

Kliinisten neurotieteiden osasto

Helsingin yliopisto

HUS Neurokeskus

Meilahden sairaala

Helsinki

Department of Clinical Neurosciences

University of Helsinki

Department of Neurology, Neurocenter

Helsinki University Hospital

Helsinki

Finland

# ALS Suomessa – kliiniset ja geneettiset piirteet

## ALS in Finland – clinical and genetic characteristics

Hannu Laaksovirta

Kliininen tohtoriohjelma (KLTO)

Doctoral programme in clinical research (KLTO)

Akateeminen väitöskirja,

joka Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan suostumuksella esitetään julkisesti tarkastettavaksi luentosalissa NNC, STB3.036, Meilahden sairaala, Siltasairaala, Haartmaninkatu 4. Helsinki, perjantaina 12. toukokuuta 2023 klo 13.

Doctoral dissertation,

to be presented for public discussion with the permission of the Faculty of Medicine of the University of Helsinki, in Auditorium NNC, STB3.036, Meilahti hospital, Bridge hospital, Haartmaninkatu 4. Helsinki, on the 12<sup>th</sup> of May, 2023, at 13 o'clock.

Helsinki 2023

Ohjaaja/Supervisor  
Professor Pentti Tienari  
Translational Immunology Program, Research Program Unit  
University of Helsinki and Helsinki University Hospital

Tarkastajat/Reviewers  
Adjunct Professor Mikko Kärppä  
Medical Research Center Oulu  
University of Oulu and Oulu University Hospital

Adjunct Professor Jussi Sipilä  
University of Turku  
North Karelia Central Hospital

Vastaväittäjä/Opponent  
Adjunct Professor Markku Sainio  
Finnish Institute of Occupational Health  
University of Helsinki and Helsinki University Hospital

The Faculty of Medicine uses the Ouriginal system (plagiarism recognition) to examine all doctoral dissertations.

ISBN 978-951-51-9164-9 (pbk.)

ISBN 978-951-51-9165-6 (PDF)

<http://ethesis.helsinki.fi/>

Unigrafia

Helsinki 2023

*Suomea puolustaneille*

## SISÄLLYSLUETTELO – TABLE OF CONTENTS

1. TIIVISTELMÄ .....	8
2. ENGLISH ABSTRACT.....	10
3. LYHENTEET - ABBREVIATIONS.....	12
4. JOHDANTO .....	15
5. KIRJALLISUUSKATSAUS .....	17
5.1 GEENIT JA MUTAATIOT .....	17
5.1.1    Genomi.....	17
5.1.2    Geenit.....	17
5.1.3    Geenien variaatiot .....	18
5.1.4    Populaatiogenetiikka.....	20
5.2 GENOMIIKAN TUTKIMUKSET .....	21
5.2.1    Kytöntäanalyysit.....	21
5.2.2    Sekvensointitekniikat.....	22
5.2.3    Assosiaatioanalyysit.....	22
6. JOHDANTO AMYOTROFISEEN LATERAALISKLEROOSIIN (ALS).....	25
6.1 MÄÄRITELMÄ.....	25
6.2 HISTORIALLINEN KATSAUS .....	25
6.3 VIRALLINEN TAUTILUOKITUS ICD.....	28
6.4 KLIININEN LUOKITUS .....	28
6.5 ALS:N TAUSTASYYYT .....	30
6.5.1    Oksidatiivinen stressi .....	30
6.5.2    Eksitotoksisuus.....	30
6.5.3    Mitokondriovauriot .....	31
6.5.4    Aksonaalisen kuljetuksen ongelmat .....	31
6.5.5    Kasvutekijät .....	31
6.5.6    RNA-aineenvaihdunnan häiriöt.....	31
6.5.7    Autoimmunteetti ja neuroinflammaatio .....	32
6.5.8    Apoptoosi.....	32
6.5.9    Elintavat ja liikunta .....	33
6.5.10   Ympäristötekijät.....	34

6.6	EPIDEMIOLOGIA .....	34
6.6.1	Ilmaantuvuus ja esiintymä.....	34
6.6.2	Katsaukset .....	35
6.6.3	ALS:n epidemiologia Suomessa .....	41
6.6.4	ALS-rekisterit.....	43
6.7	ALS:N KLIINISET PIIRTEET.....	44
6.7.1	Ei-motoriset piirteet .....	47
6.7.2	Frontotemporaalidegeneraatio (FTLD/FTD).....	47
6.8	DIAGNOSTIIKKA .....	49
6.8.1	ENMG.....	50
6.8.2	Kuvantavat tutkimukset .....	51
6.8.3	Laboratoriotutkimukset.....	52
6.8.4	Biomarkkerit .....	52
6.8.5	ALS-testit ja mittarit .....	54
6.9	ALS:N PATOLOGISET PIIRTEET .....	54
6.9.1	ALS-FTSD:n patologia .....	55
6.10	ALS:N HOITO .....	56
6.10.1	Rilutsoli.....	56
6.10.2	Edaravoni .....	57
6.10.3	Natriumfenyylibutyaatti + taurursodioli (NaPB + TUDCA) .....	58
6.10.4	Antisense-oligonukleotidit (ASO:t) .....	58
6.10.5	Muut tutkimusasteella olevat hoidot .....	59
6.10.6	Lääketutkimus Suomessa .....	59
6.11	ALS:N GENETIIKKA .....	59
6.11.1	Perheittäin esiintyvä eli Familiaalinen ALS (FALS) .....	59
6.11.2	Geneettinen epidemiologia.....	63
6.11.3	ALS-mutaatiot.....	64
6.11.4	Mutaatioiden tutkiminen käytännön kliinisessä työssä .....	75
6.11.5	Muut geenivirheet .....	77
6.11.6	ALS-mutaatiot kansainvälisissä tieto- ja biopankeissa .....	81
6.11.7	FTLD-mutaatiot .....	82
7.	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	83
7.1	EETTISET NÄKÖKOHDAT .....	83
8.	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	84
8.1	SUOMALAISET ALS-POTILAAT .....	84

8.2 EI-SUOMALAISET ALS-POTILAAT .....	84
8.3 FTD-POTILAAT .....	84
8.4 VERROKIT.....	84
8.5 MENETELMÄT .....	85
8.5.1 GWAS-tutkimus (I).....	85
8.5.2 NGS-tutkimus (II).....	85
8.5.3 Esiintymää tarkasteleva tutkimus (III) .....	86
8.5.4 <i>C9ORF72</i> -toistojaksomutaation aiheuttamaa kliinistä kuvaa tarkasteleva tutkimus (IV).....	86
9. TULOKSET JA POHDINTA .....	87
9.1 OSATYÖ (I).....	87
9.2 OSATYÖ (II) .....	89
9.3 OSATYÖ (III).....	91
9.4 OSATYÖ (IV).....	93
10. JOHTOPÄÄTÖKSET.....	98
11. YHTEENVETO .....	100
12. KIITOKSET.....	101
13. LÄHDEVIITTEET - REFERENCES.....	104

## ALKUPERÄISJULKAISUT – LIST OF ORIGINAL PUBLICATIONS

- I. **Laaksovirta H\***, Peuralinna T\*, Schymick JC\*, Scholz SW, Lai SL, Myllykangas L, Sulkava R, Jansson L, Hernandez DG, Gibbs JR, Nalls MA, Heckerman D, Tienari PJ, Traynor BJ. Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *Lancet Neurol.* 2010 Oct;9(10):978-85.

\* These authors contributed equally to this work

- II. **Renton A\***, Majounie E\*, Waite A\*, Simon-Sanchez J\*, Rollinson S\*, Gibbs JR\*, Schymick JC\*, **Laaksovirta H\***, van Swieten JC\*, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Tratzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Bannister J, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita V-M, Kaivorinne A, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, The ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM,\* Heutink P,\* Pickering-Brown S,\* Morris HR,\* Tienari PJ,\* Traynor BJ,\* A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011 Oct 20;72(2):257-68.

\* These authors contributed equally to this work

- III. **Majounie E**, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pampaloni R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium; French research network on FTLD/FTLD/ALS; ITALSGEN Consortium, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, **Laaksovirta H**, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 2012 Apr;11(4):323-30.

- IV. **Laaksovirta H**, Launes J, Jansson L, Traynor BJ, Kaivola K, Tienari PJ. ALS in Finland: Major mutations and clinical characteristics of patients with and without the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. *Neurol Genet.* 2022 Mar 14;8(2):e665.

## 1. TIIVISTELMÄ

Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) on yleisin aikuisiän liikehermoja rappeuttava sairaus. ALS:ssa aivojen ja selkäytimen liikehermot tuhoutuvat, mistä seuraa tahdonalaisen lihaksiston surkastuminen, mikä puolestaan johtaa kuolemaan keskimäärin 3–5 vuodessa.

ALS:ia esiintyy maailmalla hieman epätasaisesti. Osalla potilaista sairautta esiintyy suvussa. Vuonna 1993 löydettiin ensimmäinen ALS:ia aiheuttava geenivirhe, ja sen jälkeen niitä on löytynyt useita.

Osalla ALS:ia sairastavista esiintyy myös henkisten ja muistitoimintojen ongelmia ja se ilmenee yleensä otsa-ohimolohkorappeumana (FTLD). Näitä potilaista on usein samoissa suvuissa, mutta toistaiseksi yhdistelmän taustalta ei ole löytynyt tiettyä geenivirhettä.

ALS:n suhteellinen yleisyys Suomessa, Suomen väestön geneettiset erityispiirteet sekä toimiva terveydenhuolto ja väestötieteellisesti laadukas kirjanpito mahdollistivat ajatuksen, että ALS:n tutkiminen moderneilla genomiikan menetelmillä voisi olla tuloksellista. Suomessa aiemmin tehty korkeatasoinen populaatiogeneettinen tutkimustyö toimi innoittajana asiassa.

Tämän väitöskirjan tavoitteina oli tutkia ALS:n geneettistä taustaa ja taudinkuvaa. Väitöskirja koostuu neljästä osatyöstä.

**Osatyössä I** tutkittiin suomalaisilta ALS-potilailta vuosina 1993–2008 kerättyä näyteaineistoa ja todettiin koko perimän laajuudessa assosiaatioanalyysissä merkittävä yhteys kromosomeihin 9 ja 21. Kromosomissa 9 oleva tautiin kytkeytyvä muutos oli tuntematon, mutta se onnistuttiin rajaamaan noin 200kb alueelle, jossa sijaitsi ainoastaan kolme geeniä (*MOB3B*, *C9ORF72* ja *IFNK*). Kromosomin 21 assosiaatiosignaali johtui jo aiemmin tunnetusta Suomessa ja Ruotsissa yleisestä *SOD1*p.D91A mutaatiosta.

**Osatyössä II** tutkittiin löytynyttä ALS:iin kytkeytyvää kromosomin 9 geenialuetta kansainvälisen konsortion voimin. Tutkimuksessa käytettiin uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä, mutta siitä huolimatta geenivirheen löytäminen oli vaikeaa. Lopulta löydettiin geenissä *C9ORF72* sijaitseva geenivirhe, joka on kuuden emäksen mittainen toistojaksomutaatio (engl. hexanucleotide repeat expansion, *C9<sup>HRE</sup>*). Lisäksi todettiin, että HRE selittää taudin myös huomattavalla osalla FTLD:tä sairastavista. *C9<sup>HRE</sup>* on Suomessa erityisen yleinen, ja se löytyi 46 %:lta perhealtista ja 21 %:lta sporadista ALS:ia sairastavilta.

**Osatyössä III** tutkittiin *C9<sup>HRE</sup>*:n esiintymää ja ilmenemisyleisyyttä eri väestöissä eri puolilla maailmaa. Sen todettiin olevan yleisempi eurooppalaisperäisessä ja harvinaisempi aasialaisperäisessä väestössä. Suomessa *C9<sup>HRE</sup>* oli ylivoimaisesti yleisin sekä ALS- että FTLD-potilailta, ja kaikilla potilailta esiintyi sama taustahaplotyyppi viitaten geneettiseen perustajavaikutukseen (yhteinen esi-isä kaikilla mutaation kantajilla).

**Osatyössä IV** tutkittiin *C<sup>HRE</sup>*:n esiintymää ja osuutta suomalaisessa ALS:ia sairastavassa väestössä. Lisäksi tutkittiin *C9<sup>HRE</sup>*:n aiheuttamaa taudinkuvaa ja verrattiin sitä niiden ALS:ia sairastavien taudinkuvaan, joilla sitä ei ollut. Aineistossa, jossa oli 815 suomalaista ALS-



potilasta kerättynä vuosilta 1993–2020 *C9<sup>HRE</sup>* löytyi 31 %:lta ja *SOD1p.D91A* 9 %:lta. Nämä kaksi mutaatiota selittävät 40 % ALS:n taustasta Suomessa. *C9<sup>HRE</sup>* löytyi myös noin 20 %:lta sporadista ALS:ia sairastavilta osoittaen, että taudin syy on geneettinen, vaikka sukutaustaa ei ole. *C9<sup>HRE</sup>*:n aiheuttaman ALS:n todettiin alkavan hieman aikaisemmin ja etenevän nopeammin kuin muista syistä johtuvan ALS:n.

Tämän väitöskirjan tekijä kiittää Helsingin Yliopistoa mahdollisuudesta kirjoittaa väitöskirja suomeksi. Tarkoituksena ei ole edistää kielellistä eristäytyneisyyttä, vaan tavoittaa hieman enemmän suomenkielisiä lukijoita, jotka aiheesta kiinnostuneina voisivat omalta osaltaan viedä tutkimusta eteenpäin niin Suomessa kuin kansainvälisestikin. Tutkimuksen perimmäisenä pyrkimyksenä on löytää sairauksiin hoito.

## 2. ENGLISH ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most common adult-onset motor neuron disease. ALS is a progressive nervous system disease that affects nerve cells in the brain and spinal cord, causing degeneration of the voluntary muscle system and death, approximately in 3 to 5 years.

ALS occurs somewhat unevenly in the world. In some cases, the disease is familial. The first genetic defect causing ALS was discovered in 1993, and several others since then.

Some patients with ALS also have problems with mental and memory functions. This type of disease mainly manifests as Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD). These patients are often seen in the same families but until now, a specific genetic defect that could explain the combination of both diseases has not been found.

The relatively high prevalence of ALS in Finland as well as the distinctive features of the Finnish population's genetic history, the effective health care system, and the high-quality population registration enabled the thought that studying ALS with modern genomic procedures could be effective.

The already existing high-quality population genetic research carried out in Finland served as an inspiration for the idea.

The objectives of this dissertation were to examine the genetic landscape and clinical outcome of ALS.

This dissertation consists of an overview, four original publications, and a summary.

**In the original publication I**, the blood samples of 401 Finnish patients with ALS collected from 1993 to 2008 were analysed in a genome-wide association study, and the results showed a significant connection with an area in chromosomes 9 and 21. The disease-causing gene in chromosome 9 was unknown, but it was successfully outlined to an area of about 200kb, where only three genes (*MOB3B*, *C9ORF72*, and *IFNK*) were located. The association signal of chromosome 21 originated from a previously known mutation *SOD1*p.D91A that is prevalent in Finland and Sweden.

**In the original publication II**, the discovered genetic area of chromosome 9 showing a connection to ALS was researched by an international consortium. Notwithstanding, next-generation sequencing technology was used, but the detection of the genetic defect was difficult. Finally, a defect located in the gene *C9ORF72* was discovered. It was identified as a six-base long hexanucleotide repeat expansion mutation, *C9<sup>HRE</sup>*. In addition, *C9<sup>HRE</sup>* explained the disease also among a significant proportion of patients with FTLD. *C9<sup>HRE</sup>* is especially prevalent in Finland, and it was found in 46 % of familial and 21 % of sporadic patients with ALS.

**In the original publication III**, the occurrence of *C9<sup>HRE</sup>* and its penetrance in different populations around the world were studied, and it was found to be more common in

populations of European origin than those of Asian origin. In Finland, it was found to be the unconditionally most prevalent both in patients with ALS and FTLD, and all patients had the same ground haplotype which indicated a common genetic ancestor.

**In the original publication IV**, the frequency and rate of  $C9^{HRE}$  in the Finnish population with ALS were studied. In addition, the signs and symptoms caused by  $C9^{HRE}$  were compared to the ALS patients without  $C9^{HRE}$ . In a population of 815 Finnish patients with ALS collected between 1993 and 2020, the  $C9^{HRE}$  was found in 31 %, and  $SOD1p.D91A$  in 9 %. These two mutations explain 40 % of the background of ALS in Finland, which is more than in any other country.  $C9^{HRE}$  was also found in about 20 % of sporadic patients with ALS showing that the cause of the disease is genetic even in the absence of familial predisposition. ALS caused by  $C9^{HRE}$  was found to start slightly earlier and to have a shorter duration than ALS caused by other factors.

The author of this summary wants to express his gratitude to the University of Helsinki for the opportunity to write this doctoral thesis in the Finnish language. The intention is not to promote linguistic isolation but to reach more Finnish-speaking readers being interested in the topic, and thus contribute to the advancement of research both in Finland and internationally. The goal of medical research is to find a treatment for the diseases.

### 3. LYHENTEET - ABBREVIATIONS

Tässä yhteenvedossa käytetään alla listattujen lyhenteiden lisäksi seuraavaa selventävää mutta epävirallista lyhennettä:

**C9<sup>HRE</sup>** (engl. hexanucleotide repeat expansion, HRE) = C9ORF72 -proteiinia koodaavaan geeniin C9ORF72 liittyvä ALS- ja FTLD-sairauksia aiheuttava toistojaksomutaatio. Yksi jakso muodostuu kuudesta nukleotidistä, joiden emäsjärjestys on GGGGCC.

AD	Alzheimerin tauti
ALS	Amyotrofinen lateraaliskleroosi
ALSbi	Käytöshäiriöoirein ilmenevä ALS-FTSD
ALScbi	Kognitiivisin ja käytöshäiriöoirein ilmenevä ALS-FTSD
ALSci	Kognitiivisin oirein ilmenevä ALS-FTSD
ALS-EEc	El Escorial kriteerit
ALS-EEc-awa	El Escorial kriteerit awaji-lisäyksellä
ALS-EEc-R	El Escorial uudistetut kriteerit
ALS-FTLD	ALS ja otsa-ohimolohkorappeuma
ALS-FTSD	ALS ja otsa-ohimolohkorappeumaketjuun kuuluva sairaus
ALS-PDC	ALS-Parkinson-Dementia-kompleksi
AMPA	Ionotrooppinen glutamaatille reagoiva reseptori
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
BAD	Brachial amyotrophic diplegia, Ihminen tynnyrissä -oireyhtymä
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMI	Painoindeksi
bvFTD	Käyttöoirein ilmenevä frontotemporaalinen dementia
C9ORF72	Chromosome 9 open reading frame 72, Kromosomi 9 lukukehys 72
CBD	Kortikobasaalinen degeneraatio
CBS	Kortikobasaalinen oireyhtymä
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2B
CMT2	Charcot-Marie-Toothin tauti
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CNV	Kopiolukuvariaatio
CSF	Selkäydinneste
CST	Kortikospinaaliset eli aivokuorelta selkäyttimeen johtavat hermoradat
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
DPR	Dipeptide repeat protein
EAAT2	Eksitatoristen aminohappojen kuljettajaproteiini 2
EIM	Sähköinen impedanssimyografia
EMA	Euroopan lääkevirasto
ENMG	Elektroneuromyografia
EU	Euroopan unioni
FALS	Familiaalinen ALS
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
FET	Onkogeeneriperhe, johon kuuluvat FUS, EWSR1, TAF15
F-FTD	Familiaalinen eli perheittäin esiintyvä FTD
FRDA	Friedreichin ataksia

FTD	Frontotemporaalinen dementia
FTLD	Otsa-ohimolohkorappeuma
FTLD-MND	Otsa-ohimolohkorappeuma ja motoneuronitauti
FTLD-plus	Otsa-ohimolohkorappeuma ja parkinsonismimuodot
FTSD	Frontotemporal-spectrum disorder, otsa-ohimolohkosairauksiin kuuluva tauti
FUS	Fused in sarcoma
FVC	Nopea vitaalikapasiteetti
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillar acidic protein
GRN	Progranuliini
GWAS	Koko genomien kattava assosiaatiotutkimus
HD	Huntingtonin tauti
HGP	Human Genome Project
HSP	Perinnöllinen spastinen paraplegia
HSP	Perinnöllinen etenevä alaraajahalvaus
ICD	WHO:n kansainvälinen tautiluokitusjärjestelmä
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
iPSC	Indusoitu pluripotentti kantasolu
kDa	kiloDalton (1000 atomimassayksikköä)
LATE	Limbic-predominant age-related TDP-43-encephalopathy, TDP-43 -aivosairaus
LMN	Alempi motoneuroni
LOD	Logarithm of odds, lod-score
lvPPA	Logopeeninen etenevä afasia
MAF	Minor allele frequency , esiintymä, jolla toiseksi harvinaisin alleeli esiintyy populaatiossa
MAPT	Mikrotubuluksiin assosioituva proteiini tau
MD1	Myotoninen dystrofia tyyppi 1
MND	Motoneuronitauti
MR	Mendelistinen satunnaistaminen
MRI	Magnetic Resonance Imaging, magneettitutkimus
mRNA	Lähetä-RNA
MS	Multippeli skleroosi (Pesäkekovettumatauti)
MUNE	Motoristen yksiköiden määrän arviointi
MUNIX	Motoristen yksikköjen indeksi
NaPB	Natriumfenyylibutyraatti
NF	Neurofilamentti
NfL	Kevytketjuinen neurofilamentti
NfH	Raskasketjuinen neurofilamentti
nfvPPA	Etenevä sujumaton afasia
NGS	Toisen polven sekvensointitekniikka
PBP	Progressiivinen bulbaaripareesi
PD	Parkinsonin tauti
PIBS	Person-in-the-barrel syndrome, Ihminen -tynnyrissä -oireyhtymä, BAD
PLS	Primääri lateraaliskleroosi
PMA	Progressiivinen lihasatrofia
pNfH	Fosforyloitu raskasketjuinen neurofilamentti
PPA	Primaarinen etenevä afasia

PSP	Etenevä supranukleaarinen halvaus
RBP	RNA:ta sitova proteiini
RCT	Satunnaistettu vertailukoe
RNA	Ribonukleiinihappo
ROS	Reactive oxygen species, vapaat happiradikaalit
SALS	Sporadinen ALS
SBMA	Spinobulbaari lihasatrofia (Kennedyn tauti)
SCA	Spinokerebellaari ataksia
SIMOA	Single molecule array, ultraherkkä analyysimenetelmä
SIR	Vakioitu ilmaantuvuussuhde
SLE	Yleistynyt punahukka
SMA	Spinaalinen lihasatrofia
SMAJ	Jokela-tyyppin Spinaalinen lihasatrofia
SMN	Survival motor neuron protein
SNP	Single nucleotide polymorphism, yhden emäsparin vaihtelu (myös "pistemutaatio")
SNV	Single nucleotide variant, yhden emäsparin vaihtelu (myös "pistemutaatio")
SOD1	Superoksididismutaasi 1
SQSTM1	Sequestosomi
SVC	Hidas vitaalikapasiteetti
svPPA	Semanttinen dementia
TAF15	TATA-box binding protein associated factor 15
TDP-43	TAR DNA:ta sitova proteiini 43
TUDCA	Taurursodioli eli tauroursodeoksikoolihappo
TMS	Transkraniaalinen magneettistimulaatio
UBQLN2	Ubiquilin 2
UMN	Ylempi motoneuroni
UPS	Ubikitiini-proteasomisysteemi
VBM	Vokseligrafiikkaperusteinen magneettikuvaus
VCP	Valocin containing protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VUS	Merkitykseltään epävarma variantti
WES	Eksomisekvensointi
WGS	Koko genomien sekvensointi

## 4. JOHDANTO

Maaailman väestö ikääntyy. Vuoteen 2030 mennessä 65 vuotta täyttäneen väestön arvioidaan kasvavan 420 miljoonasta 960 miljoonaan (United Nations Population Division 2002).

Hermostoa rappeuttavat sairaudet lisääntyvät väestön ikääntyessä. Kaikille niille on ominaista tiettyjen hermosolujen tuhoutuminen, useimmissa tapauksissa toistaiseksi pääosin tuntemattomista syistä. Oireet johtuvat hermosolujen tyypistä ja tehtävistä sekä tuhoutumisen asteesta. Sairauksissa nähdään myös päällekkäisyyksiä, joskin ne ovat etenkin alkuvaiheissaan yleensä tunnistettavissa erillisiksi kokonaisuuksiksi.

Yleisimmät keskushermoston rappeumasairaudet ovat Alzheimerin tauti, Lewyn kappale-tauti, Parkinsonin tauti, otsa-ohimolohkorappeumat ja motoneuronitauti amyotrofinen lateraaliskleroosi eli ALS.

Mitkään mainitut sairaudet eivät todennäköisesti sinänsä ole uusi ilmiö ihmiskunnan historiassa. Niille on yhteistä se, että ne ilmenevät useimmiten vasta keski-ian kynnyksellä tai sen jälkeen. Suomalaisen miehen elinajan odote oli 1940-luvun alussa n. 55 vuotta ja naisen n. 61 vuotta. Tilastokeskuksen väestöennusteen (2001) arvion mukaan se on vuonna 2030 miehillä 79,2 vuotta ja naisilla 84,5 vuotta. Monissa kehitysmaissa odote on edelleen alle 60 vuotta.

Hermostoa rappeuttavat sairaudet ovat suurella todennäköisyydellä syntymekanismeiltaan monen tekijän summa. Ympäristö, perintötekijät ja sattuma muodostavat dynaamisen ja vuorovaikutteisen vyöhyden, jossa eri aikoina tapahtuvat erilaiset muutokset tekevät syiden ja seurauksien välisten yhteyksien löytämisen haastavaksi.

Perimän osuus eri sairauksien taustatekijänä vaihtelee suuresti. Osassa sairauksia taustalla on yhden geenin virhe, joka yksin määrää lopputulosta, ja toisissa useankaan geenivirheen yhteisvaikutus ei ole yksiselitteinen.

Perimään ja sen muutoksiin keskittyvä tutkimus ja teknologia ovat avanneet uusia näkö- ja tulokulmia myös hermoston rappeumasairauksien taustoihin ja olemukseen. Keskeisiä lainalaisuuksia ovat aluksi olleet Mendelin periytymissääntöjen ja DNA:n kaksoiskierrekenteen toiminnan ymmärtäminen. Näiden jälkeen ovat esiin astuneet vuonna 2003 yhteensä 3 miljardia US dollaria maksanut Human Genome-projekti, jossa ihmisen genomi sekvensoitiin eli sen alustava nukleotidijärjestys selvitettiin(1). Tämä työ tarkentuu koko ajan. Sekvensointimenetelmät ovat kehittyneet kiihtyvällä tahdilla, ja tällä hetkellä puhutaan jo kolmannen sukupolven tekniikoista. Mikrosirujen kehitys on vähentänyt kustannuksia ja mahdollistanut perimänlaajuisten assosiaatiotutkimusten (GWAS) käyttöönoton. Vaikka GWAS-tutkimukset ovat mahdollistaneet suuria monikansallisia tutkimusryhmien yhteistyöprojekteja ja tuottaneet valtavasti tietoa, on tiedon tulkinta edelleen haastavaa.

Eri geenivariantit saattavat vaikuttaa sairauksien puhkeamiseen eri tavoin erilaisissa väestöissä. Suomalaisen väestön geenien tutkimisen kannalta tunnusomaisia piirteitä ovat väestön muodostuminen alkujaan n. 10 000 vuotta sitten pienistä joukoista alueelle muuttaneita ihmisiä(2). Tämä ei kuitenkaan tarkoita yksiselitteisesti sitä, että suomalainen väestö olisi nimenomaisen homogeenistä. Esimerkiksi Itä- ja Länsi-Suomen väestö eroaa geneettisesti toisistaan enemmän kuin esimerkiksi englantilaiset ja saksalaiset toisistaan.(3). Nykysuomalaisen kantaväestönä on pidetty n. 2000 vuotta sitten maanviljelyksen yleistymisen myötä kiinteämmäksi muuntunutta kyläasukutusta(2). Kustaa Vaasan aikana 1500-luvulla tapahtunut muuttoaalto aiemmin asumattomiin Sisä-Suomen erämaihin oli myös populaatiogenetiikan kannalta merkittävä tapahtuma(2). Lisäksi erilaiset pullonkauloiksi nimetyt tapahtumat kuten sodat, epidemiat ja nälänhädät ovat pienentäneet väestön geneettistä vaihtelua. Maantieteellinen, kielellinen ja osin kulttuurinen eristyneisyys ovat mahdollistaneet harvinaisten alleelien eli vaihtoehtoisten geenimuotojen säilymisen ja

rikastumisen väestössä. Eristyneessä väestössä on myös mahdollista, että tietyt mutaatiot periytyvät yhteiseltä esivanhemmalta.

Reijo Norio, Harri Nevanlinna ja Jaakko Perheentupa toivat 1972 esiin ajatuksen suomalaisesta tautiperinnöstä. Lyhyesti kuvattuna se tarkoittaa sitä, että tietyt, maailmanlaajuisesti hyvin harvinaiset sairaudet ovat suomalaisessa väestössä yleisempiä kuin muualla, ja vastaavasti tietyt muut geneettiset sairaudet suomalaisten joukossa harvinaisia. Suomalaisesta tautiperinnöstä tuli sittemmin käsite lääketieteellisen genetiikan kansainvälisissä julkaisuissa(4).

Useimmille suomalaisen tautiperinnön sairauksille on tyypillistä, että niitä aiheuttavien geenivirheiden ilmentyminen on riippumaton tai lähes riippumaton ulkoisista tekijöistä. ALS:n kohdalla näin ei ole. ALS:n geneettinen kokonaiskuva huomattavasti monimuotoisempi kuin yksittäisen, suomalaiseen tautiperintöön luetun sairauden, ja ympäristötekijöiden osuus on kaikkea muuta kuin poissuljettu. Näyttää siltä, että ALS on Suomessa hieman yleisempi kuin useimmissa maissa, joissa asiaa on luotettavasti tutkittu(5,6). Onko tämä seurausta ALS:n genetiikasta, on jossain määrin avoin kysymys.



