., Petri, S., Meyer, T., Weishaupt, J. H. (2018). Hot-spot KIF5A mutations cause familial ALS. *Brain*, 141(3), 688–697.
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 377(2), 162–172.
- Cardona, A. E., Pioro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, M., Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, 9(7), 917–924.
- Chance, P. F., Rabin, B. A., Ryan, S. G., Ding, Y., Scavina, M., Crain, B., Cornblath, D. R. (1998). Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *American Journal of Human Genetics*, 62(3), 633–640.
- Chen, S., Sayana, P., Zhang, X., & Le, X. (2013). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: An update. *Molecular Neurodegeneration*, 8, 28.
- Chia, R., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2017). Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: Diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurology*, 17(1), 94–102.
- Chio, A., Calvo, A., Ilardi, A., Cavallo, E., Moglia, C., Mutani, R., Mora, G. (2009). Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS. *Neurology*, 73(20), 1681–1685.
- Chow, C. Y., Landers, J. E., Bergren, S. K., Sapp, P. C., Grant, A. E., Jones, J. M., Meisler, M. H. (2009). Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. *American Journal of Human Genetics*, 84(1), 85–88.
- Cirulli, E. T., Lasseigne, B. N., Petrovski, S., Sapp, P. C., Dion, P. A., LeBlond, C. S., Goldstein, D. B. (2015). Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*, 347(6229), 1436–1441.
- Clos, A. L., Kaye, R., & Lasagna-Reeves, C. A. (2012). Association of skin with the pathogenesis and treatment of neurodegenerative amyloidosis. *Frontiers in Neurology*, 3, 5.
- Codron, P., Cassereau, J., Vourc'h, P., Veyrat-Durebex, C., Blasco, H., Kane, S., Chevrollier, A. (2018). Primary fibroblasts derived from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients do not show ALS cytological lesions. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 19(5–6), 446–456.
- Costa, J., & de Carvalho, M. (2016). Emerging molecular biomarker targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 455, 7–14.
- Couthouis, J., Hart, M. P., Shorter, J., DeJesus-Hernandez, M., Erion, R., Oristano, R., Gitler, A. D. (2011). A yeast functional screen predicts new 370 PAM-

PALAKIS ET AL. candidate ALS disease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 20881–20890.

- Cruz, P. T. (2018). Edaravone (Radicava). *Pharmacy and Therapeutics*, 43(1), 25–28.
- Cudkovicz, M. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D. L., Brown, R. H. (1997). Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 41(2), 210–221.
- Dardiotis, E., Siokas, V., Sokratous, M., Tsouris, Z., Michalopoulou, A., Andravizou, A., Hadjigeorgiou, G. M. (2018). Genetic polymorphisms in amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for implication in detoxification pathways of environmental toxicants. *Environment International*, 116, 122–135.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245–256.
- Deng, H. X., Chen, W., Hong, S. T., Boycott, K. M., Gorrie, G. H., Siddique, N., Siddique, T. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, 477(7363), 211–215.
- Diekstra, F. P., van Vught, P. W. J., van Rheenen, W., Koppers, M., Pasterkamp, R. J., van Es, M. A., Veldink, J. H. (2012). UNC13A is a modifier of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 630.e3–e8.
- Dion, P. A., Daoud, H., & Rouleau, G. A. (2009). Genetics of motor neuron disorders: New insights into pathogenic mechanisms. *Nature Reviews Genetics*, 10(11), 769–782.
- Dorst, J., Kühnlein, P., Hendrich, C., Kassubek, J., Sperfeld, A. D., & Ludolph, C. (2011). Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 258(4), 613–617.
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J. L., Bonnefont-Rousselot, D., Meininger, V. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 70(13), 1004–1009.
- Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez de Aguilar, J. L., & Loeffler, J. P. (2004). Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11159–11164.
- Elden, A. C., Kim, H. J., Hart, M. P., Chen-Plotkin, A. S., Johnson, B. S., Fang, X., Gitler, A. D. (2010). Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*, 466(7310), 1069–1075.
- Eschbach, J., Schwalenstöcker, B., Soyal, S. M., Bayer, H., Wiesner, D., Akimoto, C., Weydt, P. (2013). PGC-1a is a male-specific disease modifier of human and experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 22(17), 3477–3484.
- Fecto, F., Yan, J., Vemula, S. P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., Siddique, T. (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, 68(11), 1440–1446.
- Feneberg, E., Oeckl, P., Steinacker, P., Verde, F., Barro, C., Van Damme, P., Otto, M. (2018a). Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 90(1), e22–e30.
- Feneberg, E., Gray, E., Ansorge, O., Talbot, K., & Turner, M. R. (2018b). Towards a TDP-43-based biomarker for ALS and FTLD. *Molecular Neurobiology*, 55(10), 7789–7801.
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., & Shaw, P. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 7(11), 616–630.
- Figlewicz, D. A., Krizus, A., Martinoli, M. G., Meininger, V., Dib, M., Rouleau, G. A., & Julien, J. P. (1994). Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 3(10), 1757–1761.
- Fogh, I., Lin, K., Tiloca, C., Rooney, J., Gellera, C., Diekstra, F. P., Powell, J. (2016). Association of a locus in the CAMTA1 gene with survival in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology*, 73(7), 812–820.
- Gitler, A. D., & Tsuiji, H. (2016). There has been an awakening: Emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. *Brain Research*, 1647, 19–29.
- Gratten, J., Zhao, Q., Benyamin, B., Garton, F., He, J., Leo, P. J., Fan, D. (2017). Whole-exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis suggest NEK1 is a