## 5. KIRJALLISUUSKATSAUS

### 5.1 GEENIT JA MUTAATIOT

#### 5.1.1 Genomi

Genomi eli perimä on eliön koko perintöaines sisältäen kromosomaalisen tuman DNA:n ja mitokondriaalisen mtDNA:n. Se voidaan ajatella eräänlaiseksi kirjastoksi, joka yksilöllä on jatkuvassa kopioinnin, korjauksen, muutoksen ja hajoamisen liikkeessä. Se voi olla vuosituhsia avikon hiekkaa tai ikiroutaan pysähtyneenä ja silti esimerkiksi kasvien siemenistä ja bakteereista herätettävissä toimintaan niin, että uusi elämä virkoo.

Perimän sanoma on koodattu biologiseen ohjelmaan ja sen perusmerkit muodostuvat nukleinihapon, sokeriosan ja emäksen eli nukleotidien järjestyksestä. Nukleotidit liittyvät toisiinsa muodostaen DNA:n kaksoiskierrteen, jota pitävät koossa emäsparit, joissa emäkset adeniini, sytosiini, guaniini ja tymiini merkitään kirjaimilla (A, C, G, T). Kolmen kirjaimen jakso eli kodoni on kuin sana, joka vastaa tiettyä aminohappoa(7). Tämä tieto muuttuu DNA:sta RNA:n kautta proteiineiksi eli valkuaisaineiksi, jotka muodostavat elimistön proteiiniirakenteet, entsyymit ja muut aineenvaihdunnassa tarvittavat toiminnot. Tätä prosessia määräävät DNA:n emästen toiminnalliset ketjut eli geenit. Geenien lukeminen on monivaiheinen prosessi, ja yksi geeni voi tuottaa monenlaisia proteiineja. Ihmisen perimän kokonaispituus on noin 3,3 miljardia emäsparia (3,3 Gbp). Koko perimän lukeminen ääneen nopeudella yksi emäs sekunnissa kestäisi siten hieman yli 100 vuotta. Emäsjärjestystä kutsutaan myös sekvenssiksi, ja sen läpiluentaa sekvenssoinniksi.

Ihmisen perimän selvittäminen aloitettiin 1990-luvun alussa, ja tuloksena oli 3 miljardia US dollaria maksanut Human Genome Project, HGP. Projektia oli kirittämässä yksityinen yritys Celera, joka valitsi hieman erilaisen sekvenssointitavan. Menetelmien tulokset julkaistiin 2001 johtavissa tiedelehdissä Nature ja Science. Yksittäisten ihmisten genomien sekvenssointi ei voi koskaan olla täysin ”valmis” ja suoraan yleistettävä tulos. Tulosta päivitetään jatkuvasti erilaisissa ohjelmissa ja tietopankeissa. Ihmisen perimästä puhuttaessa tarkoitetaan ns. referenssigenomia, joka on yleistys, eri väestöjen tyypillistä DNA-sekvenssiä parhaiten kuvaava päivittyvä sekvenssi.

#### 5.1.2 Geenit

Geenin käsite perustuu Gregor Mendelin vuonna 1865 kuvaamiin periytymisen sääntöihin, jotka hän muotoili pavuilla tekemiensä kokeiden tuloksista. Vuonna 1953 Watson ja Crick selvittivät DNA:n kaksoiskierreominaisuuden(8). Geeni on kehittyvä käsite, joka on laajentunut kattamaan eliön monenlaisia toimintoja. Ihmisellä geenien tarkka lukumäärä ei ole vielä varmistunut. Geenien koko vaihtelee muutamasta sadasta emäksestä yli kahteen miljoonaan. Yksilöllä geenin paikassa genomissa eli lokuksessa on yksi muoto geeniä eli alleelia, mutta väestöissä geenien eri alleeleja voi olla tuhansia erilaisia.

Proteiineja koodaavia geenejä on noin 20 000, lisäksi pelkkää RNA:ta tuottavia geenejä arvellaan olevan noin 40 000. Koko genomista proteiineja koodaa vain n. 1,5 %. Genomissa on lisäksi geenejä sääteleviä alueita (ns. promoottori- ja tehostaja-alueet), ja paljon geenien välistä DNA-aluetta, jonka toimintaa tunnetaan huonosti. Tätä ns. tilke-DNA:ta on aiemmin pidetty merkityksettömänä, mutta tiedon karttuessa näiden alueiden merkitys geenien ilmenemisen eli käynnistymisen ja sammumisen kannalta on jatkuvasti kasvanut. Säätelevien elementtien tarkempi luonnehdinta on tutkimuksen suurimpia haasteita. Myös geenien evoluution historiaa on mahdollista tarkastella näitä alueita tutkimalla.

Ihmisen perimän suuren emäsvaihtelun vaikutus näkyy mm. siinä, että eri maanosissa asuvien vaihtelun määrä on erilainen. Perimä vaihtelee eniten afrikkalaisissa väestöissä, mikä johtuu osittain ympäristöhaasteiden monimuotoisuudesta, mutta ennen kaikkea siitä, että nykyihmisen alkukoti on Afrikassa(9), josta sen katsotaan lähteneen siirtymään muihin maanosiin noin 100 000 vuotta sitten. Kahden ihmisryhmän emäsparien vaihtelu on luokkaa 0,1 %.

Samassa kromosomissa lähellä toisiaan olevat perimän variantit saattavat periytyä yhdessä vuosisatojen tai vuosituhansien ajan. Ilmiötä kutsutaan kytkentäepätasapainoksi (engl. linkage disequilibrium, LD), ja sitä pystytään hyödyntämään, kun selvitetään tauteja aiheuttavien geenien sijaintia. Tällä tavoin tunnettuja perimän variantteja voidaan käyttää markkereina tautigeenien paikantamisessa kromosomistoon(10). Tätä periaatetta hyödyntämällä onnistuttiin vuonna 1983 paikantamaan Huntingtonin tautia aiheuttava geeni kromosomiin 4(11).

Kattavan käsityksen saamiseksi perimän vaihtelusta ja sitä kautta tiedon valjastamiseksi käynnistettiin vuonna 2002 HapMap-projekti. HapMap määrittää ihmisen perimän haploryhmät ja jakaa tiedon ilmaiseksi. Haploryhmällä tarkoitetaan yhden nukleotidin vaihteluita (engl. single nucleotide polymorphism, SNP), jotka sijaitsevat genomissa lähekkäin ja periytyvät samassa ”blokissa” vanhemmilta jälkeläisille.

Mikrosirutekniikoiden kehityksen ansiosta geenien sekvensointi on halventunut ja nopeutunut. HapMapin tilalle on tullut käyttökelpoisempia tietokantoja kuten esimerkiksi 1000 Genomes, gnomAD, Personal Genome Project (PGP) ja muita. Suomen molekyyli lääketieteen instituutin FIMM:n koordinoimassa ja usean suomalaisen ja ulkomaisen yliopiston rahoittamassa Sequencing Initiative Suomi (SISu) -projektissa ([www.sisuproject.fi](http://www.sisuproject.fi)) pyritään tuottamaan suomalaisen perimän sekvenssitietokanta. Suomalainen väestö on hyvin edustettuna muissakin tietokannoissa. Suomalaisen perimä voidaan myös erottaa omaksi kokonaisuudekseen suhteessa muihin tietokantoihin, koska suomalaiseen tautiperimään kuuluu kantajuuksia, jotka ovat muualla harvinaisia ja myös toisinpäin(12).

### 5.1.3 Geenien variaatiot

Kaikilla eliöillä on variaatioita genomissaan. Variaatiolla tarkoitetaan tiettyä kohtaa, jossa esiintyy yksilöiden välillä erilaisia emäsjärjestyksiä. Ne voivat olla yhden nukleotidin kokoisia (SNP), lisäyksiä (insertio), häviämiä (deleetio), kääntymiä (inversio), siirtymiä (translokaatio), ja laajimmillaan kokonaisten kromosomien monistumia. Kopiaulukuvariaatiolla (engl. copy number variation, CNV) tarkoitetaan mikrotason deleetioita tai monistumia (duplikaatio, tripliikaatio jne.). Genomissa esiintyy myös toistojaksoja (engl. tandem repeats), jotka kuuluvat insertio/deleetio -variaatioiden luokkaan. Toistojaksojen pituus vaihtelee 1–10 nukleotidista aina satojen nukleotidien mittaisiin jaksoihin. Osa toistojaksoista on sellaisia, joita esiintyy useassa kohdassa genomia. Näitä nimitetään satelliiteiksi, minisatelliiteiksi (10–60 emästä toistojaksossa) ja mikrosatelliiteiksi (1–9 emästä toistojaksossa). Mini- ja mikrosatelliiteissa on paljon alleelista vaihtelua ja niitä hyödynnetään yksilöntunnistamisessa oikeuslääketieteessä ja kytkentäanalyyseissä. Näistä toistojaksoista on toisinaan käytetty myös nimitystä variable number of tandem repeats (VNTR). Ne sijoittuvat genomissa geenien säätelyalueille ja voivat vaikuttaa geenin ilmentymiseen(13,14).

Kun tutkittava sairaus ja mikrosatelliitti periytyvät perheaineistossa odotusarvoa useammin, voidaan sanoa, että sairauden aiheuttaja (todennäköisesti) sijaitsee kyseisen mikrosatelliitin läheisyydessä. Yhden geenin virheen aiheuttamia toistojaksosairauksia tunnetaan yli 50(15),

ja ne ovat enimmäkseen neurologisia sairauksia. Tunnetuimpia ovat mm. särö-X-oireyhtymä (Fragile-X), tietyt ataksiat, vallitsevasti periytyvät myotoniset dystrofiat 1 ja 2, Huntingtonin tauti ja tähän väitöskirjatyöhön liittyvä ALS-FTLD-kompleksi(16).

Vaihtelu tekee yksilöt erilaisiksi, vaikkakin kahden ihmisen genomien DNA-sekvenssi on 99,9 %:sti identtistä. Harvinaisilla geneettisillä variaatioilla (minor allele frequency (MAF)  $\leq 5\%$ ) on usein merkittävämpi yhteys sairauksiin kuin yleisillä, koska ne sijaitsevat usein geenien koodaavilla alueilla(17). Genominlaajuiset assosiaatiotutkimukset ovat tyypillisesti keskittyneet yleisempiin variantteihin(18).

Variaatioita voidaan kutsua myös mutaatioiksi. Tässä yhteenvedossa käytetään jäljempänä sanaa mutaatio. Käytäntö on valittu siksi, että yhteenvedossa siteerattujen alkuperäistutkimusten ja siten yhteenvedon osatutkimusten (poikkeuksena osatyö IV) sananvalinnoissa mutaatio on selvästi käytettyin.

Sekä solun sisäiset että ulkoiset tekijät voivat synnyttää mutaatioita, ja kun ne syntyvät muissa kuin sukusoluissa (iturata), niitä kutsutaan hankinnaisiksi eli somaattisiksi mutaatioiksi. Somaattisella mutaatiolla tarkoitetaan siis yksilönkehityksen aikana hedelmöityneen munasolun ensimmäisen jakautumisen jälkeen syntyneitä mutaatioita. Ulkoisia mutaation aiheuttajia ovat tietyt kemikaalit, ionisoiva säteily ja jotkut virukset. Sisäisiä mutaation aiheuttajia voivat olla metylaatio, hapettuminen tai muu stressi soluissa sekä solun jakautuminen yhteydessä tapahtuneet virheet. Uusimmat tutkimukset viittaavat siihen, että suurin osa mutaatioista on solunjakautumisesta riippumattomia(19). Niiden muodostumisen frekvenssi vaihtelee eri nisäkkäillä ja korreloi elinikään(20).

Todennäköisyydeksi sille, että tietyn nukleotidin kohdalle syntyy mutaatio, on arvioitu ihmisellä keskimäärin  $1,8 \times 10^{-8}$  (21). Mutaatioiden syntytahti myös vaihtelee eri kudoksissa. On arvioitu, että esimerkiksi ihmisen maksan ja suoliston hitaasti uusiutuviin kantasoluihin syntyy keskimäärin 36 uutta mutaatiota joka vuosi(22). Mutaatioiden lisääntyminen ja sitä kautta kudoksen uusiutumiskyvyn heikentyminen on osa normaalia ikääntymistä. Elimistö kykenee myös korjaamaan mutaatioita.

Mutaatiot voivat olla harmittomia tai jopa hyödyllisiä antaessaan yksilölle jonkin edun evoluution valintapaineessa. Esimerkkinä on laktoosi-intoleranssi. Siinä maitosokeria pilkkova entsyymi, joka normaalisti on vaimentunut aikuisiässä, ei mutaation takia vaimenekaan. Tämä johti siihen, että karjankasvatuksen yleistyessä mutatoituneen entsyymin kantajat saattoivat aikuisinakin hyödyntää maitoa ja sitä kautta myös kalsiumia ja energiaa ongelmitta, mikä tuotti heille etua tilanteessa, jossa ravintoa on ollut vähemmän saatavilla.

Osa mutaatioista on todennäköisesti harmittomia, osan merkitys on epävarma (engl. variant of uncertain significance, VUS). Osa on todennäköisesti ja osa varmasti patogeenisiä eli sairautta aiheuttavia. Käsite tautigeeni ei ole hyvä, koska pääosa patogeenisistä mutaatioista sijaitsee geeneissä, jotka ovat tarpeellisia.

Sukusoluissa tai hyvin pian hedelmöityksen jälkeen syntyviä mutaatioita kutsutaan *de novo* -mutaatioiksi, ja tällainen löytyy siis vain jälkeläiseltä mutta ei hänen vanhemmiltaan eikä muiltakaan sukulaisilta.

Mutaatio on patologinen, jos sen ilmeneminen johtaa sairauteen. Tällöin sen on oltava kudoksessa, jolla on patologisen ilmenemisen kannalta merkitystä, eli mutaatio hermoston solussa aiheuttaa hermoston ongelmia. Sama mutaatio muun kudoksen solussa voi olla harmiton.

Monogeenisten eli mendelöivien tautien syynä on mutaatio toisessa tai molemmissa alleleissa. Ne ovat pääsääntöisesti harvinaisia, mutta erilaisia monogeenisiä tauteja on tuhansia. Pelkästään lihaskudokseen vaikuttavia sairauksia on määrittelytavasta riippuen useita satoja.

Periytymistapoja ovat autosominen (ei-sukupuolikromosomit X tai Y) vallitseva (dominantti) periytyminen, jossa sairastuneen lasten riski saada mutaatio on 50 %. Autosomisessa

peittyvässä (resessiivisessä) periytymisessä sairaan vanhemmat ovat yleensä terveitä, ja heidän lapsillaan riski on 25 %. Tässä tilanteessa sairaan vanhemmat ovat usein sukua keskenään tai kuten Suomessa usein, omaavat sukujuuret samalla tai läheisellä paikkakunnalla. X-kromosomiin voi niin ikään liittyä sekä vallitseva että peittyvä periytyminen. Y-kromosomin perintöaines on suhteellisen vähäinen, ja siihen liittyvät ominaisuudet ilmenevät vain miehillä. Yksiselitteisesti Y-kromosomissa periytyviä sairauksia ei toistaiseksi tunneta, mutta Y-kromosomin mosaiikki-tyyppinen alentunut toiminta on yhdistetty muutamiin sairauksiin(23).

Mutaation aiheuttaman taudin ilmenemiseen liittyy käsite penetranssi eli ilmenemisyleisyys(24). Sen laskemiseksi on useita tapoja, mutta käytännössä sillä kuvataan mutaation kykyä lyödä itsensä läpi. Penetranssi on myös suhteutettava yksilön ikään. Tällainen tilanne on esimerkiksi Huntingtonin taudissa, jossa osa mutaation kantajista sairastuu vasta iäkkäänä. Sairaus ei välttämättä ole tullut esiin väestössä, jossa elinajanodote on ollut alhainen. Tilannetta kutsutaan Gompertzin sairauksien välisen kilpailun ilmiöksi(25). Penetranssi ilmaistaan prosenttilukuna, joka ilmaisee kuinka suuri osa tietyn genotyypin kantajista ilmentää tiettyä ominaisuutta fenotyypissään eli ilmiasussaan, joka on havaittavien ominaisuuksien kokonaisuus. Jos esimerkiksi sairautta aiheuttavan geenivirheen penetranssi on 100 %, kaikki sitä kantavat sairastuvat. Harvinaiset mutaatiot (esim. <1 % frekvenssillä populaatiossa esiintyvät) ovat todennäköisemmin tautia aiheuttavia ja penetrantteja kuin yleiset variaatiot, joiden yksittäinen taudinaiheuttamiskyky on heikko(26). Useat ulkoiset ja epigeneettiset tekijät (mutatoituneen geenin hiljentäminen) voivat vaikuttaa penetranssiin.

#### 5.1.4 Populaatiogenetiikka

Populaatiogenetiikka tutkii alleeli- ja genotyypifrekvenssien esiintymiä ja niiden muutoksia ajassa ja paikassa. Genotyyppi on yksilön vanhemmiltaan perimien alleelien kokonaisuus. Eri väestöissä korostuvat erilaiset alleelit kuin toisissa. Genotyypifrekvenssi on tietyn genotyypin omaavien osuus väestöstä, ja alleelifrekvenssi kertoo kuinka suuri osuus tietyn lokuksen alleeleista on tiettyä tyyppiä.

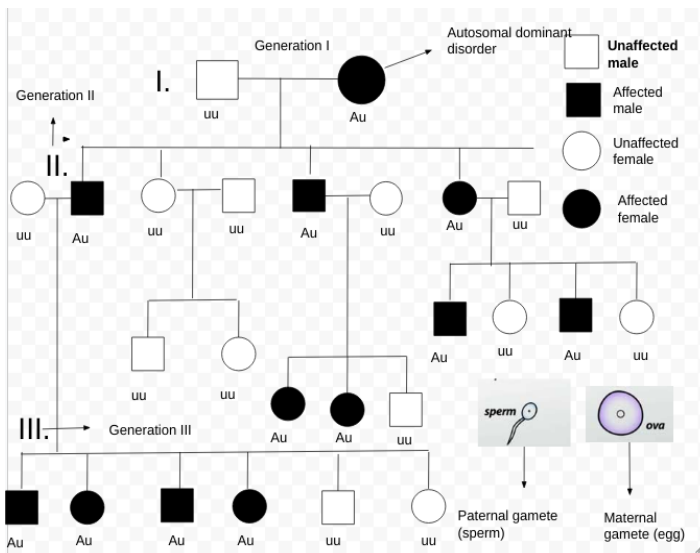
Populaatiogenetiikan tärkeä työkalu on Hardy-Weinbergin laki, joka kuvaa sitä, miten alleeli- ja genotyypifrekvenssit ovat tasapainossa tutkittavassa populaatiossa. Määritelmä on puhtaan matemaattinen, eikä ota huomioon evoluutiopaineita, *de novo*-mutaatioita, muuttoliikkeitä, valikoivaa parinvalintaa jne, mutta mallintaa hyvin erilaisia poikkeamia populaation koostumuksessa, kun oletuksena on satunnaisotos populaation geenivarastosta. Näitä poikkeamia voivat olla luonnonvalinta (jokin genotyyppi antaa positiivisen tai negatiivisen valintaedun), populaation muodostuminen toisistaan eriytyneistä ryhmistä, geneettisesti samankaltaisten tai keskenään sukua olevien yksilöiden taipumuksesta paritua keskenään jne.

Väestöjen alleelifrekvenssien eroja selittävät paitsi mutaatiot, myös ympäristön valintapaine, perustajavaikutus ja ilmiö, jota kutsutaan sattuman sysäilyksi tai ajautumiseksi (engl. genetic drift). Sattuman sysäilyllä tarkoitetaan alleelien sattumasta johtuvaa vaihtelua, jonka vaikutus on sitä suurempi mitä pienempi väestö on. Sen on arvioitu vaikuttavan vielä noin 250 000 yksilön väestössä. Perustajavaikutus (engl. founder effect) kuvaa tilannetta, jossa väestö käy läpi jonkinlaisen pullonkaulatilanteen kuten sodan, nälänhädän, epidemian tai joutuu maantieteelliseen tai kulttuuriseen eristyisyyden tilaan. Tällöin vähentyneen väestön geneettinen vaihtelu vähenee, ja sen jälkeläisilleen välittämä genitieto monistuu sisältäen harvinaisia alleleja enemmän ja toisia vähemmän. Perustajavaikutus ja sattuman sysäilyn ovat vaikuttaneet voimakkaasti suomalaisen väestön geenikirjoon.

## 5.2 GENOMIIKAN TUTKIMUKSET

### 5.2.1 Kytkentäanalyytit

Kytkentätutkimuksissa on olennaisena tekijänä tautigeenin periytyminen saman suvun sisällä tietyn kromosomin markkereiden mukana. Kun hypoteettinen mutaatio ja sen mukana periytyvä markkeri havaitaan useita kertoja sairailta suvun jäsenillä mutta ei terveillä, kasvaa todennäköisyys sille, että ne ovat geneettisesti kytkeytyneet toisiinsa (Kuva 1.). Tätä todennäköisyyttä kuvataan kymmenjärjestelmän logaritmisella todennäköisyysuhteella eli lod-luvuilla (logarithm of odds, lod-score, LOD). Perinteisesti lod-score  $>3$  on pidetty tilastollisesti merkittävän kytkenän osoituksena (vastaa p-arvoa  $<0,001$ ). Lod-score 3 tarkoittaa sitä, että tutkitavan sairauden/ominaisuuden ja tutkitun geenimerkin yhdessä periytyminen on tuhat kertaa todennäköisempää kuin niiden periytyminen toisistaan riippumatta.



**Kuva 1.**

Vallitsevan eli dominantin geenivirheen (A) periytyminen kolmessa sukupolvessa.

*Lähde: Wikipedia Free Encyclopedia.*

Kytkentäanalyytit tulivat käyttöön 1990-luvun alussa. Niissä tarvitaan useiden lähisukulaisten, terveiden ja sairaiden näytteitä, jotta saadaan riittävä tilastollinen voima. Periaatteena on tunnistaa geneettinen tekijä, ns. markkeri, joka periytyy perheessä sairauden mukana, mutta jota ei löydy terveiltä perheenjäseniltä. Käytännössä tulokset lasketaan ja analysoidaan tätä varten suunnitelluilla tietokoneohjelmilla. Parhaimmat tulokset on saatu monogeenisten eli yhden geenivirheen aiheuttamien tautien tutkimisessa, ja menetelmällä on paikannettu tuhansia mutaatioita. Ensimmäisenä tätä menetelmää sovellettiin menestyksellä Huntingtonin taudissa(11). Suomalaisen tautiperinnön selvittämisessä kytkentäanalyytit on ollut merkittävä osa(27,28). Termi suomalainen tautiperintö kuvattiin Duodecim teemanumerossa 1/1972(29) ja englanninkielisessä kirjallisuudessa vuotta myöhemmin(30).

## 5.2.2 Sekvensointitekniikat

Vuonna 1977 käyttöön tuli ns. ensimmäisen sukupolven sekvensointi- eli läpiluentatekniikkana entsyymaattinen Sanger-sekvensointi, joka oli kallista. Sittenkin Sanger-tyyppisessä sekvensoinnissa työläs elektroforeesi on korvattu muilla tekniikoilla.

Toisen polven sekvensointitekniikat eli massiiviset rinnakkainsekvensoinnit (NGS) tulivat käyttöön 2005 jälkeen. Kaupallisia tuotteita toivat markkinoille mm. Roche, Illumina ja Applied Biosystems. NGS perustuu <300 emäsparin jaksoihin, joita luetaan ja linjataan verokkigenomia vasten. Tekniikalla pystytään sekvensoimaan miljoonia DNA-fragmentteja samanaikaisesti ja edullisesti ilman elektroforeesia yhdessä päivässä. Sekvenssiä muodostettaessa käytetään bioinformatiikkaohjelmistoja.

Tekniikan kehitys mahdollisti ensin kliiniseen käyttöön tulleet geenipaneelit, ja sittenkin laajemman eksomisekvensoinnin (WES), jossa pystytään keskittymään 1,5 %:iin genomista eli proteiineja koodaavaan osaan. WES on suhteellisen kustannustehokasta, ja sillä on käyttöä etsittäessä uusia tautigeenejä tai tautia aiheuttavia genomien alueita. WES on käyttökelpoinen myös yksilötasolla, esimerkiksi jos potilaan taudinkuva on merkittävän epätyypillinen.

Koska ei-koodaavan alueen merkitys on kasvamassa, on siirrytty koko genomien kattavaan sekvensointiin (WGS). Tämä on kuitenkin kalliimpaa ja tulokset työläitä tulkita etenkin yksilötasolla. Myös sattumalöydösten merkityksen arviointi on haastavaa.

Myös erikseen määriteltyihin genomien alueisiin sekä epigenomiin ja RNA:han kohdentavia tekniikoita on saatavilla. Näitä voidaan räätälöidä hyvinkin kapeasti rajattuihin tarkoituksiin. Genotyyppitys voidaan tehdä pelkillä mikrosirualukkeilla (engl. microarray, biochip). Näissä käytetään ennalta tunnistettujen sekvenssien pohjalta rakennettuja oligonukleotideja, joiden avulla näytteistä havaitaan mutaatioita ja SNP:ja. Mikrosirut ovat myös halvempia kuin varsinaiset sekvensointimenetelmät. Myös mikrosirujen tuottama tieto on prosessoitava bioinformatiikkaohjelmilla.

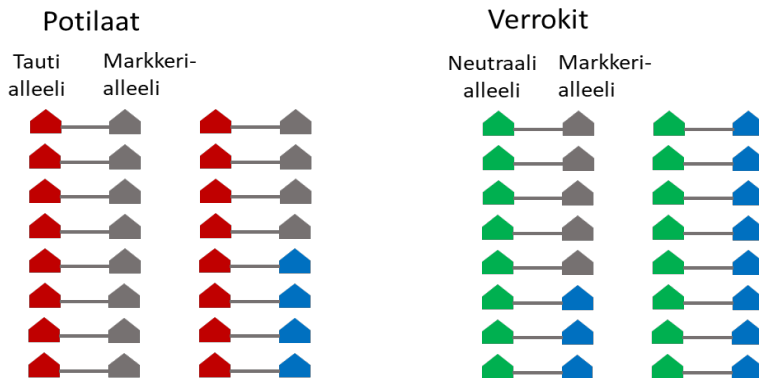
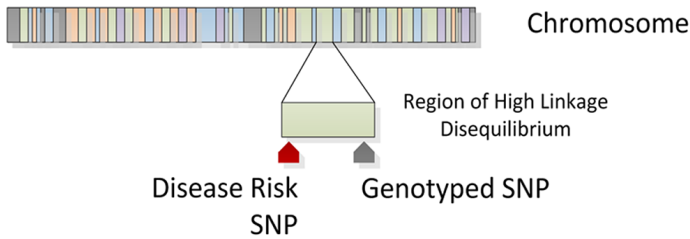
Vuodesta 2011 alkaen käyttöön alkoi tulla kolmannen sukupolven (ns. long read) laitteita, jotka tuottavat jopa kymmenien tuhansien emäsparien pituisia lukuja ja ovat entistä nopeampia osin siksi, että PCR-reaktio voidaan sivuuttaa. Nopeuden kääntöpuolella on suurempi virhemarginaali. Odotukset eivät ole vähäiset, ja esimerkiksi epigeneettisten markkereiden nykyistä suurempi luonnehdinta olisi arvokasta. Samoin erityisesti patologisten toistojaksojen tunnistamisessa long-read-tekniikoihin on ladattu odotuksia. Samoin nopeus ja laitteiden pieneneminen matkapuhelimen kokoisiksi USB-väylään liitettäviksi voisi mahdollistaa käytön jopa sairaaloiden osastokierrolla tai kenttäolosuhteissa. Tekniikassa on kuitenkin paljon kehitettävää. Kaupallisia toimijoita ovat esimerkiksi Pacific Bioscience, Bionano Genomics ja Oxford Nanopore Technology.

Lähitulevaisuudessa ja osittain jo nykyisin NGS-tekniikoita täydentää optinen genomikartointi. Tekniikka perustuu useiden satojen tuhansien emäsparien pituisten entsyymaattisesti leimattujen DNA-jaksojen kuvantamiseen(31).

## 5.2.3 Assosiaatioanalyysit

Sairautta aiheuttavan geenin kanssa kytkentäepätasapainossa olevia alleeleja voidaan tunnistaa myös ilman erityisesti kerättyjä perhenäytteitä. Tällöin voidaan tehdä assosiaatiotutkimus, jossa tautigeenin paikantaminen perustuu kytkentäepätasapainoon eli tilastolliseen yhteyteen siitä, että tietty markkeri-alleeli esiintyy väestössä sattumaa useammin yhdessä tautialleelin kanssa (Kuva 2.).

## Indirect Association



**Kuva 2.**

Epäsuora assosiaatio, eli tautiin/tilaan kytkeytyy SNP (disease risk SNP), joka ei sinänsä aiheuta tautia, mutta toimii paikantavana markkerina alueelle, jossa tautia aiheuttava variaatio sijaitsee. Alueella on korkea kytöntäepätasapaino (linkage disequilibrium, LD). Kuvan alaosassa tautia esiintyy ensisijaisesti harmaalla merkityn markkerialleelin yhteydessä ja näin syntyy assosiaatio tautialleeliin.

Lähde: Bush WS, Moore JH (2012) Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002822. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002822>. Alkuperäisen kuvan käyttöoikeus varmistettu kustantajalta.

Koko genomin kattaviksi laajentuneet assosiaatiotutkimukset (GWAS) alkoivat yleistyä 2000-luvun ensimmäisen vuosikymmenen lopulla. GWAS mahdollistaa myös hypoteesittoman lähestymistavan, mikä on merkittävä ero aiempiin ehdokas- ja kandidaattigeenitutkimuksiin. GWAS-tutkimuksessa voidaan käyttää satoja, tuhansia, tai jopa kymmeniä miljoonia geenimerkkejä, joiden sijainnit genomissa ja suhteessa toisiinsa tunnetaan. Siinä tyypillisesti erotellaan tietyn piirteen omaavat yksilöt omaan ryhmäänsä (tapaukset eli sairaat) ja heille muodostetaan ominaisuuden suhteen negatiivinen verrokkiryhmä (verrokkit). Kun ryhmien alleelit on määritetty mikrosiruilla, selvitetään alleelien ja genotyypin erot tilastollisilla menetelmillä. GWAS tuottaa tyypillisesti ns. Manhattan-kuvion, jossa x-akselilla (vaaka-akseli) ovat kromosomit numerojärjestyksessä, ja y-akselin (pysty-akseli) arvo osoittaa alleelijakaumien eron merkitsevyyttä tapausten ja verrokkien välillä. Kuvioon merkitään tilastollisesti merkittävien arvojen raja – tavanomaisimpana kynnyksenä  $p < 5 \times 10^{-8}$  ja mahdollisesti merkitsevänä  $p < 1 \times 10^{-5}$ .

GWAS-tutkimus ei ole halpaa sikäli, että se vaatii jopa tuhansien ihmisten otokset. Biopankkien kehitys on auttanut tässä. Suuret otoskoot ovat tarpeen, koska jos ne

monimutkaisia sairauksia tutkittaessa eivät ole riittävän suuria, on riskinä se, että harvinaiset tautiin liittyvät variantit jäävät löytymättä. GWAS-tutkimuksessa on tärkeää, että sairastuneiden ja verrokkien otokset tulevat samasta populaatiosta, sillä muuten löydökset saattavat ilmaista populaatioiden eroja eivätkä liity tutkittavaan sairauteen. Otoksen edustavuus pyritään varmistamaan ositetulla otannalla (engl. stratified sampling), jolla varmistetaan, että tärkeät ryhmät ovat edustettuna otoksessa samassa suhteessa kuin perusjoukossa.



## 6. JOHDANTO AMYOTROFISEEN LATERAALISKLEROOSIIN (ALS)

### 6.1 MÄÄRITELMÄ

Nimi Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS) pohjautuu neuroanatomiseen ja neuropatologiseen ajatteluun. Sana ”amyotrofinen” viittaa lihasten kasvun vastakohtaan eli surkastumiseen. ”lateraalinen” viittaa aivokuorelta alkaviin selkäytimen etu- ja sivuosissa ”lateraalisesti” kulkeviin laskeviin hermoratoihin, ja ”skleroosi” tuhoutuneiden hermojen ja ratojen arpeutumiseen.

### 6.2 HISTORIALLINEN KATSAUS

Etenevän lihassurkastuman eli progressiivisen lihasatrofian käsitteen toivat tieteelliseen kirjallisuuteen Charles Bell (1774-1842)(32), François-Amilcar Aran (1817-1861)(33) ja Jean Cruveilhier (1791-1874)(34).

Näihin aikoihin voidaan katsoa alkaneen lihasperäisten (myopatiat) ja hermoperäisten lihassurkastumien käsitteiden eriytyminen. Liikehermojen patologisten muutosten urauurtavana kuvaajana voidaan pitää Jacob Augustus Lockhart Clarkea (1817-1880)(35).

ALS:n ensimmäisenä kuvaajana pidetään Jean-Martin Charcot'ta (1825–1893). Charcot ei ollut ensimmäinen, joka kuvasi tapauksen, jonka voidaan katsoa olevan ALS, mutta hän kokosi yhteen aiempien tutkijoiden tuloksia. Vuonna 1865 Charcot kuvasi tapausselostuksen nuorehkosta naisesta, jonka diagnoosia oli aiemmin pidetty hysterioihin kuuluvana, mutta jonka oirekuvaan ilmaantuivat puhtaasti motorinen vaurio, jota leimasivat jäykkyyks ja kaikkien raajojen spastisuus henkisten kykyjen säilyessä normaaleina. Tämän potilaan ruumiinavauslöydöksiä Charcot osoitti selkäytimen lateraalisten kolumnien surkastumisen. Jo aiemmin, vuonna 1853 Cruveilhier oli kuvannut 35-vuotiaana kuolleen miehen kliiniset ja patologiset löydökset, jotka sopivat ALS:iin. Ajan tavan mukaan tapaus kulki tieteellisessä keskustelussa potilaan omalla nimellä(36). Vuonna 1869 Charcot ja hänen oppilaansa Alix Joffroy julkaisivat klassiset tapausselostukset, joissa kuvattiin ääreishermoston ja selkäytimen lateraalisten kolumnien vauriot potilailla, joilla oli sekä bulbaari- että raaja-alueiden lihassurkastumat(37).

Charcot'n ansiot ALS:n ensimmäisenä kuvaajana johtuvat paljolti siitä, että vaikka hän oli ensisijaisesti klinikko, hän kuvasi sairauden muussakin valossa kuin vain tapausselostuksina. Täten hän pohjusti kliinis-patologisen alustan (méthode anatomoclinique), jonka pohjalle myöhempien tutkijoiden kuvaukset oli helpompi rakentaa. Vuonna 1873 hän esitteli termin 'amyotrofinen' selventääkseen käsitystään siitä, että lateraalisten kolumnien eli aivokuorelta selkäytimen motorisiin hermoihin kulkevien ratojen vaurio on jollain tapaa johtamassa lihasten atrofiaan (sclérose latérale amyotrophique). Julkaisujen lisäksi merkittävä osa Charcot'n löydöksistä tuodaan esille hänen luentosarjoissaan, jotka on alan klassikkoina käännetty useille kielille(38,39).

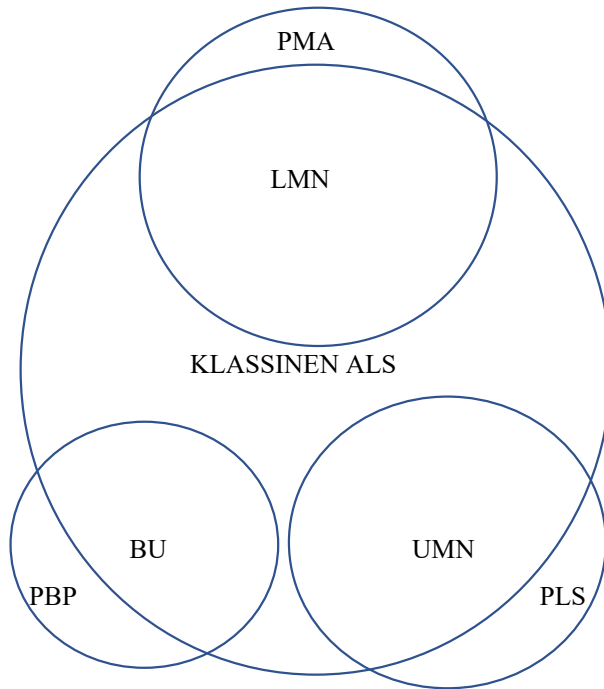
Tiettävästi Charcot'lla oli henkilökohtaista kokemusta vain viidestä potilaasta, ja lisätieto hän haki keräämällä tiedot 15 muusta. Koska 1800-luvulla elinajanodote oli nykyistä alhaisempi, voidaan ALS:n arvioida olleen tuolloin nykyistä harvinaisempi, ja useimmat kuvaukset koskevat potilaita, jotka olivat neli- tai viisissäkymmenissä. Toisaalta Charcot'n toimipaikka oli valtava Salpêtrièren sairaala, jonka potilaat olivat paljolti iäkkäämpiä varattomia naisia.

ALS:n taksonomian kehittyminen kytkeytyy kiinteästi siihen, miltä pohjalta tahdonalaisen lihasheikkouden katsottiin kehittyvän niillä alueilla, joilla sairaus ilmenee. Epätietoisuutta oli esimerkiksi siitä nimitäänkö kliinisesti niinkin erilaiset oirekuvat kuin W.H. Erbin kuvaama primaari lateraaliskleroosi (PLS)(40) ja progressiivinen lihasatrofia (PMA) samaksi

sairaudeksi. Oman haasteensa toi progressiivinen bulbaaripareesi, (PBP) jonka varsinaisesti nimesi A. Wachsmuth 1859. Charcot'n näkemys oli, että progressiivinen PBP ja ALS ovat eri sairauksia.

Vuonna 1899 Sir William Gowers esitti näkemyksensä, että termi ALS ei ole mielekäs, koska se antaa ymmärtää, että taudin alkukohta on nimenomaan pyramidiradoissa, ja muu solutuho on sekundaarista(41). Gowers katsoi, että PMA, PLS, ALS ja PBP ovat saman sairauden jatkumoa. Vuonna 1933 Walter Russell Brain esitteli termin motoneuronitauti (motor neuron disease (MND))(42), tarkoituksenaan koota liikehermorappeumat yhden nimikkeen alle. 1900-luvun ensimmäisellä puoliskolla julkaistiin sarjoja kliinis-patologisia selostuksia, joiden yhteinen nimittäjä oli se, että PMA, PLS, ALS ja PBP ovat saman sairauden eri muotoja (Kuva 3.). Nimitys motoneuronitauti nousi vielä 1970-luvulla erottelemaan klassisen ALS:n erilliseksi, joskin keskeiseksi ilmenemismuodoksi, joka vain sitoo yhteen sarjan erillisiä ääripäitä. Vuonna 1982 Rowland totesi, että käytössä oleva nimitys motoneuronitauti (motor neuron disease, MND) kärsii myös monikollisen termin motoneuronitaudit (motor neuron diseases) samanaikaisesta käytöstä(43). Tarkentavaksi ajateltua nimikettä motoneuronitauti vastaan on nostettu esimerkkeinä kuvauksia perheistä, joiden eri jäsenillä esiintyy eri alamuotoja. Nimike on edelleen laajalti käytössä brittiläisellä kielialueella, jossa se on jonkin verran antamassa tilaa käsitteelle ALS.

Nimikkeiden ero on aiheuttanut hämmennystä myös potilaissa – esimerkiksi ENMG-tutkimuksen vastauksissa lausuttu löydöksen viittaaminen motoneuronitautiin on toisinaan saanut lausuntoa lukevat ajattelemaan, että viitteitä ALS:sta ei ole.



**Kuva 3.**

ALS:n alamuodot. PMA = progressive muscular atrophy (etenevä lihassurkastuma), PLS = primary lateral sclerosis (primaari lateraali skleroosi), PBP = progressive bulbar paresis (etenevä bulbaaripareesi), LMN = lower motor neuron (alempi liikehermo), UMN = upper motor neuron (ylempi liikehermo, Bulbar onsets = nielun lihaksista alkava. Kuvioiden koko on suuntaa antava.

Eponymillä tarkoitetaan sairauden nimeämistä tietyn henkilön, kuten ensimmäisen kuvauksen tehneen tutkijan mukaan (vrt. Alzheimerin tauti, AD, Parkinsonin tauti, PD, Huntingtonin tauti, HD). Niiden käyttöä on kritisoitu, mutta yleiseen käyttöön ne ovat usein jääneet. Sekaannusta on aiheutunut mm. siitä, että yksin Charcot'n mukaan on nimetty yli 20 sairautta tai tilaa, joista useat ei-neurologisia(44). USA:ssa on ollut tapana nimetä sairaus kuuluisan urheilijan mukaan (Lou Gehrigin tauti), mutta tämä käytäntö on siirtymässä takalalle.

Käsitys dementian kytkeytymisestä ALS:iin ei ole uusi, mutta kesti yli sata vuotta, ennen kuin ymmärrettiin, kuinka kiinteä yhteys on. Anatomisen tapausselostuksen muodossa kognitiivisen tasonlaskun ja ALS:n yhdisti O. Dornbluth 1889. P. Marie oli 1892 pannut merkille ALS:ia sairastavan potilaan poikkeavan ”lapsenomaisen” käytöksen. 1930-luvulla julkaistiin muutamia useampia tapauksia kattaneita selostuksia.

Dementian esiintymisestä 3-6 %:lla ALS:ia sairastavilla raportoivat 1970-luvulla Y. Nagano ja kumppanit Japanista ja Matti Jokelainen Suomesta(45). Vuonna 1982 Juhani Wikström ja kumppanit julkaisivat tutkimuksen, jossa kuvattiin kliinisesti ja neuropatologisesti kolme naispuolista potilasta, joilla oli sekä kiistaton ALS että dementia, mutta joilla ei ollut

ruumiinavauksessa AD:n tai muunkaan tuolloin tunnetun dementian neuropatologisia löydöksiä. Kenenkään suvussa ei ollut tiedossa hermostoa rappeuttavia sairauksia(46). Yhtenä dementiayhteyden havaitsemista jarruttavana tekijänä voidaan pitää sitä, että ennen 1990-lukua neurologit kyllä diagnosoivat ALS:n, mutta eivät seuranneet potilaiden sairausuraa sen jälkeen. Kun ALS:n hoitoon keskittyneitä keskuksia alkoi syntyä, yhteyteen kiinnitettiin enemmän huomiota ja siitä tehtiin raportteja. Kun 1990-luvulla ALS:iin liittyvän dementian laatu tarkentui FTD-tyyppiseksi ja geneettiset tutkimusmenetelmät kehittyivät, tuli mahdolliseksi koostaa yhteydestä se kuva mikä tällä hetkellä on käytössä. ALS on itse asiassa usean hermoston järjestelmän kattava oireyhtymä, jonka monimuotoisuus ilmenee kliinisellä, geneettisellä ja neuropatologisella tasolla. Näin ollen ALS:n määrittelyn evoluution voidaan sanoa jatkuvan edelleen.

### 6.3 VIRALLINEN TAUTILUOKITUS ICD

Ensimmäinen kansainvälinen kuolinsyyluokitus ICD-0 hyväksyttiin 1895. ICD pyrki systematisoimaan kuolleisuustilastoja siten, että eri paikoissa ja ajassa syntyvät tilastot olisivat vertailukelpoisia. ALS:n kohdalla epäselvä nimikkeiden käyttö on vaikeuttanut kuolintodistusten kirjauksia ja niistä muodostettujen tilastojen hyödyntämistä. Esimerkiksi tautiluokitus ICD-8 [1968] listaa diagnoosikoodin 348,00 (ALS) ja ICD-9 [1987] diagnoosikoodin 3352A (ALS) spesifisti, mutta tällä hetkellä Suomessa käytössä oleva ICD-10 [1996] ilmoittaa diagnoosikoodin G12.2 (Motoneuronisairaus), johon ALS sisältyy.

Suomella on WHO:n jäsenmaana velvollisuus ottaa 25.5.2019 julkaistu ICD-11 käyttöön.

Suomi kuitenkin jatkaa toistaiseksi ICD-10:n käyttöä. ICD-11:n käyttöönotto vaatii edelleen perusteellista käännoystä.

ICD-11 sisältää 10 erilaista nimikettä koodin Motoneuronitauti alla, ja ALS on näistä ensimmäinen. ICD-11:ssä on mutaatioiden nimeämisen tasolle ulottuva kuvaus oikean koodin valitsemisen helpottamiseksi. ALS:n kohdalla mainitut mutaatiot ovat geneeissä *C9ORF72* ja *SOD1*.

Käytännössä tilanne on se, että niin kauan kuin ALS:lta puuttuu yleisesti hyväksytty luokitus, on ICD lähinnä lista erilaisia termejä(47). Yhteenvetona voidaan todeta, että ALS:n virallisessa luokituksessa on edelleen kehitettävää.

### 6.4 KLIININEN LUOKITUS

Ensimmäinen kansainvälinen konsensuskokous, jossa ALS:lle muotoiltiin kriteerit, pidettiin 1990 Filip II:n luostaripalatsissa El Escorialissa Espanjassa. Käyttöön El Escorial-kriteerit (ALS-EEc) tulivat 1994(48). Tiivistettynä ne sisältävät vaatimuksen, että 1) LMN-vaurio osoitetaan kliinisessä-, ENMG- tai neuropatologisessa tutkimuksessa, ja 2) UMN-vaurio osoitetaan kliinisessä tutkimuksessa, ja 3) vaurion merkit etenevät alueella tai toisille alueille. Samanaikaisesti ei saa olla 1) ENMG:ssä näyttöä muusta LMN/UMN-vauriosta mahdollisesti selittävistä prosesseista, eikä 2) Neuroradiologista näyttöä muusta kliiniset tai ENMG-löydökset mahdollisesti selittävistä prosesseista. Nämä kriteerit ovat säilyneet muuttumattomina ALS-EEc:stä on uudistettu kolme kertaa, viimeksi 2015. Alkuperäinen versio piti sisällään 4 luokkaa I) Varma (engl. definite), II) Todennäköinen (engl. probable), III) Mahdollinen (engl. possible) ja IV) Epäilty (engl. suspected). Ensimmäinen englanninkielinen versio sisälsi 8 sivua tulkintaohjeita. Tavoitteena oli yhdenmukaista klinisiin tutkimuksiin otettavien potilaiden valintakriteerejä. Sen monimutkaisuus teki mahdottomaksi soveltaa sitä käytännön potilastyöhön. Lisäksi osoittautui, että osa potilaista

saattoi kuolla ALS:iin täyttämättä koskaan luokkien I-II kriteereitä(49). Näitä luokkia on pidetty sisäänottokriteereinä useimmissa hoitotutkimuksissa, mikä on johtanut siihen, että taudin alkuvaiheessa olevia potilaita on jäänyt ulkopuolelle, ja sisään on valikoitunut nuoria miehiä, joilla on hidaskas tauti. On arvioitu, että 40–60 % potilaista ei ole täyttänyt ALS-EEc:n ensimmäisen version kriteereitä, jossa yhtenä ongelmana oli huono UMN-vaurion tunnistaminen. Se ei myöskään ottanut huomioon kognitiivisin oirein alkavaa ALS:ia. Luokat III-IV olivat myös hoitoon sitoutumisen kannalta ongelmallisia, koska potilaat kyseenalaistivat käsitteitä mahdollinen ja epäilty ALS.

Vuonna 2000 otettiin käyttöön El Escorial revised (ALS-EEc-R) uudistettu versio, jolla pyrittiin vastaamaan edellä esitettyihin ongelmiin(50). Tässä versiossa luokan IV Epäilty ALS poistettiin ja korvattiin luokalla IV ”clinically probable laboratory supported ALS.” Tiivistäen tämän luokan määrittävät UMN ja LMN-vauriot yhdellä alueella tai UMN-vaurion merkit yhdellä alueella ja EMG:ssä aktiivisen ja kroonisen denervaation merkit vähintään kahdella alueella. Tulkintaohjeita oli 4 sivua. Uudistuksen suurin anti oli vähäisempi väärin positiivisten diagnoosien määrä.

Neurofysiologit ovat pitäneet ALS-EEc-R:n uutta IV-luokkaa ongelmallisena, koska ENMG:ssä edellytetyt fibrillaatiot/terävät aallot eivät aina näy muutoin sairassa lihaksissa. ALS-EEc-R:n käyttöönoton jälkeen alatyypit PBP, PMA ja PLS säilyivät edelleen ongelmina. Seuraavassa konsensuskokouksessa, jossa otettiin käyttöön uudet ENMG-kriteerit, pidettiin Awaji-saarella Japanissa 2008(51). Tämän uudistuksen (ALS-EEc-awa) olennainen anti oli se, että ENMG-löydökset nostettiin saman arvoiseksi kliinisten löydösten kanssa, niiden edellytetään löytyvän samoilta alueilta, ja faskikulaatiopotentialit lisättiin näyttövaatimuksiin. ALS-EEc-awa:ssa myös luokka IV on poistettu, minkä on arvioitu heikentävän muutoin parantunutta herkkyyttä jopa 20 %. Käytännössä ALS-EEc-awa siirtää diagnostisen varmuuden näyttöä ENMG-tutkimuksen harteille. Sen suurin anti on bulbaari-alkuisen ALS:n tunnistamisen selvä parantuminen.

Koska kriteerit ovat päivitettyine versioineenkin osoittautuneet monimutkaisiksi paitsi kliinisen työn myös hoitotutkimuksiin rekrytoinnin kannalta, pidettiin Australian Queenslandissa 2019 konsensuskokous, joka ehdottaa uusimmiksi kriteereiksi Gold Coast-luokitusta(52). Kokoukseen osallistui myös potilasjärjestöt. Gold coast-kriteerit ovat aiempia luokituksia selvästi yksinkertaisemmat: 1) Etenevä motorinen vaurio varmistettuna anamnestisesti tai toistuvilla kliinisillä arvioilla ja sitä edeltänyt normaali motorinen toimintakyky ja 2) UMN- ja LMN vaurio osoitettuna vähintään yhdellä alueella (UMN ja LMN vaurio samalla alueella) tai LMN-vaurio vähintään kahdella alueella ja 3) Muiden imitoivien sairauksien luotettava poissulku. Gold coast tarkoittaa myös, että LMN-vaurio on osoitettava kliinisellä tutkimuksella ja/tai EMG-poikkeavuudella (krooninen neurogeeninen muutos ja käynnissä oleva denervatio mukaan lukien fibrillaatiopotentialit/positiiviset terävät aallot tai faskikulaatiopotentialit).

Vuonna 2021 on julkaistu useita tutkimuksia, joiden anti tiivistettynä on se, että Gold coast-kriteerien herkkyyks ja tarkkuus on hyvä. Kompastuskivenä voidaan nähdä Gold coastin luotettavuus UMN-vaurion ollessa hallitseva. Tämä on ollut ongelma myös aiemmissa luokituksissa. Myöskään PMA ei ole ongelmaton, mutta todennäköisyys sille, että PLS- tai PMA-potilaita tulataisiin rekrytoimaan hoitotutkimuksiin, on pieni. Käytännön kliinisessä työssä Gold coast on joka tapauksessa helpotus. On kuitenkin huomattava, että sekään ei tule vastaan tilanteessa, jossa olennaisina muuttujina ovat ei-motoriset tai geneettiset tekijät.

## 6.5 ALS:N TAUSTASYYYT

Suurimmassa osassa tapauksia ALS:n syytä ei tiedetä. Tilanne on varsin samanlainen muidenkin hermostoa rappeuttavien sairauksien kuten AD:n ja PD:n kohdalla. Elintapoihin ja ympäristöön liittyvien riskitekijöiden osalta näyttö ALS:ssa on niukempaa kuin AD:ssa ja osin PD:ssa.

Mekanismeja, joiden kautta ALS:iin johtavan patologisen prosessin on ajateltu syntyvän, ovat oksidatiivinen stressi, eli normaalia runsaampien soluille vahingollisten hapettimien ja vapaiden radikaalien aiheuttama räsitus, eksitoksisuus, mitokondrioiden virheellinen toiminta, glia- eli hermotukisolujen aktivaatio neuroinflammaatiossa, RNA-prosessointi ja proteiinien virheellinen laskostuminen sekä kasvutekijöiden häiriöt. Tämä lista ei ole täydellinen, eikä yksi mekanismi sulje pois muita.

Biologisten mekanismien osalta on arvioitu, että ALS olisi mallinnettavissa 6-portaiseksi tapahtumaketjuksi kuitenkin siten, että jos erilaisten mutaatioiden vaikutus otetaan huomioon, portaiden luku vähenisi mutaatiosta riippuen 2-4:ään portaaseen(53). Tällainen mallinnus ei ole ristiriidassa sellaisen näkemyksen kanssa, jossa ALS ajatellaan monitekijäiseksi sairaudeksi, jossa genomi ja ympäristötekijät yhdessä määräävät lopputuloksen. Suurina ja paljon energiaa kuluttavina soluina motoneuronit pitkin aksoneineen ovat todennäköisesti erityisen alttiita monille tekijöille.

### 6.5.1 Oksidatiivinen stressi

Oksidatiivisessa stressissä syntyvät vapaat radikaalit aiheuttavat proteiinien rakennemuutoksia ja hajoamista, immuunijärjestelmän aktivoitumista sekä DNA- että RNA-vaurioita(54). Teoria sen osuudesta ALS:ssa sai vauhtia *SOD1*-mutaatioiden löytymisen myötä 1990-luvulla. *SOD1* on tärkeä antioksidanttinen metalloentsyymi, joka katalysoi superoksidi-ionin vetyperoksidiksi ja hapeksi. Sittenmin on selvinnyt, ettei ainakaan *SOD1*:n alentunut toiminta yksin riitä selittämään mutatoituneen *SOD1*:n haitallisuutta ALS:n synnyssä(55).

### 6.5.2 Eksitoksisuus

Eksitoksisten mekanismien on ajateltu vaikuttavan lähinnä glutamaatin kautta(56). Glutamaatti on pääasiallinen kiihottava keskushermoston välittäjäaine, joka liiallisena esiintyessään on haitallinen motoneuroneille. Glutamaatti aktivoi hermo- ja gliasoluissa olevia AMPA-reseptoreita, mikä johtaa mm. mitokondrioiden toiminnan muutoksiin ja ATP-synteesin vähenemiseen. Normaalisti keskushermostossa glutamaatti poistetaan synapsiraosta 90 %:sesti EAAT2:n avulla. Epigeneettisten tapahtumien kuten DNA:n metylaation on todettu vaikuttavan EAAT2:n ilmenemiseen. ALS:ia sairastaneiden aivokuorella ja selkäytimessä on todettu EAAT2:n vähenemää. Toistaiseksi ainoan EU:ssa tällä hetkellä hyväksytyyn ALS-lääke rilutsolin ajatellaan vaikuttavan glutamaatin ilmenemiseen useamman eri mekanismin kautta, mutta niiden ei ole lopullisesti osoitettu olevan rilutsolin sinänsä vähäisen ALS:ia jarruttavan vaikutuksen takana. *C9*-iPS-hermosolut ovat herkistyneitä glutamaatille. *C9ORF72*:n toistojaksomonistuman (*C9<sup>HRE</sup>*) haitallinen vaikutus saattaa välittyä ADARB2-proteiinin kautta, joka on AMPA-tyypin glutamaattireseptoria editoiva entsyymi(57).

### 6.5.3 Mitokondriovauriot

Mitokondriot ovat soluelimiä, joiden yksi keskeinen tehtävä on energian muuntaminen käyttökelpoiseen muotoon eli ATP:ksi. Mutatoituneen SOD1:n on osoitettu kertyvän mitokondrioiden sisäkalvoon ja lisäävän happiradikaalien muodostusta(58). Muutokset mitokondrioissa häiritsevät niiden morfologiaa, elektronien kuljetusta ja kalsiumtasapainon ylläpitoa, jotka kaikki vaikuttavat solun energiantuotantoon. Mitokondrioilla on osuutta myös apoptoosin mekanismeissa(59). Puhdas motoneuronien vaurio ei ole tyypillinen ilmentymä mitokondriotaudeissa. Kuitenkin mutaation osoittaminen *CHCHD10*:ssä pienellä osalla ALS-potilailla nostaa esiin mahdollisen yhteyden mitokondrioiden patologiaan, koska *CHCHD10* on mitokondriaalinen proteiini(60). Suomalainen valtamutaatio G66V *CHCHD10*:ssä aiheuttaa hitaasti etenevän motoneuronitaudin SMAJ(61).

### 6.5.4 Aksonaalisen kuljetuksen ongelmat

Aksonin eli solun viejähaarakkeen tehtävä on kuljettaa proteiineja, vesikkeleitä eli nanokokoisia kalvorakkoita ja muita rakenteita eteenpäin. Solun tukirakenteen elementit eli neurofilamentit (NF) ovat välttämättömiä sekä anterogradiselle että retrogradiselle kuljetukselle aksonissa. ALS:lle tunnusomaista on neurofilamenttien (NF) kumulointuminen itse soluun ja proksimaalisiin aksoneihin, ja niitä pidetään lupaavina biomarkkereina ALS:sta johtuvaa vauriota ja korjaavien hoitojen tehoa arvioitaessa(62). Aksoneissa ja dendriiteissä tapahtuvan kuljetuksen yksi tärkeä ryhmä ovat KIF-proteiinit, joita koodaa *KIF5A*-geeni. Sen varianttien on osoitettu kytkeytyvän useisiin sairauksiin kuten HSP:aan, CMT2:een ja ALS:iin(63).

### 6.5.5 Kasvutekijät

Lukuisten kasvutekijöiden ja niiden puutosten on arveltu saattavan vaikuttaa ALS:n taustalla. Näitä ovat mm. CNTF, BDNF, GDNF, IGF-1 ja VEGF. Eläinmalleilla on saatu neuroprotektioon viittaavia tuloksia, joita ei kuitenkaan ole voitu menestyksellisesti toistaa ihmisillä(64,65). Epäonnistumisten syytä voivat olla annosteluun liittyvät syyt – useat yhdisteet vaativat intratekaalisen eli aivo-selkäydinnestetilaan tapahtuvan annostelun, koska veriaivoesteen ylittävän yhdisteen hyötyosuus saattaa jäädä olemattomaksi. Lisäksi ihmisellä saattaa toimivan ja turvallisen kasvutekijän annosraja olla erilainen kuin koe-eläimillä. Ajankohdan valinta voi myös vaikuttaa, koska hoitokokeet ihmisellä alkavat käytännössä vasta kun huomattava osa hermosoluista on jo menetetty ja tauti on todennäköisesti jo liian pitkälle edennyt.

Myös hormonien osuutta on tutkittu. On mm. esitetty, että syntymää edeltävä korkeampi testosteronivaikutus altistaisi ALS:lle, ja että tämä olisi mitattavissa helposti etusormen ja nimettömän pituuksien pienempänä suhteena ALS:ia sairastavilla. Tuloksia ei kuitenkaan ole pystytty luotettavasti toistamaan(66).

### 6.5.6 RNA-aineenvaihdunnan häiriöt

RNA:ta sitovat proteiinit (RBP) ilmenevät normaalisti tumassa, ja osa niistä osallistuu RNA:n kuljetukseen tuman ja solun muiden osien välissä. Stressitilanteessa niitä kasaantuu ns. stressijyväsiin, joissa tapahtuvia häiriöitä on epäilty ALS-FTLD-tautikirjon yhdeksi syyksi(67). Mutaatioiden seurauksena syntyneet ja sakkautuvat RBP:t nähdään usein sytoplasmassa.