risk gene in Chinese. *Genome Medicine*, 9, 97.

- Greenway, M. J., Andersen, P. M., Russ, C., Ennis, S., Cashman, S., Donaghy, C., Hardiman, O. (2006). ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 38(4), 411–413.
- Gross-Louis, F., Andersen, P. M., Dupre, N., Urushitani, M., Dion, P., Souchon, F., Julien, J. P. (2009). Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21777–21782.
- Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Ikeda, J. E. (2001). A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genetics*, 29(2), 166–173.
- Hand, C. K., Khoris, J., Salachas, F., Gros-Louis, F., Lopes, A. A., MayeuxPortas, V., Rouleau, G. A. (2002). A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis, on chromosome 18q. *American Journal of Human Genetics*, 70(1), 251–256.
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17071.
- He, X., Zhang, L., Yao, X., Hu, J., Yu, L., Jia, H., Xu, Y. (2013). Association studies of MMP-9 in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 8(9), 1–5.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Bouscary, A., Mosbach, A., Keime, C., BoursierNevret, C., Loeffler, J. P. (2018). Sphingolipid metabolism is dysregulated at transcriptomic and metabolic levels in the spinal cord of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 433.
- Henriques, A., Croixmarie, V., Priestman, D. A., Rosenbohm, A., DirrigGrosch, S., Boursier-Neyret, C., De Aguilar, J. L. G. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis and denervation alter sphingolipids and upregulate glucosylceramide synthase. *Human Molecular Genetics*, 24(25), 7390–7405.
- Hosokawa, M., Arai, T., Yamashita, M., Tsuji, H., Nonaka, T., MasudaSuzukake, M., Akiyama, H. (2014). Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *The International Journal of Neuroscience*, 124(5), 344–349.
- Huang, R., Guo, X., Chen, X., Zheng, Z., Wei, Q., Cao, B., Shang, H. (2015). The serum lipid profiles of amyotrophic lateral sclerosis patients: A study from south-west China and a meta-analysis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 16(5–6), 359–365.
- Ivansson, E. L., Megquier, K., Kozyrev, S. V., Murén, E., Körberg, I. B., Swofford, R., Lindblad-Toh, K. (2016). Variants within the SP110 nuclear body protein modify risk of canine degenerative myelopathy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 113(22), E3091–E3100. PAMPALAKIS ET AL. 371
- Jia, R., Shephard, S., Jin, J., Hu, F., Zhao, X., Xue, L., Dang, J. (2017). Urinary extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis in a Chinese cohort. *Scientific Reports*, 7(1), 5127.
- Johnson, J. O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V. M., Trojanowski, J. Q., Traynor, B. J. (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, 68(5), 857–864.
- Johnson, J. O., Pioro, E. P., Boehringer, A., Chia, R., Feit, H., Renton, A. E., Traynor, B. J. (2014). Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 17(5), 664–666.
- Junttila, A., Kuvaja, M., Hartikainen, P., Siloaho, M., Helisalml, S., Moilanen, V., Herukka, S. K. (2016). Cerebrospinal fluid TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis patients with and without the C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 6(1), 142–149.
- Kaneb, H. M., Folkmann, A. W., Belzil, V. V., Jao, L. E., Leblond, C. S., Girard, S. L., Dion, P. A. (2015). Deleterious mutations in the essential mRNA metabolism factor, hGle1, in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 24(5), 1363–1373.
- Kasai, T., Tokuda, T., Ishigami, N., Sasayama, H., Foulds, P., Mitchell, D. J., Nakagawa, M. (2009). Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 117(1), 55–62.
- Kenna, K. P., Van Doormaal, P. T., Dekker, A. M., Ticozzi, N., Kenna, B. J., Diekstra, F. P., Landers, J. E. (2016). NEK1 variants confer susceptibility to amyotrophic

- lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 48(9), 1037–1042.
- Kim, S. M., Kim, H., Kim, J. E., Park, K. S., Sung, J. J., Kim, S. H., & Lee, K. W. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis is associated with hypolipidaemia at the presymptomatic stage in mice. *PLoS One*, 6(3), e17985.
 - Kim, H. J., Kim, N. C., Wang, Y. D., Scarborough, E. A., Moore, J., Diaz, Z., Taylor, J. P. (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*, 495(7442), 46773.
 - Kim, S.-M., Noh, M.-Y., Kim, H., Cheon, S.-Y., Lee, K. M., Lee, J., Kim, S. H. (2017). 25-hydroxycholesterol is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Oncotarget*, 8(7), 11855–11867.
 - Landers, J. E., Melki, J., Meininger, V., Glass, J. D., van den Berg, L. H., van Es, M. A., Brown, R. H. Jr (2009). Reduced expression of the kinesin-associated protein 3 (KIFAP3) gene increases survival in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), 9004–9009.
 - Lehnert, S., Costa, J., de Carvalho, M., Kirby, J., Kuzma-Kozakiewicz, M., Morelli, C., Otto, M. (2014). Multicentre quality controls evaluation of different biomarker candidates for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 15(5–6), 344–350.
 - Li, D., Shen, D., Tai, H., & Cui, L. (2016). Neurofilaments in CSF as diagnostic biomarkers in motor neuron disease: A meta-analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 290.
 - Lopez-Lopez, A., Gamez, J., Syriani, E., Morales, M., Salvado, M., Rodríguez, M. J., Vidal-Taboada, J. M. (2014). CX3CR1 is a modifying gene of survival and progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Plos One*, 9(5), e96528.
 - López-López, A., Gelpi, E., Lopategui, D. M., & Vidal-Taboada, M. (2018). Association of the CX3CR1-V249I variant with neurofibrillary pathology progression in late-onset Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2340–2349.
 - Louvel, E., Hugon, J., & Doble, A. (1997). Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18(6), 196–203.
 - Mackenzie, I. R., Nicholson, A. M., Sarkar, M., Messing, J., Purice, M. D., Pottier, C., Rademakers, R. (2017). TIA1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia promote phase separation and alter stress granule dynamics. *Neuron*, 95(4), 808–816.
 - Mandrioli, J., Rosi, E., Fini, N., Fasano, A., Raggi, S., Fantuzzi, A. L., & Bedogni, G. (2017). Changes in routine laboratory tests and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological Sciences*, 38(12), 2177–2182.
 - Mariosa, D., Hammar, N., Malmstrom, H., Ingre, C., Jungner, I., Ye, W., Walldius, G. (2017). Blood biomarkers of carbohydrate, lipid, and apolipoprotein metabolisms and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A more than 20-year follow-up of the Swedish AMORIS cohort. *Annals of Neurology*, 81(5), 718–728.
 - Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kawakami, H. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465(7295), 223–226.
 - Mitchell, J. D. (2000). Amyotrophic lateral sclerosis: Toxins and environment. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 1(4), 253–250.
 - Mitchell, J., Paul, P., Chen, H. J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M., de Bellroche, J. (2010). Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7556–7561.
 - Mitropoulos, K., Katsila, T., Patrinos, G. P., & Pampalakis, G. (2018). Multiomics for biomarker discovery and target validation in biofluids for amyotrophic lateral sclerosis diagnosis. *OMICS*, 22(1), 52–64.
 - Mitropoulos, K., Merkouri Papadima, E., Xiromerisiou, G., Balasopoulou, A., Charalampidou, K., Patrinos, G. P. (2017). Genomic variants in the FTO gene are associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Greek patients. *Human Genomics*, 11(1), 30.
 - Nails, M. A., Bras, J., Hernandez, D. G., Keller, M. F., Majounie, E., Renton, E., Singleton, A. B. (2015). NeuroX, a fast and efficient genotyping platform for investigation of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1605.e7–e12.
 - Neumann, M., Kwong, L. K., Lee, E. B., Kremmer, E., Flatley, A., Xu, Y., Lee, V. M. (2009). Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopa-

thies. *Acta Neuropathologica*, 117(2), 137–149.

- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M.C., Chou, T. T., Lee, V. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–134.
- Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Zatz, M. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Human Genetics*, 75(5), 822–831.
- Noto, Y., Shibuya, K., Sato, Y., Kanai, K., Misawa, S., Sawai, S., Kuwabara, S. (2011). Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: Specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 12(2), 140–143.
- Oberstadt, M., Claen, J., Arendt, T., & Holzer, M. (2018). TDP-43 and cytoskeletal proteins in ALS. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 3143–3151.
- Oeckl, P., Jardel, C., Salachas, F., Lamari, F., Andersen, P. M., Bowser, R., Otto, M. (2016). Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 17(5–6), 404–413.
- Ohta, Y., Soucy, G., Phaneuf, D., Audet, J.N., Gros-Louis, F., Rouleau, G. A., Julien, J. P. (2016). Sex-dependent effects of chromogranin B P413L allelic variant as disease modifier in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 25(21), 4771–4786. 372 PAMPALAKIS ET AL.
- Oketa, Y., Higashida, K., Fukasawa, H., Tsukie, T., & Ono, S. (2013). Abundant FUS-immunoreactive pathology in the skin of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 128(4), 257–264. Orlacchio, A., Babalini, C., Borreca, A., Patrono, C., Massa, R., Basaran, S., Kawarai, T. (2010). SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 133(Pt 2), 591–598.
- Paré, B., & Gros-Louis, F. (2017). Potential skin involvement in ALS: Revisiting Charcot’s observation—a review of skin abnormalities in ALS. *Reviews in Neurosciences*, 28(5), 551–572.
- Paré, B., Touzel-Deschênes, L., Lamontagne, R., Lamarre, M. S., Scott, F. D., Khuong, H. T., Gros-Louis, F. (2015). Early detection of structural abnormalities and cytoplasmic accumulation of TDP-43 in tissue-engineered skin derived from ALS patients. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 5 (1–12).
- Parkinson, N., Ince, P. G., Smith, M. O., Highley, R., Skibinski, G., Andersen, P. M., Fisher, E. M. (2006). ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology*, 67(6), 1074–1077.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B. H., Holzbaur, E. L., Tokito, M., Mann, E., Fischbeck, K. H. (2003). Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nature Genetics*, 33(4), 455–456.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257–268.
- Ricci, C., Battistini, S., Avemaria, F., Benigni, M., Tarlarini, C., Giannini, F., Penco, S. (2015). Lack of relationship between the P413L chromogranin B variant and a SALS Italian cohort. *Gene*, 568(2), 186–189.
- Robelin, L., & De Aguilar, J. L. (2014). Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: Myth of reality? *Biomed Research International*, 2014, 525097.
- Sapp, P. C., Hosler, B. A., McKenna-Yasek, D., Chin, W., Gann, A., Genise, H., Brown, R. H. Jr. (2003). Identification of two novel loci for dominantly inherited familial amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Human Genetics*, 73(2), 397–403.
- Sawada, H. (2017). Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(7), 735–738.
- Shephard, S. R., Chataway, T., Schultz, D. W., Rush, R. A., & Rogers, M. L. (2014). The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 9(1), e87398.
- Shephard, S. R., Wu, J., Cardoso, M., Wiklendt, L., Dinning, P. G., Chataway, T., Benatar, M. (2017). Urinary p75ECD: A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. *Neurology*, 88(12), 1137–1143.
- Simpson, C. L., Lemmens, R., Miskiewicz, K., Broom, W. J., Hansen, V. K., van Vught, P. W., Al-Chalabi, A. (2009). Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Human Molecular Genetics*, 18(3), 472–481.
- Smith, B. N., Ticozzi, N., Fallini, C., Gkazi, A. S., Topp,