Ubikinoidut solunsisäiset keräymät, jotka sisältävät 43 kDa:n proteiinia (TDP-43), jota koodaa *TARDBP*-geeni, ovat ei-*SOD1*-peräisen ALS:n ja FTLD:n neuropatologinen tunnusmerkki riippumatta taustalla olevasta syystä(68). Siten ne eivät liity ainoastaan *TARDBP*:n mutaatioihin, joita on kuvattu vain 2–5 %:ssa FALS:ia sairastavien syyperusteisista geenivirheistä. *TARDBP* sitoutuu sekä mRNA:han että DNA:han ja huolehtii suuresta joukosta silmukointiin eli intronien poistoon, translaatioon ja transkriptioon liittyvistä prosesseista(69). Muita RNA:n prosessointiin liittyviä proteiineja ovat *FUS*, *MAPT* ja myös *GRN*, joista kaksi jälkimmäistä liittyvät erityisesti FTLD:hen(70,71). RNA:n ja transkriptio-translaatiotapahtuman häiriöt ovat todennäköisimmin osallisina neuronien solutuhossa riippumatta siitä mikä on tapahtumaketjun alkuun paneva tekijä.

### 6.5.7 Autoimmunteetti ja neuroinflammaatio

Autoimmunteetin ja neuroinflammaation osuutta ALS:n patogeneesissä on perinteisesti arvioitu vähäisiksi. Näihin liittyviä muutoksia nähdään etupäässä gliasoluissa. Keskushermoston immuunipuolustuksesta vastaavat solut ilmaantuvat mikrogliaan jo varhaisessa sikiönkehitysvaiheessa, eivätkä päivitty samaan tapaan kuin perifeeristen kudosten luuytimen säätelyssä olevat solut. ALS:ia sairastavilla on raportoitu tulehdusmuutoksia useissa kudoksissa, ja poistogeenisillä *C9ORF72*-hiirillä on kuvattu monimuotoisia immunologisia poikkeavuuksia mutta mitään yhteistä teoriaa, joka kytkisi nämä motoneuronituhon ei ole. Rotillakaan pelkkä *C9ORF72*- puutos ei aiheuta oireita, mutta poistogeenisillä rotilla altistus mm. kinaasille aiheuttaa motoneuronivaurioita(72). *C9ORF72*-geenin on todettu ilmenevän hermokudoksen ja mikrogliaan tulehdustiloissa, mutta yksiselitteistä mallia, joka selittäisi ihmisen *C9*-sairaudet ei toistaiseksi ole(73).

Siirtogeenisiä hiirimalleja käyttäen on eniten hoitotutkimuksia tehty *SOD1*:llä, vuonna 2016 eri hiirikantoja oli yli kymmenen. Näistä eniten on tutkittu *SOD1* *SOD1*<sup>G93A</sup> -hiiriä. Tutkimusten tulokset eivät ole siirtyneet ALS:ia sairastavien hoitoon. Esimerkiksi *COX2*-inhibiittori, tulehduskipulääke selekoksibi, joka hidasti motoneuronivaurion etenemistä *SOD1*-hiirillä(74), oli 2000-luvun alussa käytössä ALS:n hoitoon useissa maissa mukaan lukien Suomessa. Huolellinen RCT osoitti sittemmin, ettei selekoksibista ollut ALS-potilaille mitään hyötyä(75).

Useimmat ALS:iin kytketyt geenivirheet eivät suoraan kohdennu immuunipuolustukseen. Niiden tuottamat poikkeavien proteiinien ja RNA:n keräymät voivat epäilemättä toimia tulehdusprosessien laukaisijoina. Virus-, bakteeri- tai muu elimistön ulkopuolinen tekijä ei näytä todennäköiseltä ALS:n aiheuttajalta ainakaan epidemiologisten tutkimusten valossa. Suoliston mikrobikirjon muutosten on havaittu olevan PD-potilailla erilaisia kuin verrokeilla(76), mutta mikrobiomin yhteys ALS:iin on toistaiseksi epäselvä(77).

### 6.5.8 Apoptoosi

Apoptoosi tarkoittaa geenien määräämää ohjelmoitunutta solukuolemaa, jota tarvitaan yksilönkehityksen ja kudosten uusiutumisen eri vaiheissa ja immuunivasteen säätelyssä. Apoptoosilla tarkoitetaan lopputulemaa eikä mekanismeja, mutta sitä kuitenkin käsitellään lyhyesti tässä. Apoptoosin eri vaiheissa vaikuttavat sadat erilaiset proteiinit. Ratkaisevassa roolissa ovat proteaasientsyymit ja niistä erityisesti kaspasit. ALS:n osalta toistaiseksi läheisin hoidollinen kytkentä apoptoosiin rakennettiin sytokromi c:n kautta. Siirtogeenisille *SOD1*<sup>G93A</sup> hiirille intratekaalisesti annosteltu mininosykliini, joka vähentää apoptoosin käynnistymiseen liittyvää sytokromi c:n vapautumista mitokondrioista, näytti hidastavan motoneuronitaudin puhkeamista ja pidentävän taudin kestoa. Tämä puolestaan johti 2000-



luvulla laajoihin minosykliinihoitoihin ALS-potilailla, mutta faasi III RCT osoitti, että suun kautta annosteltua minosykliiniä saaneilla potilailla tauti eteni nopeammin kuin lumelääkettä saaneilla(78).

#### 6.5.9 Elintavat ja liikunta

Elintavoista johtuva yksittäinen syy on erittäin epätodennäköinen ALS:n aiheuttaja. Paljon todennäköisempää on geenien ja ympäristön yhteisvaikutus.

Elintapatutkimuksessa eniten huomiota ovat saaneet toistuneet vammat, fyysinen aktiiviteetti, tupakointi ja BMI. Kontaktiurheilulajeihin liittyvä krooninen traumaattinen aivosairaus on yleisesti hyväksytty omaksi sairauskokonaisuudekseen. ALS:n kohdalla kimmoketta on saatettu saada baseball-pelaaja Lou Gehrigistä. Laajimpia ovat tutkimukset italialaisista ammattilaisjalkapalloilijoista. Aiheesta on tehty 12 tutkimusta, jotka ovat toistuvasti viitanneet lisääntyneeseen riskiin tässä osapopulaatiossa. Tutkimus vuodelta 2020 seurasi yli 23 000:n vuosina 1959–2000 aktiivisesti pelanneen miespuolisen henkilön sairaushistoriaa 15 vuoden iästä alkaen. Kohonnein riski oli alle 45-vuotiailla pelaajilla, joilla SIR (vakioitu ilmaantuvuusuhde, engl. standardized incidence ratio) oli 4,66 (95 % CI 2,66-7,57). Suurimmassa riskissä olivat keskikenttäpelaajat, joiden loukkaantumisriski on suurin. Sairastumisiän todettiin olevan 20,2 vuotta alhaisempi kuin väestössä yleensä, ja tulos oli tilastollisesti merkitsevä. Toinen samantyyppinen tutkimus käsitti 20 000 amerikkalaisen jalkapallon pelaajaa vuosilta 1960–2019. Tässä tutkimuksessa sekä sairastuvuuden että kuolleisuuden ilmaantuvuusuhdet olivat lähes nelinkertaiset (3,59; 95 % CI 2,58-4,93 ja 3,94; CI 2,62-5,69) verrokiväestöön nähden. Tämänkin katsottiin viittaavan toistuvan vamman osuuteen sairauden synnyssä, koska kohonnutta ALS-riskiä ei ole systemaattisesti raportoitu toisissa yhtä rasittavissa urheilulajeissa. Kaikissa tutkimuksissa yhteyttä ALS:n ja korkean fyysisen aktiiviteetin välillä ei ole voitu osoittaa(79,80). Mahdollisia geneettisiä tai muitakaan tekijöitä, jotka lisäävät todennäköisyyttä päätyä tiettyjen liikuntalajien pariin ei ole yksinkertaista sulkea pois.

Tupakoinnin on todettu vähentävän riskiä sairastua Parkinsonin tautiin(81). Sen ALS-riskiä lisäävä vaikutus on todettu muutamassa suuressa tutkimuksessa(82), mutta kaikissa yhteyttä ei ole havaittu(83). Sekoittavien tekijöiden määrä on suuri, ja tupakoinnin on arvioitu kytkettyvän eri tavalla potilaan aiempiin vaiheisiin riippuen siitä onko hän geenivirhe  $C9^{HRE}$ :n kantaja vai ei(84).

Tavallisilla epidemiologisilla menetelmillä ei aina kyetä erottelemaan mitkä korrelaatiot ovat kausaalisia ja mitkä eivät. ALS:n riskin ja ympäristöaltisteiden syy-suhteita on lähestytty myös mendelistisen satunnaistamisen (engl. Mendelian randomisation, MR) keinoin yli 20 tutkimuksessa(85). MR muistuttaa satunnaistettua tutkimusasetelmaa, ja sillä voidaan poistaa osa sekoittavista tekijöistä ja harhan lähteistä(86). Siinä hyödynnetään sitä seikkaa, että alleelit ovat muuttumattomia, eli tutkittavat riskitekijät eivät voi vaikuttaa niihin käänteisesti. Menetelmällä pystytään luomaan asetelma, jossa toisistaan riippumattomia geenivariantteja verrataan altisteen vasteeseen eli sairauteen. Aineistona voidaan käyttää GWAS-tutkimuksista saatua dataa. MR pohjautuu oletukseen alleelin satunnaisesta jakautumisesta, mikä ei päde, jos geenit ovat lähellä toisiaan (87). MR:iön valitun alleelin tulee täyttää kolme sääntöä: 1) alleelin tulee liittyä tunnetulla tavalla lopputulemaan, 2) häiriötekijät eivät saa vaikuttaa samanaikaisesti alleeliin ja lopputulemaan, 3) alleeli ei saa vaikuttaa lopputulemaan muiden riskitekijöiden kuin tarkastellun riskitekijän kautta (88).

MR-menetelmällä on tehty tutkimus, joka viittasi siihen, että erityisesti geenivirhe  $C9^{HRE}$ :tä kantavilla ALS-potilailla oli tilastollisesti suurempi kausaaliseksi tulkittu yhteys fyysiseen aktiiviteettiin kuin ei-kantajilla(89).

## 6.5.10 Ympäristötekijät

Edellä esiteltyjen mekanismien lisäksi useiden ympäristöaltisteiden on esitetty kytkeytyvän kohonneeseen ALS:n riskiin. Näitä ovat mm. raskasmetallit, tuholaismyrkyt, tietyt ammatit, lääkkeet, syanotoksiinit ja sähkömagneettiset kentät. Tässä yhteenvedossa ei näitä erikseen käsitellä. Kansanterveystutkimuksissa sovelletun Hillin kriteeristön mukaan vuonna 2022 tehdyssä systemaattisessa katsauksessa seuraavat altisteet assosioituivat ALS:iin: BMAA, formaldehydi, mangaani, elohopea ja sinkki(90).

Yksittäisten ympäristötekijöiden löytämisen vaikeutta kuvaa se, että Guamin saaren ja laajemmin Läntisen Tyynen meren ryvästymien mitä ilmeisimmän ympäristöperäisen tekijän olemusta ei ole yli 70 vuoden tutkimustyöstä huolimatta pystytty vakuuttavasti karakterisoimaan. Yhtenä syynä saattavat olla tuntemattomat epigeneettiset tekijät. Eniten näyttöä on saatu alueella aiemmin käytetyn ruoan ja paikallishoitojen sisältämän cycasiinin ja BMAA:n yhteydestä ALS:iin. Täsmällistä ALS:iin johtavaa biokemiallista tapahtumaketjua ei kuitenkaan ole kuvattu, mutta sen on epäilty käynnistyvän jo sikiöasteella(91). Soluviljelmissä BMAA:n on havaittu vaikuttavan ubikitini-proteasomi-systeemiin ja kaitsijaproteiinivälitteiseen autofagiaan, minkä lisäksi L-seriiniin on esitetty mahdollisesti voivan toimia BMAA:n vastavaikuttajana(92).

## 6.6 EPIDEMIOLOGIA

### 6.6.1 Ilmaantuvuus ja esiintymä

Euroopan unionin (EU) määritelmän mukaan sairaus, jonka esiintyvyys väestössä on enintään 1/2000 on harvinainen. ALS kuuluu siten harvinaissairauksiin, joita on määritelmästä riippuen noin 5000–8000 erilaista. ALS:n kohdalla ilmaantuvuuden (insidenssi) ja sairastuvuuden eli esiintymän (prevalenssi) välinen käsitteellinen ero on syytä tunnistaa. Koska ALS on verraten nopeasti kuolemaan johtava sairaus, ei esiintymä koskaan nouse mainittavan suureksi. Sen sijaan 4 uutta tapausta viikossa (Suomi) tai 16 tapausta/24 tuntia (USA) avaa etenkin maallikolle lukuja eri tavalla. Suomea koskeva arvio perustuu alustavaan julkaisemattomaan kuolintodistusohjaiseen dataan.

ALS:n varhainen epidemiologia keskittyi kuvailemaan taudin esiintymää eri väestöissä, ja analyttinen epidemiologia tuli käyttöön myöhemmin. Nopeasti tappavan ALS:n aiheuttaman kuolleisuuden (mortaliteetti) on arvioitu kohtuullisen hyvin kuvastavan ilmaantuvuutta(93). Helpoin tapa tutkia asiaa on arvioida tunnuslukuja kuolintodistustietojen perusteella, joita on eri maissa ollut saatavilla vuodesta 1949(5). Tämä metodi sisältää kuitenkin merkittäviä virhelähteitä, joista tärkeimpiä ovat populaation ikärakenteessa tapahtuvat muutokset, etnografiset erot, kilpailevien kuolinsyiden vähentyminen, parantuva diagnostiikka ja muuttuvat käytännöt siinä, miten ALS kirjataan kuolintodistuksiin. Lisäksi ALS:n määritelmä vaihtelee eri tutkimusten välillä, eikä täyttä konsensusta diagnostisista kriteereistä ei ole saavutettu edes 2020-luvulle tultaessa.

Tarkkaan diagnostiikkaan kykenevissä hoito- ja tutkimusyksiköissä muodostetut kohortit tuottavat otantaan esiinkavuharhan. Eri tavoin kehittyneissä yhteiskunnissa perustiedot väestön ikä- sukupuoli- ja rodullisesta rakenteesta saattavat vaihdella.

Vielä 1950-luvulla esitettiin arvioita, joiden mukaan ALS:n esiintymä olisi ajan ja paikan suhteen siinä määrin vakio, että sitä voitaisiin käyttää standardina muiden neurologisten sairauksien suhteen(94). Ensimmäiset havainnot, jotka osoittivat, että näin ei ole, saatiin kolmelta alueelta Läntiseltä Tyyneltämereltä.

Guamin ja Rotan saarilla kuvattiin 1950-luvulla Chamorro-väestön keskuudessa ALS:n ilmaantuvuus, joka oli 100-130 (/100 000), eli korkein koskaan ja missään kuvattu(95).

Ensimmäiset kuvaukset taudista ovat 1600-luvulta, ja ne on ajoitettu espanjalaisten tuloon Mariaanien saarille. Potilaiden taudinkuvassa oli piirteitä myös Parkinsonin taudista ja dementiaasta. Kokonaisuuden nimenä on käytetty ilmaisua ALS-PDC (engl. ALS-Parkinson-dementia complex of Guam)(96). Kompleksia on esiintynyt myös muissa etnisissä väestöissä kuten Irian Jayan provinssissa Länsi-Uudessa-Guineassa ja Kiin niemimaalla Japanissa(97). Esiintymien huippu oli toisen maailmansodan jälkeen, ja se on sittemmin pienentynyt tasolle 3 (/100 000). Sekä Guamilla että Kiin niemimaalla on todettu myös toisenlainen yhdistelmä, Parkinson-dementia -kompleksi (PDC), jonka esiintymä on myöskin pienentynyt, mutta ei niin voimakkaasti kuin ALS-PDC:n. Uudessa Guineassa sekä ALS:n että PDC:n esiintymät ovat edelleen muuhun maailmaan verrattuina korkeat, joskin sielläkin pienentymässä(98). Mahdollisina syinä näin nopeisiin muutoksiin on pidetty aiempaa, sittemmin vähentynyttä altistumista toksineille hyvin nuorella iällä, ja etenkin Guamilla Toisen maailmansodan jälkeisiä muutoksia ravintotottumuksissa. Mitään yksiselitteistä ympäristöperäistä sen paremmin kuin geneettistäkään tekijää ei Guamilla kuitenkaan ole toistaiseksi osoitettu. Eniten kannatusta on saanut teoria ns. Väärän sagopalmun (*Cycas micronesica*) käytöstä ravintona. Kasvin siemenet sisältävät useita geno- ja neurotoksiineja. Kasvi ja sitä syövät hedelmälepakat (*Pteropus mariannus*), joita ravitsemustilanteesta riippuen on myös käytetty ruokana Mariaaneilla, ovat molemmat vaarassa hävitä kokonaan(99). Mariaaneilta ei ole kuvattu ALS:n osalta *C9ORF72* -toistojaksomutaatiota, dementian osalta *MAPT*-mutaatioita tai Parkinsonin taudin osalta *LRKK2*-mutaatiota(100).

## 6.6.2 Katsaukset

ALS: n globaalista ja alueellisista esiintymistä on julkaistu 1992–2019 kuusi laajaa katsausta, joista osa on systemaattisia meta-analyysyjä. Tässä yhteenvedossa näitä käsitellään vain niiden tulosten osalta, jotka viittaavat merkittävään vaihteluun alueellisesti ja ajallisesti.

Vuonna 1992 Chancellor ja kumppanit(101) totesivat vuosina 1950-1991 julkaistujen kuolleisuus- ja sairastuvuustutkimusten perusteella ALS:n esiintyvän miehillä 1,2-2 kertaa yleisemmin kuin naisilla. Poikkeuksena oli Suomi. ALS:stä johtuvan kuolleisuuden todettiin olevan nousussa, ja alueellisia eroja oli, kuten alhainen esiintyvyys Meksikossa. Esimerkkinä kuolintodistukseen perustuvan epidemiologisen estimaatin asettamisen vaikeudesta kirjoittajat kuvaavat tutkimuksen, jossa kolmanneksella kuolleista miehistä todelliseksi kuolinsyiksi osoittautui jokin muu kuin kuolintodistukseen ensisijaisena kirjattu motoneuronitauti.

Vuonna 2007 Cronin ja kumppanit(102) kävivät läpi tunnuslukuja käsittelevät tutkimukset vuosilta 1966-2006, ja lopulliseen arvioon seuloutui 61 erillistä tutkimusta. Katsaukseen hyväksyttiin sekä väestöpohjaisia että klinikkälähtöisiä tutkimuksia.

Tutkijat totesivat kaukasialaisissa väestöissä korkeammat vallitsevuus- ja kuolleisuusluvut kuin afroamerikkalaisessa, espanjalais- tai aasialaistaustaisessa väestössä. Osassa tutkimusten välisiä vertailuja voitiin käyttää ikä- ja sukupuolivakiointia siten, että vertailukohteena olivat USA:n väestön vastaavat luvut vuodelta 2000. Kirjoittajat kuitenkin totesivat, että mielekäs vakiointi ei aina ollut mahdollista. Korkeimmat karkeat ilmaantuvuusluvut kirjattiin Keski-Suomesta 2,4/100 000(103), ja alhaisimmat Italiasta 0,6/100 000. Eurooppalaisperäisissä väestöissä todettiin myös korkeammat esiintymäluvut kuin muualla muutamin poikkeuksin. Suomalaisten ALS-kuolleisuus 0,7/100 000 ei tässä analyysissä noussut muuta maailmaa korkeammaksi, kun aineistona oli koko maata koskevat kuolleisuusluvut(104). Aasialaisessa väestössä luvut olivat eurooppalaisia alemmat lukuun ottamatta japanilaisia, joiden ALS-kuolleisuus oli samaa luokkaa kuin eurooppalaistaustaisen väestön. Tutkimuksessa esitettiin kritiikkiä sen suhteen, miten määritellään espanjalaistaustainen (Hispanic) väestö tutkimuksissa, jotka koskivat Väli- ja Etelä-Amerikkaa. Afrikasta mukana oli vain kolme tutkimusta.

Vuonna 2013 Chiò ja kumppanit(105) tekivät vuosina 1995-2011 julkaistuista väestöpohjaisista tutkimuksista katsauksen, johon valikoitui yli 1700 artikkelista 17 prospektiivista ja 20 retrospektiivista alkuperäistutkimusta. Kun kaikki tutkimukset yhdistettiin käyttäen standardina YK:n talous- ja sosiaaliministeriön väestöarvioita vuodelta 2010, ilmaantuvuuden mediaani (/100 000) oli 1,90 ja vallitsevuuden 4,48.

Euroopassa ilmaantuvuuden mediaani oli 2,08 ja esiintyvyyden 5,40. Vaihteluväli Euroopassa karkean sairastuvuuden osalta oli 0,5 (Jugoslavia-Serbia) - 3,6 (Färsaaret) ja vastaava karkean vallitsevuuden vaihteluväli 1,1 - 8,2. Pohjois-Amerikassa ilmaantuvuuden mediaani oli 1,80, ja Aasiassa selvästi alempi 0,60. Japanissa ilmaantuvuus oli kuitenkin lähes eurooppalaista luokkaa 1,97 ja vallitsevuus korkein 11,3. Viimeksi mainittua saattaa selittää japanilaiseen käytäntöön kuuluva runsas pysyvän mekaanisen hengitystuen käyttö(106). Euroopan osalta vuosittain sairastuvia olisi katsauksen tulosten perusteella arvioituna noin 15 500 ja sairastavia noin 40 000. Euroopassa esiintymisluvut olivat korkeimmat Färsaarilla, ja syyksi kirjoittajat esittivät geneettistä vaikutusta, joka olisi välittynyt viikinkien kautta Skandinaaviasta. Suomalaisia tutkimuksia ei katsaukseen sisällynyt.

Globaalisti ajan funktiona tarkasteltuna tämän katsauksen tulokset viittasivat ALS:n ilmaantuvuuden ja vallitsevuuden lievään yleistymiseen välillä 1989–2009, ensisijaisesti arvioituna eliniän nousemisen myötä. Kuitenkin 60 %:ssa arvioituja tutkimuksia ilmaantuvuuden raportoitiin pysyneen vakiona tarkastelujakson ajan.

Toisaalta ositettua otantaa käyttäen ALS:n on todettu vakiointien jälkeen yleistyneen kaikissa ikäryhmissä (Ruotsi)(11).

Laajemmin maantieteellisesti käsitettynä Chiò'n 2013 katsauksessa todettiin lievä yleistyvä suuntaus leveysasteen kasvamisen myötä(105,107). Rajatummin, eli käytännössä Euroopan osalta esiintymien katsottiin heijastavan sitä tietoa, jota tuolloin oli käytettävissä ALS:n geneettisestä epidemiologiasta, ja joka viittasi taudin olevan muuta Eurooppaa hieman yleisempää Sardiniaassa(108) ja Suomessa(109).

Vuonna 2017 Marin ja kumppanit(110) julkaisivat ALS:n ilmaantuvuutta käsittelevän systemaattisen katsauksen ja meta-analyysin, jossa käytiin läpi 3216 vuoteen 2015 mennessä julkaistua tutkimusta, joista lopulliseen analyysiin valikoitui 44 väestöpohjaista tutkimusta. Selittäväksi muuttujaksi valittiin alueellisuus, joka määriteltiin osamanner (engl. sub-continent) -tasolla, jonka puolestaan määrittelee YK:n Tilastoyksikön julkaisu ”Standard Country or Area Codes for Statistical Use”: <https://unstats.un.org/unsd/methodology/m49/>. Esimerkkeinä osamantereista ovat Etelä-Eurooppa, Itä- Länsi- ja Etelä-Aasia. Tutkimus käsitti 45 aluetta 11 osamantereella. Suomi oli tässä mukana(6).

Karkeaksi yleiseksi ilmaantuvuudeksi (/100 000) saatiin 1,75 (1,55–1,96). Tämän perusteella arvioituna uusien ALS-tapausten vuosittaiseksi määräksi arvioitiin Euroopassa 9900, Pohjois-Amerikassa 5500 ja Itä-Aasiassa 12 300. Yhdistetty vuoden 2010 USA:n väestöön vakioitu yleinen ilmaantuvuus oli 1,68. Miesten ilmaantuvuus todettiin korkeammaksi kuin naisten: 1,41:1.

Vakioitu ilmaantuvuus oli Pohjois-Euroopassa 1,89, Länsi-Euroopassa 1,71, Etelä-Euroopassa 1,75 ja Pohjois-Amerikassa 1,79. Tilastollisesti merkitsevät erot näiden suhteen saatiin vertailussa Itä-Aasian (0,83) ja Etelä-Aasian (0,73) lukuihin, joissa toisaalta esiintyi enemmän heterogeenisyyttä kuin eurooppalaistaustaisissa väestöissä. Afrikan osalta ei tarkempia arvioita voitu asettaa.

Kysymys sekoittuneista väestöistä nousi esille tässäkin katsauksessa. Siinä todettiin, että rodun/etnisen taustan pohjalta arvioituna valkoisen väestön ilmaantuvuus on useimmissa tutkimuksissa todettu suuremmaksi kuin ei-valkoisen, espanjalaistaustaisten tai aasialaistaustaisten. Saman suuntaisia etnisiä eroja on todettu mm. Huntingtonin taudin esiintymisissä(111). Suomen puolestaan suhteellisen matalan Huntingtonin taudin esiintymän on raportoitu johtuvan haplotyyppieroista(112).

ALS:n osalta kansainvälisissä vertailuissa on useita virhelähteitä, kuten terveystalvelujen parempi saatavuus valkoisen väestön kohdalla ja itsemaksavien potilaiden suurempi osuus aasialaisissa yhteisöissä. Katsauksen kirjoittajat toteavat, että jako osamantereisiin saattaa sisältää virhelähteitä, koska maantieteellinen jako ei aina noudata väestötieteellistä jakoa. ALS:n yleisyyden arvioiminen väestössä, joka koostuu iäkkäistä ihmisistä, jotka todennäköisemmin sairastuvat, tuottaa vääriä tuloksia, ellei iän lisäksi rotua/etnistä taustaa oteta huomioon, koska elinajanodotteiden on osoitettu vaihtelevan erilaisen rodun/etnisen taustan omaavien välillä. Tutkimukset, jotka toteutetaan tarpeeksi laajoina ns. sekoituneissa populaatioissa, saattavat vastata näihin haasteisiin.

Katsauksessa todettiin ilmaantuvuuden nousua karkeilla tunnusluvuilla mitattuna, mutta vakioinnin jälkeen tätä ei havaittu. Ilmiön katsottiin pääosin selittyvän viimeisten 50 vuoden aikana tapahtuneella ikärakenteen muutoksella, erityisesti Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa. 1990-luvulla tehtiin tutkimuksia, joissa ALS:n esiintymien muutoksia tarkasteltiin Gompertzin analyysin avulla. Tulosten katsottiin selittyvän osin sillä, että terveydenhuollon kehittyessä kilpailevat kuolinsyyt vähenevät. Pidettiin myös mahdollisena, että ALS:iin sairastuvassa osapopulaatioissa vaikuttaisi jokin taudille altistava tekijä, joka voisi olla ympäristöperäinen tai geneettinen(113).

Toisessa, väestöpohjaisessa katsauksessaan(114) vuonna 2017 Marin ja kumppanit osoittivat, että ALS:ia kuvaavat merkit vaihtelevat osamannerkeskeisessä analyysissä siten, että osa muuttujista (sukupuolijako, keskimääräinen alkamisikä ja ikä diagnoosin tekohtekellä) ilmeni homogeenisimmin eurooppalaisperäisessä väestössä. FALS:n ja bulbaarialkuisen taudinkuvan osuus oli suurin Pohjois-Euroopassa. Taudin keston mediaani Pohjois-Euroopassa oli 25 kk (23–34 kk), kun se Etelä- ja Länsi-Euroopassa oli 30 kk (25–49 kk), Pohjois-Amerikassa 32 kk ja Aasiassa 28–48 kk. Taudin kestoon vaikuttavien hoitokäytäntöjen kuten syöttöletkun (PEG), mekaanisen ventilaatiotuen ja henkitorviavanteen osuudet vaihtelevat eri alueilla. Tässä katsauksessa alle neljännes tutkimuksista kirjasi samanaikaiset muut sairaudet. Käyttösoirein ilmenevän frontotemporaalisen demencian (bvFTD) osuus vaihteli noin 5%:n yleisestä esiintyvyydestä 13%:n esiintyvyyteen Irlannissa, jossa 34%:lla ei-dementoituneilla ALS-potilailla todettiin kognitiivista tasonlaskua(115).

Vuonna 2020 Xu ja kumppanit kokosivat katsauksen (Taulukko 1A. ja 1B.), jossa 110 tutkimusta käsitteli ilmaantuvuutta (41/110 vakioitujaa) ja 58 vallitsevuutta(116). Tutkimukset olivat väestöpohjaisia, ja koskivat karkean ilmaantuvuuden osalta vuosia 1957-2014 ja vakioitun osalta vuosia 1970-2014. Maailmanlaajuisesti vallitsevuudeksi tässä meta-analyysissä saatiin 4,42 (CI 3,92-4,96) ja ilmaantuvuudeksi 1,59 (CI 1,39-1,81).

Alaryhmä	Esiintymä /100 000	95% CI	I <sup>2</sup> %	p-arvo
Sukupuoli				
Miehet	5,96	5,14 - 6,85	0,0	0,495
Naiset	3,90	3,30 - 4,56	4,9	0,392
Puolimanner				
Pohjois-Afrikka	3,47	3,10 - 3,84		
Pohjois-Amerikka	4,27	3,67 - 4,92	0,0	0,979
Etelä-Amerikka	3,06	0,92 - 6,46	0,0	0,483
Itä-Aasia	3,67	1,27 - 7,31	73,3	<0,001
Etelä-Aasia	1,57	0,17 - 4,39		
Länsi-Aasia	8,03	2,48 - 16,74	0,0	0,979
Australia ja Uusi-Seelanti	6,40	5,50 - 7,20		
Pohjois-Eurooppa	4,80	3,36 - 6,49	0,0	1,000
Suomi*	3,71 (2,44 - 8,35)			
Keski-Suomi**	6,40			
Etelä-Eurooppa	5,52	4,61 - 6,50	0,0	0,691
Länsi-Eurooppa	9,62	4,80 - 16,10	0,0	0,652
Taloudellinen taso				
Kehittyneet maat	4,94	4,46 - 5,45	0,0	0,875
Kehittyvät maat	2,15	1,34 - 3,16	0,0	0,425

#### Taulukko 1.A.

ALS:sta johtuva vallitsevuus eli esiintymä maailmanlaajuisesti. 124 tutkimuksen meta-analyysi, muokattu artikkelista Xu, Liu, Liu et al. *Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J. Neurol. 2020(116).*

Suomi\* = Jokelainen M. *Amyotrophic Lateral Sclerosis in Finland I: An Epidemiologic study. Acta Neurol. Scand. 1977(104).*

Suomi\*\* = Murros K, Fogelholm R. *Amyotrophic Lateral Sclerosis in Middle-Finland: an epidemiological study. Acta Neurol. Scand. 1983(117).*

Suomi\*\*\* = Maasilta P, Jokelainen M, Löytönen M et al. *Mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Finland, 1986-1995. Acta Neurol. Scand. 2001(118).*

Suomi \*\*\*\* luvut eivät ole suoraan vertailukelpoisia muiden lukujen kanssa.

Alaryhmä	Ilmaantuvuus /100 000	95% CI	I <sup>2</sup> %	p-arvo
Sukupuoli				
Miehet	1,91	1,65 - 2,19	1,9	0,433
Naiset	1,36	1,14 - 1,59	14,1	0,162
Puolimanner				
Pohjois-Afrikka	0,89	0,70 - 1,07		
Pohjois-Amerikka	1,60	1,23 - 2,01	0,0	0,996
Etelä-Amerikka	0,87	0,27 - 1,83	26,7	0,256
Itä-Aasia	0,85	0,47 - 1,34	46,3	0,072
Etelä-Aasia	0,42	0,06 - 1,11		
Länsi-Aasia	0,87	0,47 - 1,39	0,0	0,401
Australia ja Uusi-Seelanti	2,25	0,71 - 4,67		
Karibia	0,95	0,71 - 1,19		
Pohjois-Eurooppa	2,40	1,92 - 2,94	23,2	0,146
Suomi***	2,27			
Keski-Suomi**	2,43			
Etelä-Eurooppa	1,49	1,21 - 1,81	14,6	0,208
Länsi-Eurooppa	2,76	2,00 - 3,64	0,0	0,727
Taloudellinen taso				
Kehittyneet maat	1,79	1,58 - 2,02	22,0	0,033
Kehittyvät maat	0,63	0,44 - 0,85	0,0	0,782

#### Taulukko 1.B.

ALS:sta johtuva ilmaantuvuus maailmanlaajuisesti. 124 tutkimuksen meta-analyysi, muokattu artikkelista: Xu, Liu, Liu et al. *Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J. Neurol.* 2020(116).

Suomi\* = Jokelainen M. *Amyotrophic Lateral Sclerosis in Finland I: An Epidemiologic study. Acta Neurol. Scand.* 1977(104).

Suomi\*\* = Murros K, Fogelholm R. *Amyotrophic Lateral Sclerosis in Middle-Finland: an epidemiological study. Acta Neurol. Scand.* 1983(117).

Suomi\*\*\* = Maasilta P, Jokelainen M, Löytönen M et al. *Mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Finland, 1986-1995. Acta Neurol. Scand.* 2001(118).

Suomi \*\*\*\* luvut eivät ole suoraan vertailukelpoisia muiden lukujen kanssa

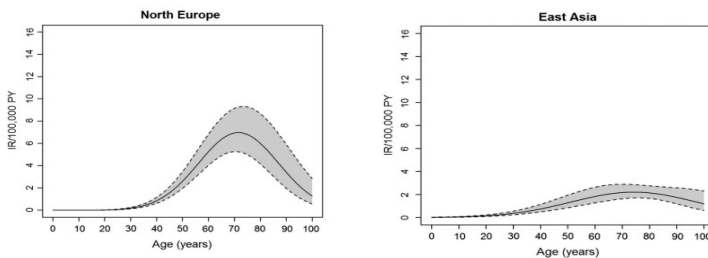
Alueellisesti ilmaantuvuus oli suurinta Länsi-Euroopassa, 2,76 (95 % CI 2,00-3,64), samoin vallitsevuus 9,62 (95 % CI 4,80-16,10), ja alhaisinta Etelä-Aasiassa, jossa ilmaantuvuus oli 0,42 (95 % CI 0,06-1,11), ja vallitsevuus 1,57 (95 % CI 0,17-4,39). Tilastollisesti merkitsevää lisääntymistä luvuissa ei ollut, ja lievä kasvava trendi heikkeni entisestään, kun vakiointi suoritettiin WHO:n väestöpohjaan. Sairauden kestossa todettiin selviä eroja, Pohjois-Euroopassa se oli 2,0 vuotta, Etelä-Euroopassa 3,7 vuotta, Itä-Aasiassa 4,3 vuotta ja Länsi-Aasiassa 9,2 vuotta. Erot aiempaan, Marinin ja kumppaneiden 2017 tekemään tutkimukseen eivät olleet suuria. Kummassakin nähtiin lisäksi ilmaantuvuuden lasku kaikkein vanhimmissa ikäryhmissä. Euroopassa todetun sairauden lyhyemmän keston syyksi tutkijat arvelivat Aasian maiden nuorempaa väestörakennetta ja aiemmin raportoitua, eurooppalaisperäistä väestöä vähäisempää bulbaarisen tautimuodon osuutta(119). Lisäksi sen, että Japanissa ja Taiwanissa >20 % ALS-potilaista päättyy trakeostomiateitse toteutettuun respiraattorihoitoon,

jonka osuus Euroopassa on < 10 %, katsottiin vaikuttavan kestoista tehtyihin arvioihin. Voidaan myös olettaa, että taudin kesto eurooppalaisperäisessä väestössä lyhentää  $C9^{HRE}$ :n suurempi osuus, mikäli se aiheuttaa aggressiivisemmän taudin.

Xu ja kumppanit pohtivat muutamia eroja ja yhtäläisyyksiä, jälkimmäisestä mainittakoon Länsi-Aasian korkea esiintymä, joka on Länsi-Euroopan luokkaa. Kirjoittajat arvelevat tärkeimmäksi syyksi Länsi-Aasian ja Euroopan geneettisen läheisyyden, joka on lyhyempi kuin Euroopan ja Itä-Aasian. Kehittyneiden maiden ja kehitysmaiden väliset erot selittyvät ainakin osittain populaatioiden taloudellisilla ja demografisilla eroilla ikärakenne-erojen tarjoutuessa vahvimaksi tekijäksi. Muita syitä ALS:n epidemiologisissa tutkimuksissa raportoitujen tulosten eroille ovat mm. otoskokojen erot, tapausten esiinkaivun tekniset erot, erilaiset diagnostiset kriteerit ja taudin eri muotojen mukaanoton ja poisrajaamisen kriteerit(120).

Marin ja kumppanit tutkivat 2018 annos-vastesuhde-meta-analyysillä ALS:n ikäspesifistä ilmaantuvuutta, eli toisin sanoen sitä, missä iässä suurin ilmaantuvuus esiintyi(121). Aineisto käsitti 41 väestöpohjaista erillistutkimusta, jotka kattoivat 42 maantieteellistä aluetta. Kysymyksenasettelu nousi esiin useassa tutkimuksessa havaitusta ilmiöstä, jossa ALS:n ilmaantuvuus kasvaa iän myötä noin 75 ikävuoteen ja laskee sitten(122). Myös AD:n ja PD:n esiintyvyyden on todettu suhteellisesti vähenevän yli 85-vuotiaiden joukossa. Asialla on merkitystä, koska jos sairaus ilmaantuu erityisesti tietyssä ikäryhmässä, voi tieto johtaa taudin etiologian selviämiseen.

Marinin 2018 tutkimuksessa ikäspesifisen ilmaantuvuuden huipun (missä iässä ilmaantuvuus on korkein) vaihtelu oli suurinta Pohjois-Euroopassa: 60,8–80,7 ikävuotta (mediaani 70,6 vuotta) ja itse ilmaantuvuus vaihteli 3,02–13,81/100 000. Myös Pohjois-Amerikassa ilmaantuvuuden huipun vaihtelu oli suurta 64,5–80,8 ikävuotta (mediaani 77,1 vuotta), ja ilmaantuvuus 5,18–11,36/100 000. Etelä-Euroopassa ilmaantuvuuden huipun ikävaihtelu oli pienempää 69,3–76,0 (mediaani 73,1), ilmaantuvuus 4,14–9,53. Ilmaantuvuuden ikähuippu sijoittui Itä-Aasiassa lähelle muuta maailmaa (74,3 vuotta), mutta ilmaantuvuus (2,05–2,84) oli pienempi kuin muualla (Kuva 4.)



**Kuva 4.**

Annos-vaste meta-analyysi ALS:sta aiheutuvasta ikäspesifistä ilmaantuvuudesta alueittain, esimerkkeinä Pohjois-Eurooppa ja Itä-Aasia. Alkuperäisestä artikkelista muokattu kuva.

Lähde: Marin, Fontana, Arcuti et al. Age-specific incidence: a dose-response meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2018(121). Alkuperäisen kuvan käyttöoikeus varmistettu kustantajalta.



Syyksi Itä-Aasian pienemmälle ilmaantuvuudelle kirjoittajat ehdottavat erilaista geneettistä taustaa, ympäristötekijöitä tai näiden yhdistelmää.

Selitys sille, miksi ALS:n ilmaantuvuudessa ylipäätään on ikään liittyvä piikki, ei ole yksiselitteinen. Osa tutkijoista on sitä mieltä, että syynä on puutteellinen tapausten löytyminen vanhemmissa ikäryhmissä(123). Iäkkäämmillä on todennäköisemmin muita, maskeeraavia sairauksia, ja he saattavat päätyä neurologiseen arvioon harvemmin. Bulbaarialkuinen taudinkuva painottuu iäkkäämpiin naisiin, ja heillä taudin kesto on myös lyhyempi, jolloin on mahdollista, että sairastuneen löytymisen todennäköisyys vähenee. Iäkkäillä bulbaarioireisilla rilutsolin aloittaminen saattaa myös olla vähäisempää(124,125). On myös esitetty näkemys siitä, että ALS:n alkamisikä on suhteellisen vakio, ja sairastumisen ikä korreloi enemmän biologiseen ikään kuin kalenteri-ikään(126).

Ikäspesifin ilmaantumisen taittumisen taustalla voi olla yksi tai useampi seuraavan tyyppisistä syistä:

- 1) Populaatio jakautuu taudille alttiiseen ja ei-alttiin osapopulaatioon. Kun ensiksi mainittuun kuuluneet ovat sairastuneet, lisääntyy ei-alttiiden määrä siinä joukossa, joka on vielä riskissä sairastua. Alttiiksi voidaan katsoa altistuminen ympäristöperäiselle tai geneettiselle tekijälle, tai näiden yhdistelmälle.
- 2) Kausatiivinen altistuminen (ympäristö- tai käyttäytymisperäinen) kriittisen iän jälkeen.
- 3) Valikoiva typistymisen siten, että osa henkilöistä kuolee muihin sairauksiin ennen ALS:in ilmaantumista ja diagnoosia.

Yleisesti ottaen useampia esiinikäivulähteitä hyödyntävät prospektiiviset tutkimukset tuottavat korkeampia tunnuslukuja kuin retrospektiiviset(127). Tälle on useita syitä aina kehittyvästä tilojen tunnistamisesta ja hoidosta *de novo*-mutaatioiden huomioon ottamiseen. Myöskään pelkästään hallinnolliselle tilastoinnille perustuvat tutkimukset eivät ole harvinaisten tautien tutkimuksessa harhattomia(128). On esitetty näkemys, jonka mukaan alle 1 miljoonan kokoisessa väestössä ALS:sta johtuvan kuolleisuuden tutkiminen ei ole mielekäästä. Jos väestö on epähomogeeninen, tarvitaan vielä suurempi riskissä oleva väestö, koska esimerkiksi väestön kahden alaryhmän suhteen ollessa 8:2, tarvitaan arviolta 10-miljoonainen väestö, jotta viiden vuoden seuranta-aikana olisi mahdollista todeta 25 %:n ero ilmaantuvuudessa(102). On myös esitetty, että noin 12 vuoden ajanjakso on pituudeltaan ideaali vallitsevuustutkimukselle, sillä se ottaa parhaiten huomioon pitkään sairastavien osuuden(129).

On myös mahdollista, että ilmaantuvuuden ja esiintymän ajallisia muutoksia tutkittaessa saatuihin tuloksiin vaikuttaa se, onko käytetty ilmaantuvuuskohorttia eli kerätty tapauksia tietyistä hetkestä eteenpäin, vai esiintymäkohorttia eli otettu tutkimukseen tietynä ajanjaksona jo todetut tapaukset. Irlantilaisessa tutkimuksessa vuodelta 2008 näin muodostetut kohortit osoittautuivat demografisilta ominaisuuksiltaan erilaisiksi(130). Esiintymäkohortissa oli vähemmän bulbaarialkuisia ja enemmän nuorempia tapauksia. Tällaisilla eroilla saattaa olla merkitystä muodostettaessa hoitokohorteja ja kerätessä suuria määriä DNA-näytteitä analyysejä varten

### 6.6.3 ALS:n epidemiologia Suomessa

Suomessa ALS:sta julkaisivat ensimmäisinä Kurt Boman ja Tuula Haltia (o.s. Meurman) 1967. He totesivat 9/140 potilaalla perheittäin esiintyvyyttä. Huonoin ennuste (1v) oli bulbaarialkuisella kaksikolla, ja paras (7,6 v) yhdellä viidestä alaraaja-alkuista tautia sairastavasta potilaasta(131). Vuonna 1971 Arto Nuutila ja Juhani Wikström arvioivat

työkyvyttömyystilastoihin perustuvassa raportissaan perheittäin esiintyvyyden niinkin korkeaksi kuin 18 %(132).

Vuonna 1975 Matti Jokelainen, Jorma Palo ja Juhani Wikström selvittivät ALS:n esiintymää KELA:n vuoden 1973 rekisterien pohjalta(133). Tässä tutkimuksessa havaittiin alueellinen painottuminen Kaakkois-Suomeen. Se vahvistui 1976 tutkimuksessa, jossa Jokelainen tutki ALS:sta johtuvaa kuolleisuutta ja esiintymää(134). Tutkimus perustui 421 potilaan kuolintodistuksiin ajalta 1963–72. Kuolleisuudeksi saatiin 0,91, esiintyvyydeksi 3,25, ja sukupuolijakaumaksi (M:F) 0,87:1. Tässä tutkimuksessa ei havaittu FALS-tapauksia, joskaan niiden etsimiseen ei varsinaisesti paneuduttu.

Jokelainen jatkoi esiintymän selvittelyä 1977 yhdistämällä aiempiin aineistoihin sairaaloiden poistoilmoitustiedot(104). Esiintyvyydeksi saatiin 3,56, ja laajennetussa arvioissa 3,71(135). Sukupuolijakauma (M:F) oli 1,5:1. Painottumista havaittiin Etelä-Savoon, jossa esiintymäksi saatiin 8,35, ja Pohjois-Karjalaan, jossa se oli 7,69. Myöhemmin arvioituna Pohjois-Karjalan esiintymää suurentavan tekijän voidaan olettaa ainakin osittain olevan SMAJ(136).

Myöhemmässä tutkimuksessa todettiin ALS:n esiintymän olevan kaksi kertaa niin suuri evakkojen parissa kuin muussa väestössä (18,0 vs 8,8), kun taas MS-taudin esiintymä oli puolet siitä mitä ei-evakuoidulla väestöllä(137).

Sen arvioimiseksi, olisiko Suomessa löydettävissä perheittäin esiintyvyyttä syntymäpaikkakartoituksen perusteella, selvittivät Jokelainen ja Palo vuonna 1980. Tutkimuksessa kartoitettiin vuodelta 1973 sattumanvaraisesti valittujen 31 potilaan, heidän 58 vanhempansa ja 110 isovanhempansa syntymäpaikat. Mitään erityistä maantieteellistä ryvästymää tai yhteisiä sukulaisuussuhteita ei löytynyt, ja kirjoittajat päättelivät tuloksen puhuvan sitä vastaan, että Suomessa ALS:n taustalla vaikuttaisi geneettinen tekijä(138). On painottettava, että näin pieni ja geenidataa sisältämätön aineisto ei voi kertoa ALS:n perinnöllisyydestä mitään. Vuotta aiemmin Vilho Myllylä ja kumppanit olivat julkaisseet tapauselostuksen kahdesta henkilöstä, joilla todettiin noin 20 vuoden iässä alkanut, sittemmin hitaasti edennyt ALS(139). Kyseiset mies ja nainen tulivat seitsemänlapsisesta itäsuomalaisesta perheestä. Taudinkuva, periytymistapa ja 15 vuotta myöhemmin tehdyt geneettiset selvittelyt osoittivat *SOD1p.D91A*-mutaatioon kytkeytyvän taudin(140). Väitöskirjassaan Jokelainen raportoi kaksi FALS-tapausta kahdessa eri perheessä(135). Lisäksi hän on julkaissut 1978 tapauselostuksen identtisistä kaksosista, joista vain toisella todettiin ALS(141).

Kari Murros ja Rainer Fogelholm julkaisivat 1983 väestöpohjaisen tutkimuksen ALS:n esiintymästä Keski-Suomen sairaanhoitopiirissä(103). Vuosina 1976–81 alueella diagnosoitiin 36 uutta potilasta, joista jokaiselle kaltaistettiin iän, sukupuolen ja asuinpaikan suhteen neljä verokkia. Tutkimuksessa ilmaantuvuudeksi saatiin 2,4 ja esiintyvyydeksi 6,4. Sukupuolijakaumaksi (M:F) saatiin 1:1,4. Sairastumisiän mediaani oli 60,5 vuotta ja bulbaarialkuisten (37 %) ennuste oli huonompi kuin spinaalialkuisten. Ilmaantuvuus evakuoidussa väestössä oli hieman suurempi (19,4 %) kuin kontrolleissa 13,7 %, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Tutkimus sisälsi laajan kyselyn, jonka vastausten perusteella viitteitä mahdollisista etiologisista tekijöistä ei saatu. FALS:n osuus aineistossa oli 11,6 %. Tutkimuksen merkitys on mm. siinä, että sen osoittama esiintymä kuuluu korkeimpiin maailmassa todettuihin, kun Läntisen Tyynenmeren ja Färssaarten(142) ryvästyksiä ei oteta huomioon. Färssaarilla FALS:n osuudeksi on todettu vähintään 14 %, ja sen on katsottu johtuvan perustajavaikutuksesta eteläisimmällä saarella Suðuroyillä. Färssaarilla sukuselivityksiä on onnistuttu tekemään 1650-luvulta alkaen(143).

ALS:n esiintymän ajallista muutosta arvioitiin Paula Maasillan ja kumppaneiden tutkimuksessa 2001(118). ALS:sta johtuvan kuolleisuuden todettiin kasvaneen vuosien 1986

(1,54) ja 1995 (2,27) välillä, ja kolminkertaistuneen, jos lähtökohdaksi otettiin vuosi 1963. Eniten kasvuun vaikuttaneeksi syyksi kirjoittajat esittivät kohonnutta elinajan odotetta, jonka myötä suurempi joukko ALS:lle alttiista subpopulaatiosta päätyy elämään ikään, jossa ALS todennäköisimmin ilmenee. Tulokset vastasivat hyvin ruotsalaisesta populaatiosta saatuja tuloksia(144).

Sabel ja kumppanit julkaisivat 2000 tutkimuksen, jossa 1000 potilaan aineistoa ydinestimoinnilla matemaattisesti mallintaen tutkittiin ALS:iin sairastumisen suhteellista riskiä arvioimalla altistumista ajan ja paikan suhteen siten, että syntymäpaikka ja myöhempi asuinpaikka otettiin huomioon(145). Tutkimuksessa havaittiin ryvästymistäipumusta Kaakkois-Suomeen ja länsirannikolle Vaasan ja Oulun välille. Myöhemmin arvioituna tuloksia voidaan pitää viitteellisinä *SOD1p.D91A*-mutaation *C9<sup>HRE</sup>*:n maantieteellisten esiintymien suuntaan. Sabelin työryhmä tutki vielä 2003 ALS:n ryvästyksiä Suomessa aineistona 1985–95 kuolleet, joista selvitettiin myös syntymäpaikat. Tässä tutkimuksessa ryvästymistä todettiin Savossa ja Pohjois-Karjalassa, mutta ei Keski-Suomessa(146).

Hannah Rostalski ja kumppanit(147) etsivät 2021 *C9<sup>HRE</sup>*:lle SNP-ryhmätason markkeria 218 792 potilaan aineistosta käyttäen FinnGen tietopankkia (<https://www.finnngen.fi/fi>). Tässä tutkimuksessa aiemmin löytynyttä suomalaista 42 SNP:n riskihaplotyyppin markkeriakin korkeampi assosiaatio saatiin ”uuden” SNP:n (rs139185008, MAF 0,016) ja ALS:n, FTLD:n sekä idiopaattisen normaalipainehydrokefaluksen välille. Maantieteellisessä analyysissä korkein tämän uuden markkerin esiintymä oli todettavissa Etelä-Savossa ja matalin Pohjanmaan rannikolla. Ensiksi mainittu sopii aiempaan tietoon ALS:n korkeammasta esiintymästä Savossa. Jälkimmäinen saattaa olla seurausta Suomen asutushistoriasta, jossa Pohjanlahden rannikkoseutujen asutushistoria eroaa Savon asutushistoriasta(2).

Yhteenvedona ALS:n epidemiologisista tutkimuksista Suomessa voidaan todeta, että tauti ei ole tasaisesti jakaantunut. Sekä ympäristö- että geneettiset tekijät (*SOD1p.D91A* Pohjois-Suomessa ja *C9<sup>HRE</sup>* Etelä-Savossa) ja mahdollisesti näiden yhteisvaikutukset saattavat selittää havaitut erot.

## 6.6.4 ALS-rekisterit

ALS:n epidemiologisen luonnehdinnan vaikeuksia helpottamaan, samoin kuin potilaiden systemaattisempaa seurantaa varten on perustettu potilasrekistereitä. Logroscino ja Piccininni julkaisivat aiheesta 2019 katsauksen(148), jossa keskityttiin käsittelemään tunnuslukujen arviointi- ja tilastointiongelmia. Ensimmäinen tällainen väestöpohjainen prospektiivisesti rakentuva rekisteri aloitti toimintansa Skotlannissa(149) 1989. Skotlannilla on lukuisia etuja tällaisen rekisterin rakentamiselle ja ylläpitämiselle. Näitä ovat 1) suhteellinen eriytyneisyys maassa, jossa on toimiva terveydenhuoltojärjestelmä, 2) potilaiden kirjautuminen tunnistettavaan yleislääketieteelliseen hoitosuhteeseen ja suhteellisen vähäinen hoidon siirto maan ulkopuolelle, 3) luotettavat väestöä kuvaavat perustunnusluvut. Näiden ehtojen voidaan katsoa vallitsevan myös Suomessa.

Mielenkiintoista on, että rekisterin perustamisen alkuaikoina Skotlannin runsaan 5 miljoonan asukkaan väestön hoidosta vastasi vain 19 neurologia ja 4 kliinistä neurofysiologia, jotka kykenivät tekemään ENMG-tutkimuksen. Vastaavia rekistereitä on sittemmin perustettu Englannin Lancashireen(150), Irlantiin(151), ja kolmelle alueelle Italiaan (Piemonte & Valle d’Aosta(152), Lombardia(153) ja Puglia)(154). Tällainen rekisteri on aloittanut toimintansa 2015 myös Ruotsissa(155). Suomessa asia on suunnitteluasteella.

Näiden rekisterien pohjalta tehdyt arviot ALS:sta johtuvasta ilmaantuvuudesta ovat 1,7–2,3 (/100 000) eli korkeammat kuin valtaosassa edellä mainituissa meta-analyyseissa todetut. Prospektiivisissa keräyksissä potilasjärjestöt ovat toimineet yhteistyökumppaneina.

Luotettavat seurantatiedot ovat yleensä perustuneet kontrollikäynteihin 6 kk:n välein, minkä on katsottu lisäävän diagnostista tarkkuutta ja vähentävän ALS:ia imitoivien sairauksien osuutta rekistereissä(148). Näiden väärin positiivisten sairauksien osuudeksi on arvioitu 3 vuoden rekisteriseurannan kohdalla 10 %. Multifokaalisen motorisen neuropatian (MMN) osuudeksi näistä on arvioitu 22 % ja kervikaalisen spondylopatian osuudeksi 19 %(148). Yleisimmäksi tapahtumaksi, jonka perusteella tapaus on voitu määrittellä muuksi kuin ALS:ksi, on osoittautunut oireiston etenemisen puuttuminen.

ALS:n etenemistä on seurattu rekistereiden avulla myös määrittämällä tarkka aika oireiden alusta diagnoosiin. Tällä tiedolla on paitsi epidemiologista merkitystä, myös merkitystä lääketutkimuksien kannalta, koska sitä käytetään nykyään yhtenä potilaiden sisäänottokriteerinä. Eurooppalaisten rekisterien on toisaalta arvioitu olevan hieman liian pieniä silloin, kun vuotuinen rekisteröitävien potilaiden määrä on ollut 60–100.

Kyseisten rekistereiden (EURALS) pohjalta on tehty arvio, jossa 24 miljoonan ihmisen väestöpohjasta tutkittiin 1989-99 kerätyt 1028 ALS:iin sairastunutta(156). Ilmaantuvuudeksi saatiin 2,7 (/100 000) kun nimittäjänä olivat yli 18-vuotiaat. Tässäkin tutkimuksessa kyettiin vahvistamaan ilmaantuvuuden lasku yli 75-vuotiaiden ikäryhmässä, ja se tapahtui aiemmin miesten kuin naisten kohdalla.

Toistopyydystysotannalla (capture-recapture) on 1994-95 saatu niinkin korkea ilmaantuvuusluvun arvio kuin 4.9 (/100 000) Limousin'n alueella, jossa on Ranskan iäkkäin väestö: 22 % on yli 65-vuotiaita(157). Kun samassa tutkimuksessa havaittu ilmaantuvuus suhteutettiin ikävakiointin jälkeen Ranskan väestöön, saatiin vuotuisen ilmaantuvuuden keskiarvoksi 2,5, ja 1,9 kun tulos suhteutettiin maailman väestöön. Tutkimuksessa toistopyydystysotannalla saadut korkeammat tunnusluvut ovat todennäköisesti seurausta terveydenhuollon eri toimijoiden määrästä tutkitulla alueella, ja ne saattavat tietyissä olosuhteissa antaa todellisemmän kuvan uusien tapausten määrästä.

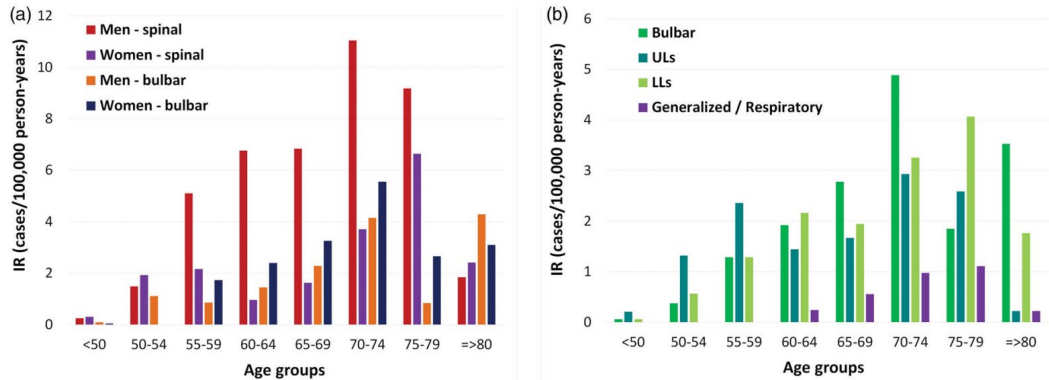
Väestöpohjaiset tutkimukset kattavat parhaiten ALS:n ilmiäsuojen kirjjon. Erikoistuneiden keskusten potilassarjat ovat alttiita läheteharhalle (engl. referral bias), jossa otanta kohdistuu vääristyneeseen perusjoukkoon. ALS-keskusten potilaat ovat useammin nuorempia ja miehiä, harvemmin bulbaarialkuisia, ja useammin hyvänlaatuista tautia sairastavia sekä todennäköisemmin FALS-sukujen jäseniä.

Edellä esitetyt erot todettiin tutkimuksessa, jossa verrattiin hoitoon erikoistuneiden keskusten potilaita samoilla alueilla toimivien ALS-rekistereiden potilasaineistoon, ja ikäeroksi saatiin 1,1 -2,4 vuotta maasta riippuen(158). Keskusten aineisto oli nuorempaa. Se hakeutuuko tai lähetetäänkö ALS-potilas erikoistuneeseen keskukseseen, riippuu hoidon järjestämisen rakenteista alueellisella ja kansallisella tasolla. Siihen vaikuttavat neurologien sekä ENMG- ja MRI-tutkimusten saatavuus ja jonkin verran yleinen, potilasverkostojen sekä muiden lääkäreiden kuin neurologien tietämys ALS:sta. Joissakin yhteiskunnissa vaikuttavat myös potilaan tulotaso ja maantieteelliset etäisyydet. Esimerkiksi Suomessa on etäisyyksien takia vaikeampi toteuttaa ALS:n hoitoon keskittyneitä keskusta kuin vaikkapa Tanskassa, vaikka maiden populaatiot ovat samankokoiset.