- S., Kenna, K. P., Landers, J. E. (2014). Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. *Neuron*, 84(2), 324–331.
- Sproviero W, Shatunov A, Stahl D, Shoai M, van Rheenen W, Jones A. R., Al-Chalabi, A (2017). ATXN2 trinucleotide repeat length correlates with risk of ALS. *Neurobiology of Aging*, 51, 178.e1–e178.e9.
 - Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Shaw, E. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 319(5870), 1668–1672.
 - Steinacker, P., Hendrich, C., Sperfeld, A. D., Jesse, S., von Arnim, C. A., Lehnert, S., Otto, M. (2008). TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, 65(11), 1481–1487.
 - Suzuki, M., Mikami, H., Watanabe, T., Yamano, T., Yamazaki, T., Nomura, M., Ono, S. (2010). Increased expression of TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, 122(5), 367–372.
 - Takahashi, Y., Fukuda, Y., Yoshimura, J., Toyoda, A., Kurppa, K., Moritoyo, H., Tsuji, S. (2013). ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *American Journal of Human Genetics*, 93(5), 900–905.
 - Trostchansky, A., Mastrogiovani, M., Miquel, E., Rodriguez-Bottero, S., Cassina, P., & Rubbo, H. (2016). Lipidomic analysis in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): Looking for footprints of disease onset and progression. *Free Radical Biology and Medicine*, 100(Supplement), S68–S69.
 - Tunca, C., Akçimen, F., Coşkun, C., Gündoğdu-Eken, A., Kocoglu, C., Cevik, B., Başak, A. N. (2018). ERLIN1 mutations cause teenage-onset slowly progressive ALS in a large Turkish pedigree. *European Journal of Human Genetics*, 26(5), 745–748.
 - Van Hoecke, A., Schoonaert, L., Lemmens, R., Timmers, M., Staats, K. A., Laird, A. S., Robberecht, W. (2012). EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nature Medicine*, 18(9), 1418–1422.
 - Van Rheenen, W., Shatunov, A., Dekker, A. M., McLaughlin, R. L., Diekstra, F. P., Pulit, S. L., Veldink, J. H. (2016). Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 48(9), 1043–1048.
 - Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 323(5918), 1208–1211.
 - Vejux, A., Namsi, A., Nury, T., Moreau, T., & Lizard, G. (2018). Biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis: Current status and interest of oxysterols and phytosterols. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 12.
 - Verstraele, E., Kuiperij, H. B., van Blitterswijk, M. M., Veldink, J. H., Schelhaas, H. J., van den Berg, L. H., & Verbeek, M. M. (2012). TDP-43 plasma levels are higher in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 13(5), 446–451.
 - Vidal-Taboada, J. M., Pugliese, M., Salvadó, M., Gámez, J., Mahy, N., & Rodríguez, M. J. (2018). KATP channel expression and genetic polymorphisms associated with progression and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 55(10), 7962–7972.
 - Wang, X., Zhou, S., Ding, X., Ma, M., Zhang, J., Zhou, Y., Teng, J. (2015). Activation of ER stress and autophagy induced by TDP-43 A315T as pathogenic mechanism and the corresponding histological changes in skin as potential biomarker for ALS with the mutation. *International Journal of Biological Sciences*, 11(10), 1140–1149.
 - Wenk, M. R. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7), 594–610.
 - Weydt, P., Oeckl, P., Huss, A., Müller, K., Volk, A. E., Kuhl, J., Otto, M. (2016). Neurofilaments levels as biomarkers in asymptomatic and symptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 79(1), 152–158.
 - Williams, K. L., Topp, S., Yang, S., Smith, B., Fifita, J. A., Warraich, S. T., Blair, P. (2016). CCFN mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nature Communications*, 7, 11253.
 - Williams, S. M., Khan, G., Harris, B. T., Ravis, J., & Sierks, M. R. (2017). TDP43 protein variants as biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neuroscience*, 18(1), 20.
 - Wu, C. H., Fallini, C., Ticozzi, N., Keagle, P. J., Sapp, P. C., Piotrowska, K., Landers, J. E. (2012). Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 488(7412), 499–503. PAM-PALAKIS ET AL. 373

- Wuolikainen, A., Acimovic, J., Lövgren-Sandblom, A., Parini, P., Andersen, P. M., & Björkhem, I. (2014). Cholesterol, oxysterol, triglyceride, and coenzyme Q homeostasis in ALS. Evidence against the hypothesis that elevated 27-hydroxycholesterol is a pathogenic factor. *PLoS One*, 9(11), e113619.
- Xu, Z., Henderson, R. D., David, M., & McCombe, P. A. (2016). Neurofilaments as biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 11(10), e0164625.
- Yang, C., Tan, W., Whittle, C., Qiu, L., Cao, L., Akbarian, S., & Xu, Z. (2010). The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLoS One*, 5(12), e15878.
- Yang, J. W., Kim, S. M., Kim, H. J., Kim, J. E., Park, K. S., Kim, S. H., Sung, J. J. (2013). Hypolipidemia in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A possible gender difference? *Journal of Clinical Neurology*, 9(2), 125– 129.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H. X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Siddique, T. (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guaninenucleotide exchange factor domains is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 29(2), 160–165.
- Yu, B., & Pamplett, R. (2017). Environmental insults: Critical triggers for amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*, 6, 15.
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), pii: A018309.
- Zoing, M. C., Burke, D., Pamplett, R., & Kiernan, M. C. (2006). Riluzole therapy for motor neurone disease: An early Australian experience (1996– 2002). *Journal of Clinical Neuroscience*, 13(1), 78–83.
- Zou, Z. Y., Zhou, Z. R., Che, C. H., Liu, C. Y., He, R. L., & Huang, H. P. (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 88(7), 540–549.