## 6.7 ALS:N KLIINISET PIIRTEET

ALS alkaa yleensä 55–75 ikävuoden iässä (Kuva 5.). Kliinisessä tutkimuksessa havaitaan lihasjänteyden lisääntymistä (spastisuus), krampeja ja jännevenytysheijasteiden (refleksit) kiihtymistä ylemmän motoneuronin (UMN) vaurion merkinä. Refleksien heikentymistä, elohiiriä (faskikulaatiot) ja lihasten surkastumista nähdään alemman motoneuronin (LMN) vaurion merkinä. Positiivinen Babinskin merkki, jota pidetään tärkeimpänä ylemmän motoneuronin vaurion osoittajana, voi olla löydöksenä, mutta saattaa myös puuttua ja jopa kadota taudin edetessä(159). Löydökset ovat alkuun läiskittäisiä, mutta laajenevat uusille

alueille taudin edetessä. Raajoissa eteneminen suuntautuu ensin vastakkaiseen saman tason raajaan ja vasta myöhemmin toiseen saman puoleiseen raajaan ja viimeiseksi toiseen eri tason vastakkaiseen raajaan.



**Kuva 5.**

ALS:n ilmaantuvuus eri ikäryhmissä. Kliininen kuva sukupuolen mukaan (a) ja oireiden alkukohtaan mukaan (b). UL= yläraaja, LL=alaraaja.

Lähde: Jericó I, Elizade-Beiras I, Pagola I et al. *Clinical features and incidence trends of amyotrophic lateral sclerosis in Navarre, Spain, 2007-2018: a population-based study. Amyotroph Lateral Scler Front Degener. 2021(160). Alkuperäisen kuvan käyttöoikeus varmistettu kustantajalta.*

ALS:n oireperäisiä luokituksia on 2000-luvulla laadittu useita(161–163). Koneoppimisen aikakaudella ALS on toistetusti voitu jakaa kuuteen eri alaryhmään sen perusteella, missä ruumiinosassa sairauden ensimmäisen 1 vuoden aikana havaitut oireet ilmenevät. Nämä alaryhmät ovat:

- 1) Bulbaarialkuinen eli nielun lihaksista alkava
- 2) Respiratorinen eli hengitysilhaksista alkava
- 3) Flail arm, eli BAD tai ihminen tynnyrissä-oireyhtymä (kts. alempana), yläraajoista alkava
- 4) Klassinen
- 5) Pyramidaalinen
- 6) Flail leg eli distaalinen alarajasta alkava

- 1) *Bulbaarialkuinen ALS* on useissa tutkimuksissa raportoitu hieman yleisemmäksi naisilla(164). Sen osuus kaikista tapauksista on noin 20 %. Sairastumisiän huippu sijoittuu kahdeksannelle vuosikymmenelle molemmilla sukupuolilla. Noin 10 %:lla todetaan myös FTD, mikä on korkein FTD-osuus eri ALS:n alatyypeistä. Ennuste on toiseksi huonoin eli luokkaa 2 vuotta(164–166).
- 2) *Respiratorinen ALS* on harvinaisin, ja yleisempi miehillä, suhteeksi on raportoitu 6:1. Ennuste on huonoin, mediaani 1,4 vuotta(167). On mahdollista, että respiratorisella ALS:lla on oma geneettinen taustansa(168).
- 3) *Flail arm, BAD, PIBS*, on verraten harvinaisen ja yleisempi miehillä, joilla on ikäpiikki noin 70 vuoden iässä. Tässä alaryhmässä lihasheikkous painottuu proksimaalisesti yläraajoihin, ja sitä kutsutaan nimillä brachial amyotrophic diplegia (BAD) tai person-in-

the-barrel syndrome (PIBS). Kuvaavin on viimeksi mainittu, eli ihminen tynnyrissä - oireyhtymä. Siinä heikkous on LMN-vaurioon ja olka-käsivarsitasolle painottuvaa, kun taas klassisessa ALS:ssa heikkous painottuu useimmiten distaalisemmin. Tämä ero on tärkeä, koska BAD etenee selvästi klassista ALS:ia hitaammin, kestoksi on kuvattu yli 6 vuotta, ja yksittäistapauksissa vuosikymmeniä. BAD muodostaa siten ennustetta koskevan haasteen, koska klassisen ALS:n yleisin alkukohta on yläraajat. Valtaosassa BAD etenee lopulta hitaasti bulbaarialueelle ja ylävartalolle(169).

- 4) *Klassinen ALS* on yleisin alaryhmä. Alkukohta on toispuoleinen raajojen lihaksisto, yläraajoissa hieman useammin kuin alaraajoissa. Alkamisiän huippu on eri sarjoissa kuudennesta seitsemänteen vuosikymmeneen. Muutamalla prosentilla tavataan samanaikainen FTD. Elin aika on keskimäärin 3-5 vuotta(164,170,171).
- 5) *Pyramidaalinen ALS* on harvinainen, ja sillä tarkoitetaan ylempään motoneuroniin painottuvaa taudinkuvaa, jossa kuitenkin on mukana alemman motoneuronin löydöksiä, mikä erottaa sen primaarista lateraaliskleroosista (PLS)(164).
- 6) *Flail leg* on harvinainen ja ikäpiikki on 60- ja 70- ikävuosikymmenen taitteessa. Alkukohta painottuu alaraajaan distaalisesti. Samanaikaista dementiaa ei esiinny(172).

Yllä esitetty kliininen jaottelu perustuu tutkimuksiin, joissa on hyödynnetty automaattisen tietojenkäsittelyn algoritmeja. Näitä on kehitetty pyrittäessä arvioimaan kunkin alatyypin ennustetta oireenmukaisen hoidon tuloksellisuuden ja RCT:den paremman suunnittelun varmistamiseksi(173).

Aiemmat kliiniset jaottelut ovat perustuneet konkreettisempaan oirekuvan kirjaamiseen, mikä näkyy hyvin aiempien ICD-luokitusten terminologiassa. Jos raaja-alkuinen ALS painottuu LMN-vaurioon, on käytetty nimitystä etenevä eli progressiivinen lihasatrofia (PMA), ja kun vaurio rajoittuu UMN:iin, on ilmaus primaari lateraaliskleroosi (PLS). Nämä ovat klassista ALS:ia selvästi harvinaisempia. PLS:n ennuste on klassista ALS:ia parempi(174). Lapsilla esiintyy ryhmä puhtaasti LMN-vaurioiden kautta ilmeneviä harvinaisia sairauksia, joista käytetään nimitystä spinaalinen lihasatrofia (engl. spinal muscular atrophy, SMA I-III) ja joiden syy on geenivirheissä, jotka johtavat liikehermojen kannalta tärkeän SMN-proteiinin eriasteisiin puutoksiin. Aikuisilla tunnetaan SMAJ eli Jokela-tyyppinen, hidas motoneuronitauti, jota esiintyy erityisesti Pohjois-Karjalassa(175). Senkin taustalla on geenivirhe. Niin ikään harvinainen aikuisten geneettinen sairaus on miehillä esiintyvä SBMA eli Kennedyn tauti, jota sairastavia on kuvattu lähinnä Suomen länsirannikolta(176,177).

Jos sairaus ilmenee puhtaasti bulbaarialueella, käytetään nimitystä progressiivinen bulbaaripareesi eli halvaus (PBP) silloin, jos on havaittavissa vain LMN- vaurioita, ja pseudobulbaaripareesi jos mukana on oireinen UMN- vaurio. Jälkimmäiseen liittyy usein affektiherkkyyttä, käytännössä lyhyitä kontrolloimattomia itkupyrähdyksiä, jotka eivät ole välitön merkki psyykkisestä häiriöstä. Näitä pseudobulbarioireita nähdään muissakin aivohermoja vaurioitavissa hermoston sairauksissa. Toisinaan bulbaarialueille painottuvat oireet leviävät lopulta muillekin alueille(178).

Bulbaarialkuisten ALS-potilaiden huono ennuste johtuu useasta seikasta, joista tärkeimmät ovat potilaiden keskimäärin korkeampi ikä ja se, että ne haittaavat jo alkuvaiheissaan elintärkeitä toimintoja kuten nielemistä ja edetessään hengittämistä. PBP-potilaiden ennuste on hieman parempi(179). On myös näyttöä siitä, että bulbaaripainotteinen muoto kytkeytyy spinaalialkuista useammin kognitiivisiin eli muistia, oppimista ja ajattelua käsittäviin puutosoireisiin(180).

Silmänliikuttajalihasten on todettu säilyvän pisimpään toimintakykyisinä ALS:ssa. Tämän katsotaan johtuvan ensisijaisesti siitä, että III:n ja VI:n aivohermojen ja Onufin tumakkeen yhteys aivokuoreen ei tapahdu yhden synapsin kautta. Tämä periaatteessa mahdollistaa silmäliikeohjauksen käytön kommunikaatiovälineenä jopa locked-in -vaiheeseen eli

loukkuhalvaukseen edenneessä taudissa(181). Onufin tumakkeen hermottaman anaalisfinkterin eli peräaukon sulkijalihaksen on todettu säilyvän muuta lihaksistoa pitempään toimintakykyisenä. Tämä on yksi kanava kommunikaatioapuvälineille(182).

### 6.7.1 Ei-motoriset piirteet

ALS:n ei-motorisista piirteistä olennaisia ovat kognitiivinen ja käyttäytymishäiriöin ilmenevä oireisto. Harvinaisia lisäpiirteitä ovat ekstrapyramidaaliset, pikkuauvoperäiset ja sensoriset poikkeavuudet(183). Tässä yhteenvedossa ei käsitellä niitä.

Kognitiivisen häiriön kuvaan kuuluvat ensisijaisina toiminnanohjauksen ongelmat ja kielelliset häiriöt. Käyttäytymishäiriöistä yleisin on apatia. Näitä ei-motorisia oireita tavataan eri muodoissaan jopa 65 %:lla potilaista ja 15-20 %:lla oireisto täyttää demencian kriteerit(184,185). ALS-potilaan sukuhistoriaa kirjattaessa on erittäin tärkeätä osata esittää oikeat kysymykset, koska jos suvussa osoittautuu olevan paljon demencianta, (kts. osatyö IV ja FALS-NP-luokitus) voi tämä johtaa selvittelyn tarkentumiseen myös genetiikan keinoin.

### 6.7.2 Frontotemporaalidegeneraatio (FTLD/FTD)

Ei-motoriset oireet johtavat edetessään tilanteeseen, joka voidaan käsittää siten, että mukana on eriasteinen frontotemporaalidegeneraatio, suomalaiselta nimeltään otsaohimolohkorappeuma. Sen hahmottamista vaikeuttaa eri nimikkeiden ja lyhenteiden limittäinen käyttö. FTD:tä on usein käytetty on otsa-ohimolohkorappeuman (FTLD) synonyyminä, mikä johtuu siitä, että noin 80 % FTLD:stä ilmenee FTD:nä ja tarkennettuna sen muotona bvFTD (engl. behavioural variant frontotemporal dementia)(186). FTD voidaan jakaa paitsi bvFTD:aan, myös kielellisiin oirein ilmeneviin 3 muuhun alamuotoon, joita ovat nfvPPA, svPPA ja lvPPA. Tässä yhteenvedossa FTD:llä tarkoitetaan frontotemporaalidemencianta ja FTLD:llä yläkäsitettä otsa-ohimolohkorappeuma.

FTLD:n diagnosointi on haastavaa, koska se on helppo kirjata yleisesti dementiaksi tai virheellisesti Alzheimerin taudiksi (AD). Lisäksi FTLD:aan kuuluu merkittävän yleisesti psykiatrisia oireita, ja erityisesti *C9<sup>HRE</sup>*-toistojaksomutaation yhteydessä hallusinaatioita, harhaisuutta (deluusiot) ja psykooseja(187).

FTLD on myös neuroanatomispatologinen ilmaus, ja sen alamuodoissa yhdistävänä tekijänä on aivokudoskadon paikantuminen otsalohkoihin ja ohimolohkojen etuosiin. Neuropatologisesti FTLD jaetaan kolmeen tyyppiin tunnusomaisen proteiinin osoittamisella: FTLD-tau, FTLD-TDP-43 ja FTLD-FET. Näitä ei erikseen käsitellä tässä.

Kliinisesti on kyse hyvin heterogeenisestä ryhmästä erilaisia tiloja. Kliinisesti FTLD voidaan jakaa neljään varsinaiseen pääryhmään. Näitä ovat:

1. Frontotemporaalisen demencian käyttäytymishäiriöin ilmenevä muoto (bvFTD), jossa johto-oireina ovat persoonallisuuden muutokset, sosiaaliset vaikeudet ja toiminnanohjauksen ongelmat.
2. Primaarisen progressiivisen afasian (PPA) semanttinen variantti (svPPA), etenevä sujumaton variantti (nfvPPA) sekä logopeeninen variantti (lvPPA). Kaikilla on johto-oireena kielenhallinnan keskushermostoperäinen ongelma.
3. FTLD-plus, johon luetaan etenevä supranukleaarinen halvaus (PSP) ja kortikobasaalinen degeneraatio (CBD), tai oikeammin kortikobasaalinen oireyhtymä (CBS).
4. ALS-FTLD.

Oireisto voidaan jakaa myös negatiivisiin (esimerkkeinä apatia, aloitteettomuus, välinpitämättömyys) ja positiivisiin (esimerkkeinä ärtyneisyys, impulsiivisuus, aggressiivisuus ja ärsykesidonnainen käyttäytyminen). Kaikille alatyypeille on omat diagnostiset kriteerinsä, joita ei tarkemmin käsitellä tässä yhteenvedossa.

FTLD:n tavallisimmaksi sairastumisiäksi on raportoitu noin 60 vuotta(188). Suomessa noin 20% työikäisten etenevistä muistisairauksista on raportoitu selittyvän FTLD:llä(189). Toisaalta systemaattinen katsaus vuodelta 2016 totesi että FTLD:n ilmaantuvuudessa ja esiintymässä on maailmalla raportoitu satakertaisia eroja(190). Tuoreimmassa, väestöpohjaisessa retrospektiivisessä kohorttitutkimuksessa (FRONTIERS) vuodelta 2023, jossa aineisto kerättiin 9 Euroopan maasta ja 13 kolmannen asteen FTLD-tutkimuskeskuksesta, FTLD:n sairastuvuudeksi raportoitiin 2,36/100000(191). Sairastuvuus saavutti huippunsa aiemmin raportoitua myöhemmässä eli 71 vuoden iässä vaihteluvälin ollessa 21–87 vuotta. Tutkimuksessa korkein sairastuvuus raportoitiin Pohjois-Savosta (8,14/100000), mikä oli paitsi muuta Eurooppaa korkeampi, myös korkeampi kuin muualta Suomesta raportoitu(147). Pohjois-Savon korkean sairastuvuuden kirjoittajat päättelivät johtuvan *C9<sup>HRE</sup>*-toistojaksomutaation suuremmasta esiintymästä alueella.

Käytännön työssä perinteisesti Parkinsonin tautiin liitettyjen PSP:n ja CBS:n mukaantulo FTLD:n tautiperheeseen on kohtalaisen uutta(192).

Vuonna 2011 uudistettiin aiemmin käytössä ollut Nearyn (1998) kriteeristö bvFTD:lle Raskovskyn toimesta(193). Sen pohjalta on laadittu selkeä suomenkielinen ohjeistus (Risto Vataja, Terveysportti 2016, <https://www.kaypahoito.fi/nix02425>). Sen sijaan FTLD:n yhteys ALS:iin oli Suomessa pitkään jäsentymätön – esimerkiksi 2011 ilmestynyt suomenkielinen kliinisen neuropsykiatrian oppikirjan ensimmäinen painos ei edes mainitse ALS:ia.

Koska ALS saattaa kytkeytyä moniin FTLD:n alamuotoihin, on yhdistelmien kirjoa päädytty kuvaamaan termillä ALS-FTSD (engl. ALS-frontotemporal spectrum disorder). ALS-FTSD:tä käytetään vuonna 2017 päivitetystä Strongin luokituksessa(194), joka on rakenteeltaan hierarkkinen ja tehty tarkentamaan lisäoireisen ALS:n diagnoosia kolmeen eri käyttötarkoitukseen. Nämä ovat:

1. Tavallinen kliininen työ (Taso I),
2. Kliiniset hoitotutkimukset ja tapauselostukset (Taso II)
3. Tieteelliset, ALS-FTSD:n etiologian selvittämiseen tähtäävät tutkimukset (Taso III).

Strongin luokitus etenee näille tasoille käyttämällä kolmea akselia, jotka ovat:

1. (Akseli 1) MND:n variantit, esimerkkeinä bulbaari- vs. spinaalialkuisuus, PLS ja PMA.
2. (Akseli 2) kognitiiviset ja käyttäytymisen häiriöt.
3. (Akseli 3) muut ei-motoriset liitännäisoreet ja sairaudet.

Esimerkkinä Akseli 1:n osalta Strongin luokitus edellyttää ALS-EEc-R- ja ALS-EEc-awa-diagnosikriteerien täyttymistä. Gold coast-kriteeristöä ei ole tähän päivitetty. Geneettisen tiedon osalta Tasosta II ylöspäin suositetaan geenipaneelin tai eksomisekvensoinnin käyttöä. Akseli 2:n osalta luokitus sisältää laajan listan validoituja menetelmiä, joilla mitataan toiminnanohjauksen, kielellisten häiriöiden, muistivaikeuksien ja käyttäytymishäiriöiden laatua ja astetta. Strongin luokituksessa Akseli-2:n mallinnus on laajin. Se nimeää kognitiivisoireisen (ALSci), käyttäytymishäiriöoireisen (ALSbi), näiden yhdistelmän (ALScbi) ja täyden ALS-FTD:n. Lisäksi listataan ALS ja samanaikainen AD. Lyhenteet ovat laajalti käytössä tieteellisissä tutkimusraporteissa.

ALSci:n tunnistaminen käytännön kliinisessä työssä alkaa sanasujuvuustestillä. Puheentuoton vaikeudet on osattava erottaa motorisista bulbaarioireista. Tarkempi diagnoosi edellyttää



neuropsykologin ja puheterapeutin tekemää tutkimusta (Taso II ja siitä ylöspäin). Näiden avulla on mahdollista tunnistaa FTSD-kirjosta erilaisia alaryhmiä kuten PPA:n eri muodot. Näiden pohjalta on kokonaisennusteissa raportoitu eroja(195). Muita testejä ovat ECAS (ECAS – Edinburgh Cognitive and Behavioural ALS Screen) ja ALS-CBS (<https://cp.neurology.org/>). Kummassakin on osio potilaan läheiselle, eikä kummankaan käyttö edellytä neuropsykologin taitoja, mutta suomenkielisiä käännöksiä ei ole. Toisaalta yksinkertaisten testien yhteydessä on raportoitu toistoista johtuvaa oppimisvaikutusta(196). MMSE-tutkimus on lisäoireettomilla ALS-potilailla yleensä normaali(197). Se ei myöskään ole kovin hyvä FTLD-ryhmän sairauksien diagnostiikassa. Niitä epäiltäessä suositus on aloittaa mieluummin CERAD-testillä, joka sekään ei yksinään ole aina riittävä, koska siinä ei ole varsinaista toiminnanohjausta arvioivaa osiota.

ALSbi:n tunnistaminen on vaikeampaa. Käytännössä joudutaan turvautumaan potilaan hyvin tuntevan henkilön antamiin tietoihin. Kysymyssarja ALS-FTD-Q ALSbi:n tunnistamiseksi on julkaistu, mutta avustaja sen käyttämiseksi tarvitaan(198). ALSbi:n yleisin oire on apatia(199). Potilaat muuttuvat ärtyisiksi, negatiivisiksi, itsekeskeisiksi ja heidän sosiaaliset taitonsa ja empatiakykynsä kuihtuvat. Päihderiippuvuutta ja makeanhimoa voi esiintyä. Kognitiivinen tasonlasku voi samaan aikaan olla vähäistä, ja potilas saattaa ohjautua psykiatriseen arvioon. ALSbi voidaan nähdä asteittaisena liukumana kohti täyttä ALS-FTSD:tä. Tapahtumaketjua leimaa usein merkittävä sairaudentunnottomuus.

ALS-FTSD:ssä kognitiivinen alku on hieman yleisempi kuin motorinen alku. Ajallinen ero näissä vaihtelee kuukausista vuosiin keskimääräisen eron ollessa 2 vuotta(200–202). Osassa raportteja bulbaarialkuinen ALS kytkeytyy FTLD:aan hieman useammin kuin spinaalialkuinen. ALS-FTSD-potilaiden ennuste on huonompi kuin puhdasta ALS:ia tai FTLD:tä sairastavien. FTLD etenee kuolemaan keskimäärin 8 vuodessa. Jos ALS-FTLD:n neuropsykologiset oireet kehittyvät ensin, on sairauden kesto pitempi (km. 4,4 vuotta) kuin jos motoriset oireet ilmaantuvat ensin (km. 2,7 vuotta)(203). Jos ALS-potilaan varhaiset kognitiiviset oireet painottuvat AD:n tapaan muistiin, ei yhdistelmän ole todettu johtavan alentuneeseen elinaikaan ALS-FTSD:n tapaan(204).

Eryityisesti  $C9^{HRE}$ -toistojaksomutaatiota kantavilla ALS-FTSD-potilailla tavataan psykiatrista oireilua useammin kuin puhtaassa FTLD:ssä. Tämä ilmenee paranoidisina ja harhaluuloisina episodeina(205). ALS:ia sairastavilla  $C9^{HRE}$ :n kantajilla kognitiivinen tasonlasku esiintyy moninkertaisena verrattuna ALS:ia sairastaviin ei-kantajiin (40-50 % vs 8-9 %)(206). Kognitiivinen tasonlasku liittyy *SOD1*-mutaatioihin vain harvoin, joskin muutamia *SOD1*-mutaatioon liittyviä, kognitiivisin oirein ilmenneitä ALS- ja FTD-tapauksia on kuvattu(207). Kokonaisuutena ALS-FTSD-käsitteen haltuunotto on tärkeitä diagnoosin, hoidon tuloksellisuuden ja kliinisten hoitokokeilujen suunnittelun näkökulmasta. Näin siitä huolimatta, että kriteeristöjen käyttö todennäköisesti tuntuu Gold coast -kriteeristöä edeltävien ALS:n luokitusten tapaan mahdolliselta toteuttaa tavanomaisessa kliinisessä työssä. Hoitokokeiluja suunniteltaessa asia on kuitenkin otettava huomioon. Neuropsykiatriset lisäoireet ovat aiemmin olleet poissulkukriteeri useissa lääketutkimuksissa. Jos kuitenkin taudin olemukseen kuuluu niiden mukanaolo, on aiheellista kysyä, kohdistuiko hoitokokeilu harhattomaan otokseen. Uudemmissa hoitotutkimuksissa neuropsykiatriset oireet on otettu paremmin huomioon(208).

## 6.8 DIAGNOSTIIKKA

ALS-diagnoosi on mahdollista tehdä pelkällä kliinisellä tutkimuksella. Tällöin edellä kuvatut UMN- ja LMN-löydökset yhdistyneinä ALS:lle tyypilliseen etenemiseen ovat riittävä näyttö. Vakavan sairauden yhteydessä on sekä potilaan että lääkärin intresseissä huolellinen muiden – käytännössä ALS:ia vähemmän tappavien sairauksien poissulku. Koska klassisenkin ALS:n

oirekirjo on laaja, ovat muunlaiset tutkimukset usein tarpeen. Aina on tehtävä vähintään ENMG-tutkimus.

### 6.8.1 ENMG

ALS saattaa etenkin alkuvaiheissaan olla vaikeasti diagnosoitava sairaus, ja vajaat 10% tapauksista osoittautuikin muuksi kuin oireiden alussa epäilty ALS, kliinisesti ohjatun ENMG-tutkimuksen ollessa tärkein yksittäinen erotusdiagnostinen tutkimus(209). ENMG eli hermo- ja lihassähkötutkimus on kooste kahdesta eri tutkimuksesta (ENG + EMG).

ALS:ia imitoivista ja usein hoidettavissa olevista sairauksista erotusdiagnostisesti tärkeimpiä on multifokaalinen motorinen neuropatia (MMN). Se on harvinainen motoneuronitauti, esiintyvyys on luokkaa 0,6-2.0/1000000, tauti on miehillä 2,7 kertaa yleisempi kuin naisilla, ja ilmaantumisen huippu on 40-50 vuoden iässä(210). MMN:aa onnistutaan usein merkittävästi hidastamaan toistuvilla immunoglobuliini-infusioilla(211). MMN:ssa ENG:llä on mahdollista todeta hermojen johtumiskatkoksia (engl. conduction block), joita ei varsinaisesti esiinny ALS:ssa.

Muita ALS:ia imitoivia sairauksia ovat krooniset tulehdukselliset demyelinoivat polyneuropatiat, MS-tauti, hermojuurten sairaudet, paraneoplastiset oireyhtymät, harvinaisemmat geneettiset sairaudet ja hermojen puristustilat(212,213). Näiden keskinäiset esiintymäsuhteet riippuvat tarkastellusta ajanjaksosta ja käytössä olleiden kuvantamistekniikoiden, geenitestien, immunologisten erotusdiagnostiikkojen ja kliinisneurofysiologisten tutkimusten kuten herätepotentiaali- ja ENMG-tekniikoiden saatavuudesta ja kehitystasesta.

Toisinaan ALS-potilaat kokevat erilaisia tuntoaistimusten häiriöitä kuten puutumista ja pistelyä raajoissa. Myös näitä voidaan tutkia ENG:llä, ja lievät poikkeavuudet eivät ole harvinaisia(214). Myös F-aallon hidastumista nähdään etenkin pitemmälle ehtineessä ALS:ssa.

EMG:llä tutkitaan lihaksia niiltä alueilta, joiden epäillään olevan vaurioituneen LMN:n hermottamia. EMG löytää hermotustaan menettäneessä lihaksessa muutoksia, joista olennaisimpana ovat motorisissa yksiköissä (engl. motor unit potential, MUP) tapahtuneet poikkeavuudet. Niitä on mahdollista havaita jo ALS:n alkuvaiheessa.

Enemmistöllä ALS-potilaista nähdään ainakin jossain taudin vaiheessa faskikulaatioita, joita on mahdollista etsiä myös ultraäänellä. ALS:ssa faskikulaatiot esiintyvät hieman useammin raajojen proksimaalisissa lihaksissa, kun taas terveillä niitä nähdään yleensä distaalisemmin. Faskikulaatiot eivät ole ALS:lle spesifisiä. Terveillä henkilöillä saattaa olla viikkoja-kuukausia kestäviä episodeja, joiden aikana faskikulointi on hyvinkin runsasta, mutta jotka eivät ole kehittymässä olevan motoneuronitaudin merkki, vaan puhutaan hyvänlaatuisesta faskikulaatio-oireyhtymästä (BFS)(215). Faskikulaatioilla sinänsä ei siten ole ennustearvoa. Niitä lisäävät ikä, stressi, fyysinen rasitus, ahdistuneisuus, valvominen, kahvi, alkoholi (krapula) kilpirauhassairaudet ja magnesiumin puutos(216,217). Magnesiumin lisääminen normaalia ruokavaliota noudattavan terveen ihmisen ruokavalioon ei kuitenkaan yleensä poista hyvänlaatuisia faskikulaatioita.

Motorinen herätevastetutkimus (MEP) on tekniikka UMN-vaurioiden osoittamiseksi. Poikkeavia MEP-vasteita on raportoitu 72 %:lla niitä ALS-tapauksia, joilla UMN-vauriota ei ole havaittu kliinisesti, mutta joilla niitä kehittyi 61 %:lle 1 vuoden seuranta-aikana. MEP-poikkeavuuksia on onnistuttu osoittamaan 70 %:lla niistä potilaista, jotka eivät tutkimushetkellä täyttäneet ALS-EEC-R- ja ALS-EEC-awa-kriteereitä(218). MEP:ssä havaitut sähkömagneettisesti indusoitujen vasteiden viiveet puuttuvat PLS-potilailla tai ovat pitempiä kuin ALS-potilailla(219,220).

## 6.8.2 Kuvantavat tutkimukset

Kaularangan rappeumasta johtuva spondyloottinen myelopatia on tila, jossa kaulaydin ja/tai siitä lähtevät hermojuuret ovat puristuksissa aiheuttaen kipua ja/tai lihasheikkousoireita yläraajoissa. Kaularangan rappeumamuutoksia nähdään tavallisessa röntgenkuvassa enemmistöllä yli 65-vuotiaista, eikä siitä ole hyötyä ALS:n erotusdiagnoosissa, jossa tärkein kuvantava tutkimus on kaularangan MRI-kuvaus. Siinäkin todettavat muutokset painottuvat terveillä ja ALS:ia sairastavilla samaan ikäryhmään(221). Niiden laatu ja sijainti yhdistettynä oirekuvaan, kliiniseen tutkimukseen ja ENMG:aan yleensä johtavat oikeisiin diagnooseihin ja hoitoon. Rappeumamuutosten kirurginen hoito ei pysäytä ALS:ia, ja kirurgisten toimenpiteiden on jopa arvioitu kiihdyttävän tautia, mutta mekanismia, jolla tällainen tapahtuisi, ei ole pystytty tarkentamaan(222).

Aivojen MRI-kuvaus on perusteltua tehdä samassa yhteydessä kuin kaularangankin, etenkin jos on vähänkään viitteitä kognitiivisista oireista. Tavanomaisessa MRI-kuvauksessa ja FLAIR-kuvauksessa voidaan nähdä hypointensiteettiä motorisella aivokuorella ja kortikospinaaliratojen (engl. corticospinal tracts, CST) hyperintensiteettiä. Kirjallisuudessa CST:n hyperintensiteetin osuus vaihtelee 17–67 % (mediaani 40%) riippuen UMN-vaurioiden osuudesta tutkimuskohorteissa. On myös esitetty näkemys, että CST-hyperintensiteettiä tavattaisiin enemmän niillä, joilla taudin eteneminen on nopeampaa(223). *SOD1p.D91A*-potilailla kortikospinaaliratojen on raportoitu kuvautuvan normaaleina, vaikka kliinisesti on todettu selvät UMN-vaurion merkit(224). *C9<sup>HRE</sup>*-mutaatiosta johtuvan ALS:n yhteydessä on kuvattu aivojen etuosien kortikaalista ja subkortikaalista kuduskatoa, joka on merkittävämpää kuin ei-motorisilla alueilla ja ei-kantajilla tavattu, ja vastaa *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:ia sairastavien neuropsykologista profiilia(225). Lieviä saman tyyppisiä muutoksia on kuvattu myös oireettomilla *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajilla(226).

Etenkin VBM-tekniikoiden (engl. Voxel-based morphometry) kehittymisen myötä jo kuvauslöydökset saattavat herättää epäilyn geneettisestä etiologiasta. Geneettisesti määräytynyttä FTLD:tä ja FALS:ia sairastavilla harmaan aineen kuduskadon on raportoitu olevan voimakkaampaa kuin taudin asteen suhteen kaltaistetuilla sporadisilla verrokeilla. *C9<sup>HRE</sup>*- ja *GRN*-mutaatioiden kantajilla aivokuoren kuduskadon on raportoitu olevan voimakkaampaa kuin taudin asteen suhteen kaltaistetuilla *SOD1*- ja *TARDBP*-mutaatioiden kantajilla. Talamuksen ja pikkuaivojen kuduskadon todettiin olevan voimakasta *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajilla(227). *GRN*-mutaation kantajilla on tyyppillisesti laajat valkean aineen kirkassignaalimuutokset aivojen T2-painotteisissa MRI-kuvissa. Toistaiseksi aivokuduskadon paikantuminen vaikuttaa olevan päämuuttuja pyrittäessä erottamaan ALS-FTLD-jatkumon taustalla olevia geenivirheitä toisistaan MRI-tekniikalla(228).

Oireettomilla *C9<sup>HRE</sup>*-kantajilla tehdyissä morfometrisissä analyyseissä on muutamassa tutkimuksessa todettu MRI:ssä aivokudoksen muutoksia olevan nähtävissä jopa 5-10 vuotta ennen varsinaisten oireiden ilmaantumista(229–231).

Liikehäiriöoireisilla FTLD-potilailla on suomalaisessa tutkimuksessa kuvattu myös aivorungon surkastumaa(232).

Koska noin 50 %:lla bvFTD-potilaista ensimmäinen diagnoosi on psykiatrinen (useimmiten depressio ja apatia), ja viive oikeaan diagnoosiin on keskimäärin 5-6 vuotta(233), on oikeaan diagnoosiin tarvittaessa ja mahdollisuuksien mukaan pyrittävä myös PET-kuvauksella. Vuonna 2020 julkaistiin suositukset tutkimuksista, joilla bvFTD pyritään erottamaan psykiatrisista sairauksista, ja ohjeistus PET:n käytöstä sisältyy näihin. Niiden mukaan normaali FDG-PET puhuu neurodegeneratiivista sairautta vastaan, mutta painottaa, että se ei täysin poissulje FTD:iaa. Dementia-oireisilla potilailla 1 vuoden päästä kontrolloitu FDG-PET vähensi epävarmojen diagnoosien määrää 80 %:sta 34 %:iin(234).

### 6.8.3 Laboratoriotutkimukset

Tavallisimmat verikokeet ovat riittäviä ALS:n erotusdiagnostiikassa. Kreatiiniкинаasiin (CK) nousua voidaan nähdä epäsuorana markerina. Se ei ole spesifi ALS:lle, vaan kertoo lihastuhosta. Aktiivurheilijoilla normaalin CK-tason yläraja saattaa olla kaksinkertainen liikuntaa harrastamattomiin verrattuna, ja tasot voivat pysyä kohonneina useita päiviä suorituksen jälkeen(235). Hitaasti etenevää ALS:ia sairastavilla CK-taso voi olla myös korkeampi kuin nopeasti etenevillä(236).

Aivo-selkäydinnesteen (CSF) kokonaisproteiinitaso on koholla 20-50 %:lla ALS-potilaista(237). Tämäkään ei ole spesifi löydös. Lähinnä kehitysvaiheessa on laaja joukko CSF:n proteomiikkaan ja mahdollisiin biomarkkereihin kohdistuvia tutkimuksia(238–240).

### 6.8.4 Biomarkkerit

Biomarkkerit voidaan jakaa neljään päätyyppiin: diagnostiset, prognostiset, prediktiviset ja farmakodynaamiset. Diagnostiikan tarkentamisen ja hoidon tuloksellisuuden seuraamiseksi tarvittaisiin luotettavia biomarkkereita.

Lääketutkimuksissa on aiemmin jouduttu turvautumaan kliinisiin mittareihin kuten eloonjäämiseen ja suorituskyvyn laskun arvioihin esimerkiksi ALSFRS-R-mittarilla. Nämä puolestaan eivät ole hyödynnettävissä oireettomilla henkilöillä, jotka ollessaan ALS:iin kytkeytyvän mutaation kantajia olisivat ideaaleja lääketutkimuksiin osallistujia, koska tauti alkaa ennen näkyviä oireita.

Paljon odotuksia on ladattu mitattavissa oleviin mutatoituneiden proteiinien pitoisuuksiin CSF:ssa. *SOD1<sup>H46R</sup>*-rotilla on osoitettu kohonneita CSF:n SOD1-proteiinitasoja (*SOD1p.D91A* 1,1-kertainen, *SOD1p.V148G* 30-kertainen), ja kertaluontoisesti intraventrikulaarisesti annostetuilla ASO:illa tehdyissä hoitokokeissa on tasoissa raportoitu 80–63 %:n laskua(241). Samassa tutkimuksessa mitattiin CSF:n SOD1-proteiinitasoja muutamilla eri *SOD1*-mutaatioita kantavilla ihmisillä, ja tuloksiksi saatiin vaihtelevia tasoja. Potilasmäärät olivat hyvin pieniä (1–5 potilasta/mutaatio). Yksilöimättömiä *SOD1*-mutaatiota kantavilla ALS-potilailla toteutetussa faasi I-II RCT:ssa voitiin osoittaa 2 %:n lasku CSF:n SOD1-tasossa 85 päivän kohdalla, kun tutkimuslääkkeenä annosteltiin intratekaalisesti ASO toferseenia (BIIB067) 12 viikkoa kestäneessä hoitajaksossa. Tutkimukseen osallistui 48 potilasta. (242). Kuitenkin faasi III jatkotutkimuksessa (VALOR study, NCT02623699) toferseenista ei voitu osoittaa oleva tilastollisesti merkitsevää hyötyä päätetapahtuman ollessa ALSFRS-R-asteikolla mitattu suorituskyvyn laskun erotus hoitoryhmän ja lumeryhmän välillä (<https://www.clinicaltrialsarena.com/comment/als-biogen-tofersen-fails-trial/>).

Neuropsykologisia biomarkkereita ovat testit, jotka mittaavat verbalisia ja toiminnanohjaukseen liittyviä kykyjä. Toiminnanohjauksella tarkoitetaan psyykkisiä prosesseja, joiden avulla yksilö pystyy toimimaan päämääräsuuntautuneesti tilanteen vaatimusten mukaisesti.

Kuvantavista tutkimuksista on kirjoitettu edellä diagnostiikka -osassa.

Neurofysiologisia biomarkkereita ovat transkraniaalisen magneettistimulaation (TMS) kynnsarvot, jotka kuvastavat UMN-vaurion astetta. LMN-tasolla motoristen yksikköjen lukuarvio (MUNE), motoristen yksikköjen indeksi (MUNIX), sähköinen impedanssimyografia (EIM) ja aksonien eksitatorista astetta mittaavat tekniikat ovat kehittyneet(243). Ne kuitenkin vastaavat vain osittain biomarkkereiden laatuvaatimuksiin. Niillä on vahvempi asema erotusdiagnostiikassa, ja niiden koordinoitumpaa käyttöä on myös ehdotettu keinoksi vähentää kliinisiin lääketutkimuksiin rekrytoitavien määrää(244).

Hyvä biomarkkeri osoittaisi myös hoidon kohteen ja farmakodynaamisen vasteen. Toistaiseksi lähimpänä näitä kriteerejä ovat neurofilamentit (kevytketjuinen NfL ja

fosforyloitu raskasketjuinen pNfH(245). Neurofilamentit ovat hermosolujen rakenneproteiineja, jotka tukevat solua, sen viejähaarakkeita ja hermoliitoksia. Soluvauriossa näitä rakenteita pääsee solun ulkopuolelle ja edelleen vereen ja aivo-selkäydinnesteeseen (CSF), joista niitä voidaan mitata.

Kohonneita veren NfL-tasoja on mitattu useissa hermoston sairauksissa ja aivovammojen yhteydessä. Tasojen on todettu nousevan iän myötä ja jyrkemmin 60-ikävuodesta ylöspäin(246). Perifeeristen neuropatioiden osalta on raportoitu korkeampia NfL-tasoja plasmassa kuin CSF:ssa(247). Myös erilaiset tulehdusta kuvaavat kemokiinit ja sytokiinit nousevat eri sairauksissa. Näiden ja neurofilamenttien vertailut veressä ja CSF:ssa eivät toistaiseksi vaikuta mielekkäiltä ALS:n erotusdiagnostiikassa, koska erot on mahdollista osoittaa vähemmän työläillä menetelmillä(248).

ALS:n eri muodoissa on havaittu erilaisia neurofilamenttitasoja, esimerkiksi *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:ssa on todettu korkeampia seerumin(249) ja CSF:n(250) pNfH-tasoja kuin ei-kantajilla ja myös korkeampia plasman NfL-tasoja kuin *SOD1*-mutaation kantajilla(251). *GRN* (granuliini)-mutaatiota kantavilla FTD-potilailla taas on kuvattu korkeampia NfL-tasoja kuin *C9<sup>HRE</sup>*-ALS- tai *C9<sup>HRE</sup>*-FTD-potilailla, mutta oireettomilla kantajilla tilanne oli päinvastainen(246). Tässä tutkimuksessa ALS-potilaiden NfL-tasot olivat yleisesti korkeampia kuin puhtaasti FTD:aa sairastavien tasot. On myös viitteitä siitä, että pNfH-tasotkin korreloisivat *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:n ja *C9<sup>HRE</sup>*-ALS-FTD:n etenemisen kanssa, ja että NfL-tasojen nousu olisi suurempaa *GRN*-mutaatiota kantavilla potilailla. Plasman NfL-tason on todettu olevan tilastollisesti merkitsevästi enemmän koholla *GRN*-mutaatiota kantavilla FTD-potilailla kuin *C9<sup>HRE</sup>*-FTD- tai *MAPT*-FTD -potilailla(252).

Toistaiseksi laajimmassa pitkittäisessä havainnointi- ja monikeskustutkimuksessa seerumin ja CSF:n NfL-tasot korreloivat keskenään paremmin kuin pNfH-tasot(253). Tässä tutkimuksessa NfL-tasot vaihtelivat eri ALS-potilaiden välillä, mutta pysyivät toistomittauksissa potilaskohtaisesti suhteellisen stabiileina. Toisessa vastaavassa tutkimuksessa ALS-potilaiden keskimääräisen vuotuisen NfL-tason muutoksen katsottiin olevan huomattavan hyvä taudin etenemisen ennustaja(246).

NfL-tasojen ennustavia ominaisuuksia voisi periaatteessa hyödyntää hoitotutkimuksissa. Lasten SMA:n hoidossa nusinerseenillä on saatu merkittäviä tuloksia, mutta neurofilamenttitasojen mittauksissa ei ole nähty yksiselitteisesti toistettua korrelaatiota hoitovasteeseen(254,255). Aikuisilla SMA-potilailla ei havaittu seerumin tai CSF:n neurofilamenttitasossa eroja ennen ja jälkeen nusinerseenihoidon(256).

GFAP (Glial fibrillar acidic protein) on astroglia-solun vaurion biomarkkeri. GFAP-nousua voidaan todeta *GRN*-FTD-potilaiden seerumissa, CSF:ssa ja aivojen etuosien aivokuorella. GFAP:n ei ole todettu nousevan vastaavasti *C9<sup>HRE</sup>*-FTD tai *MAPT*-FTD-potilaiden seerumissa, mutta heilläkin on korkeammat GFAP-tasot kuin terveillä verrokeilla(252). On huomattava, että GFAP-nousua nähdään myös yleisissä aivotapahtumissa kuten iskeemisissä aivoverenkiertohäiriöissä, aivovammoissa ja AD:ssa.

Poly(GP) (Gly-Pro) on DPR, jota muodostuu RAN-translaatioissa *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajilla. Poly(GP):n on todettu CSF:sta mitattuna olevan *C9<sup>HRE</sup>*-potilailla koholla tarkkuuden ollessa 100% ja herkkyuden 97% kun vertailukohteena olivat *C9<sup>HRE</sup>*-negatiiviset verrokkit(257). *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:n ja *C9<sup>HRE</sup>*-FTD:n suhteen eroa ei ollut. Samassa tutkimuksessa CSF:n NfL-tasot olivat *C9<sup>HRE</sup>*-potilailla korkeammat kuin ei-kantajilla ja assosioituivat harmaan aineen kuduskatoon ja lyhyempään taudin kestoon. NfL-tasot olivat korkeampia, jos liittämissairautena oli ALS. NfL-tasot eivät korreloineet poly(GP)-tasojen kanssa missään potilasryhmässä, eivätkä noudattaneet yksiselitteistä nousevaa tai laskevaa suuntausta pitkittäisseurattujen potilaiden osalta.

Myöskään SMAJ-potilailla ei ole havaittu NfL-tasojen muutoksia(258).

Neurofilamenttitasojen mittaukset eivät toistaiseksi muodosta kultaista standardia kliinisessä potilastyössä, ALS:n diagnostiikassa eivätkä etenemisen tai hoitovasteen arvioimisessa. Ratkaisematta on, mitkä olisivat pitoisuuksien määrittelyn tekniset standardit ja toistomittauksien mielekäs organisointi. Täyttä varmuutta ei ole myöskään siitä, mittaavatko NfL- ja pNfH-pitoisuudet samoja asioita, ja mitkä ovat viitearvot eri populaatioissa. Kliinisesti tärkeää on se, että primääristi psyykkisten sairauksien erottaminen psykoosioirein ilmenevästä *C9<sup>HRE</sup>*-taudista ei onnistu veren neurofilamenttitasojen vertailemalla. Ultraherkkien analyysimenetelmien (esim. single molecule array, SIMOA) kehittyminen ja yleistyminen tuonee uusia mahdollisuuksia mitata CNS-spesifejä proteiineja CSF:sta ja verestä(259). Tuoreen suomalaisen tutkimuksen mukaan FTLD:n erottaminen puhtaasti psykiatrisesta sairaudesta ja FTLD:n etenemisen arvio onnistuu verestä tehtävällä GFAP-mittauksella(260).

#### 6.8.5 ALS-testit ja mittarit

Pätevöidyt testit ovat hyödyllisiä esimerkiksi motoneuronitautirekisteriä perustettaessa ja rekrytoitaessa potilaita klinisiin lääketutkimuksiin. Käyttökelpoinen testi on mahdollista tehdä ilman erikoisalaosaamista kuten esimerkiksi neuropsykologista tutkimusta. Suositeltavat testit on käännetty valtakielille. Motorisen ja päivittäisen selviytymisen mittareista tärkein on ALSFRS-R-testi(261), joka on tarkoitus sisällyttää Suomessa kehitteillä olevaan motoneuronitautirekisteriin, jonka osana se voidaan integroida muihin potilastietojärjestelmiin. ALSFRS-R on nykyään kaikissa lääketutkimuksissa käytetyin toimintakyvyn mittari. Sitä voidaan kuitenkin myös arvostella: esimerkiksi tilanne, jossa kyky kirjoittaa käsin laskee normaalista tasolle, jossa kaikki sanat eivät ole luettavissa, tuottaa kahden pisteen laskun. Missä määrin tällaisen laskun hidastuminen voidaan tulkita osoitukseksi annetun hoidon tehosta, on ainakin jossain määrin kyseenalaista. Kognitiivisia, kielellisiä ja muisti- sekä käytöshäiriöitä mittaavia testejä ovat ECAS, ALSAQ- 5 ja ALSAQ-40, ALS-FTD-Q ja ALS-CBS(194). Omaiselle annettava kysymyspatteri on FTLD:ia epäiltäessä FBI-mod(262), ja se on saatavilla suomeksi.

#### 6.9 ALS:N PATOLOGISET PIIRTEET

Tavanomaisessa tarkastelussa näkyvin ilmiö on tahdonalaisen lihaksiston surkastuminen. ALS:n aivomuutokset eivät välttämättä ole makroskooppisesti tarkastellen suuria. Mikäli oirekuvassa on dementiaa, saatetaan nähdä kuduskatoa otsa- ja ohimolohkoissa. Lähemmässä ja mikroskooppisessa tarkastelussa todetaan kuduskatoa eli atrofiaa pyramidinmuotoisissa Betzin soluissa motorisella aivokuorella, aivorungon motorisissa tumakkeissa (erityisesti nucleus hypoglossuksessa), motorisissa radoissa ja selkäytimen etusarven soluissa. Lateraalisissa kortikospinaaliradoissa voidaan nähdä kalpeutta ja atrofiaa, samoin anteriorisissa hermojuurissa. Lisäksi nähdään gliosia, joka on seurausta mikrogliaan ja astrosyyttien aktivoitumisesta. Etusarven solukato ulottuu kaikkiin soluihin, ei pelkästään suuriin alfamotoneuroneihin(263).

Immunomikroskooppisilla menetelmillä tuhoutuviissa motoneuroneissa nähdään lisääntyvässä määrin solulimaan paikantuvia kertymiä eli inklusioita, jotka koostuvat eri tavoin värjäytyvistä proteiinisaostumista(263). Erityisesti aivorungon ja selkäytimen alemmissa motoneuroneissa nähdään ubikitoituneita inklusioita, jotka muodostuvat lankamaisista (engl. filamentous), vyyhtimäisistä (engl. skein-like) tai pyöreistä kappaleista. Näiden inklusioiden pääasiallinen rakenneosa on TDP-43-proteiini (TAR DNA-binding protein), joka on tärkeä transkriptionaalisten prosessien ja geenien ilmentymisen säätelijä(264). TDP-43-inklusioidet ovat olennaisin löydös ALS:ssa pois lukien *SOD1*- ja *FUS*-

mutaatioista johtuva ALS, mutta ne eivät ole puhtaasti ALS:lle spesifisiä, vaan niitä nähdään muissakin hermoston rappeumasairauksissa, vammaanjälkeisessä aivokudoskadossa ja normaalisti ikääntyneillä. Lisäksi ALS:lle ominaisina löydöksinä nähdään Bunina-kappaleita, jotka ovat pieniä eosinofiilisiä inklusioita. Niiden biologista merkitystä ei tunneta. Edellisten lisäksi nähdään mm. autofagisten prosessien kannalta oleellisen ubikitiiniä sitovan adaptoriproteiinin p62 (toiselta nimeltään SQSTM1 tai nukleoporiini 62) suhteen positiivisia inklusioita(265).

TDP-43 osoitettiin tärkeimmäksi ubikinoitujen inklusoiden komponentiksi vuonna 2006. TDP-43-patologiaa tavataan yli 90%:lla ALS:ia sairastaneista(266). Näin on siitä huolimatta, että TDP-43:a koodaavan *TARDBP*:n mutaatioita, joita on yli 50 erilaista, todetaan ALS:n taustalla vain harvoin. Kyseessä on siten tapahtumaketju, joka ei edellytä TDP-43-spesifistä geenivirhettä, vaan ilmentää yhteistä lopputulosta. TDP-43- proteiinopatioihin kytkeytyykin useita erilaisia geenejä(267). Normaalisti TDP-43 sukkuloi tuman ja sytoplasman välillä ja lokalisoituu myös mitokondrioihin(267). ALS:ssa TDP-43 on siirtynyt poikkeavasti sytoplasmaan ja sitä on vain vähäisesti tumassa ja hermoulokkeissa (Mackenzie B-luokka)(268).

FUS-proteiini (Fused in sarcoma protein) osoitautui vuonna 2009 merkittäväksi komponentiksi osassa niitä ALS/FTLD-potilaita, joilla tavatut inklusiot olivat TDP-43-negatiivisia. Näiden potilaiden osuudeksi kaikista familiaalisista ALS/FTLD-potilaista on arvioitu n. 5 %(269).

TDP-43:n ja FUS:n ilmentymisen vuoksi ALS-FTLD- sairausjatkumoa kutsutaan neuropatologisessa mielessä TDP-43 – FUS -proteिनopatioiden jatkumoksi(270). Poikkeusta tähän näkemykseen tulee siitä, että n. 40 % FTLD-potilaista nähdään tauopatioita (tau-proteiini), joilla ei tietävästi ole suoraa yhteyttä ALS:iin. CSF:n tau-pitoisuutta on tosin ehdotettu ALS:n biomarkeriksi, jolloin se toimii epäspesifinä hermosoluvaurion merkinä(271).

Osassa ALS:ia nähdään myös SOD1-inklusioita.

Inklusio-kappaleiden ilmeneminen ALS:ssa vaihtelee myös sen mukaan, onko kyseessä tietyn mutaation aiheuttama tauti. Esimerkiksi *SOD1*-mutaatioiden suhteen negatiivisilla ALS-potilailla hermo- ja gliasoluissa nähdään sekä ubikitiini- että TDP-43-positiivisia inklusioita, kun taas *SOD1*-mutaation kantajilla vain ubikitiini-positiivisuutta (272). Tämä viittaa siihen, että SOD1- ja myös FUS-ALS:n etiopatogeneesi on erilainen kuin muista syistä johtuvan ALS:n. Täysin ehdoton SOD1-ALS:n TDP-43-negatiivisuus ei ole, mutta raportit, joissa TDP-43-positiivisuutta on kuvattu SOD1-ALS:ssa toteavat, että se eroaa topografisessa mielessä klassisesta TDP-43-positiivisesta ALS:sta(273).

### 6.9.1 ALS-FTSD:n patologia

Ensimmäisen potilaan, jonka kliinisneuropatologisen tapauselostuksen voidaan katsoa sopivan ALS-FTSD:n taudinkuvaa, kuvasi I.S. Wechsler 1932(274).

Makroskooppisesti ALS-FTSD-potilailla nähdään vaihtelevan asteinen otsa- ja ohimolohkojen kuduskato mutta mikroskooppisesti ei tyypillisiä AD:n muutoksia. Vakuuttavimmin on dokumentoitu TDP-43:n osuus. Erityisen tunnusomaista TDP-43:n ilmeneminen on bvFTD:tä sairastaneilla. Puhtaasti ALS:ia sairastaneilla TDP-43 ilmenee ensisijaisesti selkäytimessä, puhtaasti FTLD:tä sairastaneilla aivokuorella ja ALS-FTSD:tä sairastaneilla molemmissa ja muuallakin kuten pikkuaivoissa, mikä viittaa laaja-alaiseen prosessiin(275). Lisäksi LATE-dementia (engl. Limbic-predominant Age-related TDP43-Encephalopathy) luetaan TDP-43-proteिनopatioihin. Kliinisesti LATE muistuttaa Alzheimerin tautia, mutta siinä ensimmäiset atrofiamuutokset kohdistuvat manteliumakkeeseen ja vasta myöhemmässä vaiheessa hippokampukseen(276). Alzheimerin

taudin sairastumistodennäköisyys ei kasva jatkuvasti iän myötä, kun taas jopa 20 % yli 80-vuotiaista dementikoista on arvioitu sairastavan LATE:a(277).

TDP-43-proteinopatian ilmeneminen ei ALS-FTSD:ssäkään edellytä *TARDBP*-geenivirhettä. SALS:n yhteydessä *TARDBP*-mutaatioita esiintyy 1,5 %:ssa ja FALS:n yhteydessä 3 %:ssa(278). FTD:n yhteydessä *TARDBP*-mutaatiot ovat erittäin harvinaisia.

FTLD:n alatyyppejä voidaan neuropatologisesti erotella inkluusioiden perusteella(279).

ALS:n ja ALS-FTSD:n etenevää luonnetta saattaa selittää patologisen prosessin prioninkaltainen eteneminen, mutta tämä aihe on toistaiseksi hypoteesiasteella. Sillä tarkoitetaan tilannetta, jossa saostunut ja/tai väärinlaskostunut proteiini toimii aihiona, joka muuttaa terveen proteiinin samankaltaiseen sairautta aiheuttavaan muotoon, ja prosessi etenee monistumalla solusta soluun(280). Varsinaisista prionitaudeista ehdotettu leviämistapa eroaa siinä, että leviämistä ei tapahdu yksilöiden välillä. Käytännössä tämä sopii ALS:n tapaan levitä segmentaalisesti, kuten ALS:n kliinistä kuvaa käsittelevässä osassa on kuvattu.

HRE:stä aiheutuvien sairauksien neuropatologiaa käsitellään tarkemmin *C9<sup>HRE</sup>*:tä kuvaavassa kappaleessa.

## 6.10 ALS:N HOITO

ALS:n syyperusteisista hoitokokeiluista ovat Wong ja kumppanit julkaisseet 2021 systemaattisen katsauksen, jossa on käyty läpi faasien II-III -tason rekisteröidyt RCT:t vuosilta 2008-2019(281). Haku tuotti tiedot 1152 tutkimuksesta, joista kriteerit täyttäneitä seuloutui 125. Näihin osallistui yhteensä 15 647 potilasta, ja tutkittuja lääkkeitä oli 76 erilaista. Kaikki tutkimukset eivät valmistuneet, ja osan loppuraportit eivät noudattaneet lääkeviranomaisten (FDA, EMA) raportointisäännöksiä. Katsauksessa käydään läpi ALS-lääketutkimuksen haasteita, kuten rekrytointikriteerejä erityisesti ALS-EEc-R:n osalta, biomarkkereiden puutetta ja kansallisten lupaviranomaisten käytäntöjä, jotka paljolti kirjavuutensa takia heikentävät erityisesti pienempien maiden mahdollisuuksia osallistua laajoihin monikansallisiin tutkimuksiin. Myös tutkimuspopulaation osittaminen ottamalla huomioon erityisesti *C9<sup>HRE</sup>*:n mukanaolo tai poissulku tuodaan katsauksessa esiin. Toinen ajankohtainen katsaus vuodelta 2022 tuo esiin mm. sen, että ALS-lääketutkimusten päätetapahtumat ja *ad hoc*-analyysien tulokset ovat päättäjillekin haastavia, koska uusien lääkkeiden tarve on kiistaton, mutta toisaalta tiedetään, että viimeksi käyttöön tulleet uudetkaan lääkkeet eivät pysäytä ALS:ia(282). Tilanne on sama muiden hermostoa rappeuttavien lääkkeiden kehitysvaikeuksien kanssa.

Käytännössä ALS:n hoito on oireperusteista niin kauan kuin vaikuttavaa syyperusteista hoitoa ei tunneta. ALS-potilaan oireenmukaisesta näyttöön perustuvasta hoidosta (Cochrane database) on julkaistu 2017 asiantuntijatyöryhmän suositus, joka on vapaasti saatavilla(283). Suomessa ALS-potilaan hoidosta on julkaistu 2018 Terveysportissa HUS-piirin neurologisesta käytännöstä palliatiivisen hoidon kautta aina saattohoitoon ulottuva hoitoketjuohjeistus (<https://www.terveysportti.fi/apps/dtk/ltk/article/shp01259?toc=256484>). Oireperusteisia hoitoja ei käsitellä tässä yhteenvedossa.

Virallisesti ALS:n perussyyn hoitoon hyväksytyjä lääkkeitä on toistaiseksi kolme, joista yksi EU:ssa. Kaikkien tarkka vaikutusmekanismi on osin hypoteettinen.

### 6.10.1 Rilutsoli

Rilutsoli kehitettiin ja tuli markkinoille ensimmäisenä ALS-lääkkeenä 1996(284,285). Se tunnetaan glutamaatin antagonistina ja sillä on antikonvulsivisia ominaisuuksia. Rilutsolin ajatellaan vähentävän eksitatorisen välittäjäaine glutamaatin määrää motoneuronien synapsesissa 3–4 eri tavalla, ja lisäksi vähentävän vapaiden happiradikaalien eli ROS:n (engl.



reactive oxygen species) ilmaantumista(286). Rilutsolin vaikutusten ajatellaan vähentävän glutamaattireptorien liiallista kalsiumvirtausta motoneuroneissa ja gliasoluissa. Liiallinen kalsiumvirtaus puolestaan johtaa lipidien peroksidaatioon, mitokondrioiden hajoamiseen ja RNA- sekä DNA-vaurioihin(287).

On kuitenkin mahdollista, että rilutsolin hyöty välittyy jotakin muuta kautta kuin pelkkänä glutamaatin vastavaikuttajana. Tämän puolesta puhuu mm. se, että mitkään muut ALS:n hoitoon toistaiseksi kokeillut antiglutaminergista vaikutusta tuottavat lääkkeet kuten keftriaksoni, memantiini ja talampaneeli eivät ole osoittautuneet hyödyllisiksi(288–290).

Rilutsolin on osoitettu hidastavan ALS:ia keskimäärin kolme kuukautta, kun päätemuuttujana on kuolema(291), joskin näyttöä on siitä, että hidastuma voi olla pitempikin(292). Yhdessä tutkimuksessa on raportoitu tulos, jonka mukaan rilutsolilla saavutettu elinajan lisäys sijoittuisi taudin viimeiseen neljännekseen(293). Tähän tulokseen on syytä suhtautua hyvin alustavana, sillä tätä vaihetta pidentävät myös ei-lääkkeelliset hoidot kuten PEG-letku ja mekaaninen ventilaatiotuki, eikä rilutsolin tehoa ALS:n ensimmäisessä neljänneksessä ole tutkittu. Rilutsoli ei auta ALS:n oireisiin. Rilutsolia käytettäessä sillä, onko potilaalla SALS vai FALS ei ole merkitystä(294). Käytännössä kaikissa nykyään tehtävissä RCT:ssa rilutsolin käyttö on sallittu tutkimuslääkkeen ohella.

## 6.10.2 Edaravoni

Edaravoni on toinen virallisesti hyväksytty ALS-lääke. Se hyväksyttiin Japanissa 2015, ja 2022 mennessä 9 maassa, ei kuitenkaan EU:ssa. Edaravoni on antioksidantti ja ROS:n poistaja(295). Aiemmin se on annosteltu laskimonisäisesti monimutkaisissa 14 vrk:n sykleissä, mutta myös suun kautta otettava muoto on nykyään saatavilla. Edaravonin hyöty on osoitettu ensin suhteellisen pienissä tutkimuksissa, ja se on havaittu noin 30 % vähäisempänä toimintakyvyn laskuna ALSFRS-R-asteikolla mitattuna 48 viikon hoitajaksojen aikana(296). Hyöty osoitettiin varsin rajatulla potilasryhmällä, ja rilutsolin käyttö oli sallittu. Kaikissa tutkimuksissa merkitsevää positiivista tulosta ei ole saatu toistettua(297). Edaravonin käyttöä on suositettu rajoitettavaksi potilaille, joiden tauti on kestänyt alle 2 vuotta, ja joiden keuhkojen vitaalikapasiteetti (FVC) on pudonnut korkeintaan 80 %:iin normaaliarvoista ja joiden toimintakyky on vähintään 2 pistettä kaikilla ALSFRS-R:n asteikolla arvioituna(298).

Edaravonia ei ole helmikuuhun 2023 mennessä virallisesti hyväksytty käyttöön EU:ssa. Useat tutkijat ja ALS-potilaita hoitavat lääkärit eri maista (mukaan lukien Suomi) julkaisivat 2017 konsensuslausuman, jonka mukaan edaravonia ei tulisi ilman parempaa näyttöä ja kustannusvaikuttavuutta ottaa käyttöön EU:ssa(299). Tämän jälkeen valmistaja veti myyntilupakemuksensa EU:ssa takaisin. USA:ssa FDA hyväksyi laskimoon annosteltavan valmisteen 5.5.2017 ja suun kautta otettavan 12.5.2022. Suun kautta otettavan valmisteen indikaatiot ja näyttö vastaavat toistaiseksi käytettävissä olevan tiedon perusteella laskimon kautta annostellun hoidon indikaatioita ja hoitotuloksia. Myös annostusprotokolla on sama. Varsinainen näyttö perustuu japanilaisilla potilailla (137 edaravoni/134 lume) tehtyyn 6 kuukauden kestoiseen RCT:hen(300). Edaravonin yleisimmät sivuvaikutukset olivat mustelmataipumus (15%), kävelyepävarmuus (13%) ja päänsärky (10%).

ClinicalTrials.gov- sivuston (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>) mukaan tätä yhteenvetoa kirjoitettaessa 7 eri käynnissä olevaa tutkimusta selvitti edaravonin soveltuvuutta ALS-lääkkeeksi.

### 6.10.3 Natriumfenyylibutyaatti + taurursodioli (NaPB + TUDCA).

Yhdistelmä on USA:ssa kolmas ja Kanadassa tietyin ehdoin virallisesti hyväksytty ALS-lääke. Hyväksyminen perustui faasi 2-tason CENTAUR-tutkimukseen (NCT03127514) ja sen osin avoimiin jatkoanalyysiin.

Hyväksymismenettely USA:ssa saatiin päätökseen 2022. Se oli poikkeuksellisen monivaiheinen, ja perustui FDA:n neuvoo-antavan komitean muuttuneisiin äänestyksiin. Euroopassa on tätä kirjoitettaessa (2022) TRICALS-konsortion toimesta käynnissä faasi 3 tutkimus nimeltä PHOENIX (NCT05021536). TRICALS on 48 tutkimuskeskuksen ja 16 Euroopan maan muodostama konsortio, johon Pohjoismaista kuuluvat Ruotsi, Norja ja Tanska kukin 2 kansallisella keskuksella.

NaPB on Suomessa virallisesti hyväksytty ammoniakkaa sitova suun kautta otettava lääke, jonka käyttöaihe on virtsa-ainekierron entsyymien häiriön hoito. Butyraatit ovat suolen mikrobiomin ravinnon kuiduista tuottamia yhdisteitä. Butyraateilla on osoitettu ainakin 3 eri mekanismia, joilla ne voisivat jarruttaa solutuhoa: histonien asetylaation hillitseminen, neuroinflammaation vähentäminen ja solujen energia-aineenvaihdunnan parantaminen(301). TUDCA on erään sappihapon tauriinijohdannainen, jota on erityisen paljon karhujen sapessa. Sen katsotaan vaikuttavan suotuisasti apoptoosiin, neuroinflammaation ja oksidatiivisen stressin vähentymisen kautta. Lisäksi TUDCA:n on osoitettu toimivan kaitsijaproteiinina eli kaperonina ja vaikuttavan proteiinien laskostumiseen. Näyttöä on saatu *SOD1*<sup>G93</sup>-hiirillä ja vastaavilla ihmisen viljellyillä motoneuroneilla tehdyissä tutkimuksissa(302).

CENTAUR:issa NaPB+TUDCA:aa sai 89 potilasta ja lumelääkettä 48 potilasta. 77% sai joko rilutsolia tai edaravonia ja 28% kumpaakin. Seuranta-aika oli 24 kuukautta, ja NaPB+TUDCA:aa saaneiden toimintakyky hidastui ALSFRS-R-asteikolla mitattuna 0,42 pistettä kuukaudessa vähemmän kuin lumelääkettä saaneilla(303). Tässä tutkimuksessa muissa päätetapahtumissa ei havaittu merkitsevää eroa.

Jatkotutkimuksissa CENTAUR:in aineistosta on julkaistu useampia NaPB+TUDCA:n tehoa koskevia tutkimuksia, joissa on verrattu avoimessa vaiheessa jatkaneiden potilaiden (98 potilasta) päätetapahtumia(304–306). Näissä potilaat jaettiin 4 eri ryhmään ja pisin seuranta-aika oli 35 kuukautta. Toissijaisten päätetapahtumien pidentymä oli 4,8 kuukautta ja ajan ennen mekaaniseen hengitykseen turvautumista pidentymä 7,3 kuukautta NaPB+TUDCA:aa saaneilla lumelääkkeeseen verrattuna. Hoitoaieanalyysissä (intention-to-treat) NaPB+TUDCA:aa CENTAUR-tutkimuksen alusta saaneet elivät 6,5 kuukautta kauemmin kuin lumelääkettä saaneet.

NaPB+TUDCA:n leisimmät sivuvaikutukset ( $\geq 5\%$  verrattuna lumeeseen) olivat vatsakivut, ripuli, pahoinvointi ja ylähengitystieinfektiot.

### 6.10.4 Antisense-oligonukleotidit (ASO:t)

SMA:n hoidossa ASO:illa saavutetut edistysaskeleet (ensimmäisenä nusinerseeni vuonna 2016) (307,308) ovat herättäneet ajatuksen, että geenivirheisiin kohdistetut hoidot voisivat olla räätälöity ratkaisu ainakin kausaalista geenivirhettä kantaville ALS-potilaille. ASO:t ovat räätälöityjä 8-50 emäsparin mittaisia nukleotidijaksoja, joilla pyritään pääsääntöisesti vaimentamaan virheellisesti toimivien geenien tuotteiden vaikutuksia(309). Useita hoitokeiluita on tätä kirjoitettaessa tehty, ja monia on paraikaa käynnissä(310), mutta kliiniseen käyttöön ne eivät toistaiseksi ole edenneet. Suurin mielenkiinto kohdistuu *SOD1* (erityisesti *SOD1*p.A5V)-mutaatioiden ja *C9*<sup>HRE</sup>:n kantajiin, mutta myös *ATXN2*-, ja *FUS*-mutaatioiden kantajiin(309). Pisimmälle kehityspotkussa on edennyt *SOD1*-mutaatioista johtuvan ALS:in hoitoon tarkoitettu toferseeni (BIIB067), joka vähensi CSF:n *SOD1*- ja

plasman NfL-pitoisuuksia, mutta ei parantanut kliinisiä päätetapahtumia ja aiheutti keskushermostoon suoraan annosteltuna sivuvaikutuksia(311).

Geeniterapia voi tarkoittaa ASO:jen lisäksi hoitokokeiluja RNA-interferenssillä, CRISPR:lla (ns. ”geenisakset”, engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats), adenovirusvektoreilla ja vasta-aineilla. Näitä ei erikseen käsitellä tässä yhteenvedossa. On todennäköistä, että aiemmissa RCT:issa tuloksia on peittyneet osittamattomien hoitokohorttien laajaan geneettiseen vaihteluun. Tällaisesta on saatu viitteitä esimerkiksi *UNC13A*:n osalta, kun meta-analyysissä on pystytty osoittamaan, että *UNC13A*-homotsygotit kantajat hyötyivät litium-hoidosta(312).

#### 6.10.5 Muut tutkimusasteella olevat hoidot

Tutkimusasteella olevia hoitoja on satoja. Kehityspuutuksessa lähimpänä myyntilupahakemusta ovat tätä kirjoitettaessa (2022) metyylikobalamiini, masitinibi ja toferseeni. Päivitetyt tiedot ovat systemaattisimmin saatavilla osoitteessa <https://www.clinicaltrials.gov/>. Tuore laaja neurofarmakologinen katsaus tähänastisista hoitokokeiluista on julkaistu 2020(295). Lyhyt suomenkielinen katsaus on julkaistu Lihastautiliitto ry:n Porras-lehdessä 4/2022.

#### 6.10.6 Lääketutkimus Suomessa

Suomessa on toteutettu ja tälläkin hetkellä on käynnissä joitakin pieniä ALS-hoitokokeiluja. Suurin on toistaiseksi ollut Orion Oyj:n 2018–19 tekemä faasi III:n RCT nimeltä REFALS (NCT03505021). Tämän RCT:n tutkimuslääkkeenä oli levosimendaani, ja rilutsolin käyttö sallittiin. Levosimendaani hyväksyttiin vuonna 2000 indikaatiolla äkillisesti pahentunut vaikea kroonisen sydämen vajaatoiminta ja sen lyhytkestoinen hoito silloin, kun tavanomainen hoito ei riitä, tai mikäli inotrooppinen tuki katsotaan tarpeelliseksi. Levosimendaani lisää supistuvien proteiinien kalsiumherkkyttä sitoutumalla kalsiumista riippuvaisesti troponiini C:hen. Lisäksi levosimendaani avaa ATP:stä riippuvaisia kaliumkanavia verisuonten sileässä lihaksessa. Vaikutukset summautuvat sydänlihaksen toiminnan parantumisena. Levosimendaanin on todettu parantavan myös pallean toimintaa, mikä johti faasi II-tason RCT:hen 66 ALS-potilaalla (LEVALS, NCT02487407). Tätä tutkimusta seurasi REFALS-tutkimus, johon osallistui 496 potilasta 104 tutkimuskeskuksesta USA:ssa, Kanadassa, EU:ssa ja Australiassa. Pää tavoitteena oli osoittaa suun kautta annostellun levosimendaanin ja lumelääkkeen vaikutuksessa tilastollisesti merkitsevä ero makuuasennossa mitatulla hitaalla vitaalikapasiteetilla (SVC) arvioituna hoito- ja verrokkiryhmän välillä 12 hoitoviikon kohdalla. Toissijainen tavoite oli osoittaa ryhmässä ero ALSFRS-R-asteikolla mitattuna 48 viikon kohdalla. Tutkimus ei saavuttanut toivottuja tavoitteitaan(313).

#### 6.11 ALS:N GENETIIKKA

##### 6.11.1 Perheittäin esiintyvä eli Familiaalinen ALS (FALS)

Ensimmäisen viittauksen FALS:iin teki F. Aran 1848. Vuonna 1873 Charcot totesi, että ALS ei koskaan ole perinnöllinen, ja lisäksi hän käytti tätä ominaisuutta erottamaan ALS:n SMA-taudeista. Sir William Osler kuvasi USA:n Vermontista vuonna 1880 suvun, joka 113 vuotta myöhemmin oli yksi niistä, joiden kohdalla osoitettiin kytkentä kromosomiin 21 ja löydettiin ensimmäiset *SOD1*-mutaatiot. Geenitekniikan kehitys on sittemmin johtanut lähes 200 mutaation liittämisen ALS:iin, mutta läheskään kaikkien ei ole osoitettu olevan varmuudella

yksin kausatiivisia eli aiheuttavan tautia. Yleisimmät ALS:ia aiheuttavat geenivirheet on todennäköisesti jo löydetty. Tässä yhteenvedossa niitä käsitellään erikseen jäljempänä.

Vuonna 1955 Kurland ja Mulder arvioivat että n. 10 %:n ALS-potilaista voitiin katsoa sairastavan FALS:ia. Tietämyksen lisääntyessä käsite FALS on muuttunut epämääräisemmäksi. Olettaen, että elämänaikainen riski sairastua ALS:iin on noin 1:400(314) väestöstä riippuen, on mahdollista, että samaan sukuun osuu useampia sairastuneita sattumalta. Tämän yhteenvedon kirjoittajan tiedossa on perhe, jossa neljästä kahdessa sukupolvessa ALS:ia sairastavista henkilöistä vain kaksi oli geneettisesti (veri)sukulaisia.

Elämänaikainen riski sairastua FTLD:hen on huomommin ymmärretty, mutta sen on arvioitu olevan samaa luokkaa kuin ALS:n, mahdollisesti kuitenkin suurempi(315).

Jos yksilön vakioitu riski kuolla ALS:iin ja sisarusparven koko tunnetaan, on mahdollista laskea todennäköisyys sille, että sisarusparveen ilmaantuu toinen sairas sattumalta. Jos monilapsisia perheitä on paljon, voi kahden sporadisen potilastapauksen osuminen sukuun sattumalta lisätä FALS-perheiksi kirjattujen määrää(316). Kolme tai useampia viittaa jo vahvemmin geneettiseen syytekijään.

Irlantilaisessa väestöpohjaisessa tutkimuksessa vuodelta 2019 kuolleisuuden suhteen vakioitu elämänaikainen riski sairastua ALS:iin odotetun elinajan aikana oli 1,8:1000 miehillä ja 1,5:1000 naisilla(314). ALS:ia sairastavan ensimmäisen asteen sukulaisella tilanteessa, jossa geenivirhettä ei suvusta löytynyt, oli 1,4 %:n riski sairastua, kun riski koko populaatiossa oli 0,3 %. Toisessa tutkimuksessa, joka käsitti SALS-potilaita sairastumisriskiksi saatiin 0,5% sisarukselle ja 1,0 % jälkeläiselle, mutta kyseessä ei ollut elinaikaan suhteutettu arvio, vaan tutkimus oli vakioimaton(317). Kirjoittajat ilmaisevat ALS-potilaan sisaruksen todennäköisyyden välttää ALS:lta putoavan 85 ikävuoteen mennessä 99,7 %:sta 97,6 %:iin. Kliinisessä työssä tällaisia lukuja ei pidä tulkita suoraan yksilön syntymähetkellä vallitseviksi tai tulevaisuutta kuvaaviksi riskeiksi.

Tällaiset arviot jättävät huomioimatta sen mahdollisuuden, että sairaus voi olla yhden tai useamman ympäristötekijän aiheuttama tai myötävaikuttama. Mitään yksiselitteistä ympäristötekijää ei ole toistaiseksi osoitettu, vaikka vähäisiä viitteitä on saatu useistakin(318). Ympäristötekijä(t) voivat vaikuttaa samaan perheeseen aiheuttaen näennäistä perheittäin esiintyvyyttä.

Yksiselitteisesti perinnöllisten tautien kohdalla tapauksen määritelmä ei yleensä ole ongelma, ja sukupuut ovat informatiivisia. Jaakko Ignatiuksen tutkiessa SMA-tauteja Suomessa kirkonkirjojen läpikäynti jopa yli viidenteen sukupolveen antoi tietoa periytymismekanismista ja sukulaisuussuhteista(319). ALS sen sijaan on ensisijaisesti satunnaisena (sporadinen) ilmenevä sairaus, ja toistaiseksi tuntematon määrä kausatiivisiä mutaatioita esiintyy oligogeenisinä eli useamman mutaation yhdistelminä(320–322) tai *de novo*-mutaatioina(323–325).

GWAS-tietoa hyödyntämällä voidaan osoittaa mahdollisia sukulaisuussuhteita genomitekniiikan keinoin. Sukulaisuussuhteita voidaan tarkistaa myös kirkonkirjoista, jotka on digitoitu. Sen sijaan kuolinsyiden selvittäminen on sitä epämääräisempää mitä kauemmas ajassa mennään taaksepäin. Taudinkuvaa selvitellessä perheiden sisäiset vertailut ovat kuitenkin tärkeitä, ja tällöin vanhoistakin sairauskertomusmerkinnöistä on hyötyä.

Vuonna 2009 annettiin uusi sosiaali- ja terveysministeriön asetus potilasasiakirjoista, joka koskee paitsi sähköisiä potilasasiakirjoja, myös perinteisiä potilasasiakirjoja. Suomessa noudatettavat potilasasiakirjojen säilytystä koskevat säännökset mahdollistavat niiden tuhoamisen, pääsääntöisesti kun on kulunut 12 vuotta potilaan kuolemasta. Pysyvästi säilytettäviä potilasasiakirjoja ovat perinnöllisyyslääketieteellisten yksiköiden tutkimuksissa ja hoidoissa muodostuvat asiakirjat, ja 18. ja 28. päivinä syntyneiden potilasasiakirjat julkisessa terveydenhuollossa. Ennen 1.5.1999 laaditut tai saadut potilasasiakirjat ja ennen

1.5.1999 kuolleita koskevat potilasasiakirjat kunnallisessa ja yksityisessä sekä vankeinhoitolaitoksen terveydenhuollossa kuuluvat pysyvästi säilytettäviin siltä osin kuin valtionarkiston 14.4.1989 antaman kunnallisten asiakirjojen hävittämistä koskevan päätöksen ja valtionarkiston/arkistolaitoksen mahdollisten erillisten päätösten perusteella säilytysajoista säädetään. Puolustusvoimien terveydenhuollon asiakirjojen pysyvästä säilytyksestä säättää arkistolaitos erikseen. Terveydenhuollon toimintayksiköt voivat säilyttää potilasasiakirjoja myös mikrofilmimuodossa. Toimivin tapa selvittää saatavuus tieteelliseen tutkimukseen on ottaa yhteyttä yksikön sairauskertomusarkistoon. Tämä kuitenkin edellyttää, että tutkimusluvut ovat kunnossa.

Vuosina 2012 ja 2017 julkaistiin kaksi tutkimusta, jotka käsitelivät FALS:n määritelmää eri maiden neurologien näkökulmista. Kummassakin todettiin, että yleistettävää, yhteismitallista ja käyttökelpoista näkemystä ei ole voitu muodostaa (326,327). Erityisesti I-II astetta kaukaisempi ALS:ia sairastava sukulainen vie käsitteet harmaalle alueelle.

Tekijöitä, jotka vaikuttavat siihen, voidaanko potilastapaus katsoa familiaaliseksi eli perheittäin esiintyväksi vai ei, ovat monisyiset. Puuttuva tieto johtaa todennäköisemmin siihen, että potilas luokitellaan sporadiseksi eli satunnaiseksi:

1. Tieto aiempien sukupolvien terveydentilasta puuttuu
2. Epätäydellinen vanhemmuushistoria
3. ALS:n taudinkuva on erilainen eri perheenjäsenissä (ALS vs. FTSD)
4. Väistyvä periytyminen
5. Potilas on sukunsa ensimmäinen sairastunut, eikä tietoa myöhemmin sairastuneista ole
6. Väärät diagnoosit
7. Perheenjäsenet kuolleet nuorina muista syistä
8. Jälkeläisen sairastuminen ALS:iin ennen vanhempaansa
9. Geenivirheen alentunut penetranssi eli läpäisevyys ja pieni perhekkoko
10. Oligogeenisyys, eli useamman geenin yhteisvaikutus tarvitaan sairauden puhkeamiseksi
11. *De novo*-mutaatio
12. Psykologiset kieltämisreaktiot
13. Diagnoosin ylikorostus sukulaisille

FALS:n määrittelyn ongelmaa on pyritty ratkaisemaan eri tavoin. Yksi tapa on nimetä ALS geneettiseksi silloin, kun suvussa on osoitettu tautia aiheuttava geenivirhe. Tämä ei edellytä sitä, että potilaan vanhemmalta geenivirhe löytyy, sillä se on voinut syntyä vanhemman sukusoluissa tai sairastuneen sikiönmuodostuksen aikana, jolloin kyse on *de novo*-mutaatiosta. Täyttää varmuutta siitä, että sairaus periytyy vanhemmalta ei myöskään ole, koska mutaatioiden penetranssi vaihtelee.

SALS:n ja FALS:n erottaminen toisistaan ei onnistu myöskään sairauden kliinisen kuvan perusteella. Kaikki harvinaiset ei-motoriset lisäpiirteet on raportoitu niin SALS- kuin FALS-potilaillekin. On osoitettu, että FALS:iin sairastutaan keskimäärin hieman nuorempina kuin SALS:iin, mutta yksittäisen potilaan kohdalla tästä ei ole apua. Samoin jokainen FALS:n kohdalla raportoitu geenivirhe on löydetty myös SALS-potilaalta. Toistojaksomutaatio *C9<sup>HRE</sup>* on erityisen ongelmallinen kyvyssään aiheuttaa ALS:ia, FTLD:ta ja näiden yhdistelmää.

ALS:n perinnöllistä olemusta käsittelevissä tutkimuksissa on ongelmaa pyritty lähestymään myös laskennallisen heritabiliteetin kautta. Heritabiliteetilla tarkoitetaan periytyvyyttä, eli perimän osuutta tutkittavan ilmiön kannalta, toisin sanoen sitä variaation osuutta, joka laskennallisesti johtuu perimästä. Tavanomaisin tapa on ollut vertailla saman ja erimunaisten kaksosten riskiä sairastua. Tässä ongelmana on ollut ALS:n harvinaisuudesta johtuva

vähäinen kaksosten määrä, ja taudin puhkeaminen myöhemmällä iällä. Toimivampia tapoja on arvioida vanhempi - lapsi -pareja, tai populaatiotasolla SNP-perusteista tietoa. Kaksostutkimuksissa ALS:n heritabiliteetiksi on saatu arvioita 38 % ja 85 % välillä(328,329). Vanhempi-lapsi-pareihin, eli tilanteeseen, jossa molemmat ovat sairastuneet ALS:iin, arviot heritabiliteetista vaihtelevat välillä 40 % - 60 %(330). SNP-esiintymiin pohjatuissa tutkimuksissa heritabiliteetti on raportoitu pienemmäksi, ollen luokkaa 7,2% - 9,5 %(331,332). Viimeksi mainittujen lukujen alhaisuus johtunee pääosin siitä, että harvinaisten varianttien merkitys korostuu, kun yksittäiset SNP:t eivät ylitä genomien laajuista merkitsevyyttä(333). Lisäksi somaattisten eli hankinnallisten mutaatioiden osuudella voi olla vaikutusta. Somaattisella mutaatiolla tarkoitetaan mutaatiota, joka ei ole periytyvä, vaan on syntynyt yksilönkehityksen myöhemmässä vaiheessa. ALS:ssa tautia aiheuttavan mutaation tulisi syntyä jo sikiöaikana, jotta se esiintyisi riittävän laajasti hermoston soluissa. Mikäli mutaatio on tapahtunut elintehityksen alkuvaiheessa ns. neuroektodermisissä, voi se vaikuttaa vain hermokudoksessa, mutta ei näy veren soluissa, joista SNP-perusteiset tutkimukset käytännössä tehdään(334).

Heritabiliteetti on väestökohtainen suure. Arvioitaessa ALS:n heritabiliteettia väestöpohjaisessa tutkimuksessa todettiin, että geneettiset tekijät vastaavat noin 50 %:sta siitä vaihtelusta, joka ilmenee yleisessä riskissä sairastua ALS:iin, ja noin 40 %:sta populaatiossa, jossa ei ole osoitettavissa tunnettuja mutaatioita(314). Tutkimuksessa poissuljetut geenivirheet olivat geneeissä *C9ORF72*, *TARDBP*, *FUS*, *SOD1* ja *SQSTM1*.

Kyseisessä tutkimuksessa oli 1117 irlantilaista ALS:ia sairastavaa vuosilta 2008–2017. Tutkimuksessa äiti - tytär -parien heritabiliteetti oli korkein 66 %, ja kirjoittajat toteavat, että *C9<sup>HRE</sup>*:llä on tässä merkittävä osuus, koska vain *FUS*-mutaatio todettiin kahdella potilaalla ja muita vain yhdellä kutakin. *C9<sup>HRE</sup>* todettiin 69/674 potilaalla. Eräissä toistojaksomutaatio-sairauksissa vanhemman sukupuolen on todettu vaikuttavan jälkeläisen taudinkuvaan. Esimerkiksi HD:ssa CAG-toistojaksojen määrän kasvun on todettu välittyvän etupäässä isän kautta(112). Tyyppin 1 MD:ssa CTG-toistojaksot taas välittyvät todennäköisemmin äidin kautta.

Vuonna 2012 julkaistiin ehdotus FALS:n kriteereiksi(316):

Varma FALS:

- |             |                                                                                                          |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Historia:   | ALS-potilas, jolla on vähintään kaksi I tai II-asteen sukulaista, joilla on ALS.                         |
| Genetiikka: | ALS-potilas, jolla on vähintään yksi sukulainen, jolla on ALS ja sitä aiheuttava geenivirhe periytyneenä |

Todennäköinen FALS

- |           |                                                                      |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| Historia: | ALS-potilas, jolla on yksi I- tai II-asteen sukulainen, jolla on ALS |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|

Mahdollinen FALS

- |                    |                                                                                               |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Historia:          | ALS-potilas, jolla I- tai II-astetta kaukaisemmalla sukulaisella on ALS                       |
| Genetiikka:        | SALS-potilas, jolla negatiivinen sukuhistoria, mutta FALS:ia aiheuttava geenivirhe on todettu |
| Neurodegeneraatio: | ALS-potilas, jonka sukulaisella on todettu FTLD                                               |

## 6.11.2 Geneettinen epidemiologia

ALS:n esiintyvyyttä kuvaavat tutkimustulokset eivät yksin kykene ratkaisemaan taudin etiopatogeneesiä. Tämän vuoksi yhä suurempi mielenkiinto kohdistuu ALS:iin kytkeytyvien mutaatioihin ja niiden esiintymiin. Mutaatioita tunnetaan tällä hetkellä noin 40 (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>).

Karkealla tasolla eurooppalaisperäisessä väestössä yleisimmät ovat *C9<sup>HRE</sup>* (~30 %), *SOD1* (~20 %), *FUS* (<5 %) ja *TARDBP* (<5 %). Aasiassa yleisin mutaatio on *SOD1* ja Etelä-Amerikassa *VAPB*. Lisäksi tunnetaan yli 30 kausaalista mutaatiota, joiden kunkin esiintymä on luokkaa <1 %. Seuraavassa käsitellään tarkemmin yleisimpien mutaatioiden epidemiologiaa.

Zou ja kumppanit julkaisivat 2017 systemaattisen katsauksen ja meta-analyysin(335), jossa tutkittiin neljän yleisimmän mutaation (*C9<sup>HRE</sup>*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*) esiintymää käymällä läpi yli 6000 erillisjulkaisua (111 valittiin lopulliseen analyysiin). Eurooppalaisperäisessä väestössä yleisimmät olivat *C9<sup>HRE</sup>* (FALS 33,7 %, SALS 5,1 %), *SOD1* (FALS 14,8 %, SALS 1,2 %), *TARDBP* (FALS 4,2 %, SALS 0,8 %) ja *FUS* (FALS 2,8 %, SALS 0,3 %). Tutkittujen neljän mutaation todettiin yhdessä selittävän 55 % FALS-tapauksista eurooppalaisissa populaatioissa. Aasialaisilla FALS-potilailla yleisimmin löytyvät mutaatiot ovat *SOD1* (30 %), *FUS* (6,4 %), *C9<sup>HRE</sup>* (2,3 %) ja *TARDBP* (1,5 %).

Suomessa Mentula ja kumppanit tutkivat 44 suomalaisen SALS-potilaan ja 6 FALS-potilaan kohortin, eikä *TARDBP*-mutaatiota löytynyt yhdeltäkään(336). Tautispesifistä *TARDBP*-mutaatiota ei löytynyt myöskään suomalaisissa FTLD-aineistoissa(337,338). Runsaan 300 suomalaisen ALS-potilaan koko perimän sekvensoinnissa ei löytynyt yhtään aiemmin kuvattua ALS-mutaatiota *TARDBP* tai *FUS* geneeistä. Yksittäiset mutaatiot löytyivät kummastakin geenistä kahdelta eri ALS potilaalta. Näitä mutaatioita ei löydy GnomAD tietokannasta (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) viitaten siihen, että ne ovat hyvin harvinaisia ja potentiaalisesti patogeenisiä (julkaisematon havainto). Näiden alustavien tulosten perusteella *TARDBP* ja *FUS*-mutaatiot vaikuttavat olevan harvinaisia Suomessa.

Brown ja kumppanit julkaisivat 2021 systemaattisen katsauksen ja meta-analyysin, jossa arvioitiin ALS:n esiintymää ja ilmaantuvuutta yleensä sekä erikseen *C9<sup>HRE</sup>*- ja *SOD1*-mutaatioiden osalta(339). Siinä käytiin läpi yli 3000 erillisjulkaisua (78 valittiin lopulliseen analyysiin). Tilannetta arvioitiin 22 maassa Euroopassa, Pohjois-Amerikassa, Latinalaisessa Amerikassa ja Aasiassa. Sairastavien määräksi arvioitiin vuonna 2020 noin 121 000 ja vuosittain sairastuvien määräksi noin 41 000. Näistä *SOD1*-kantajien määräksi arvioitiin noin 3000, joista 47 % oli FALS- ja 53 % SALS-tapauksia. Vastaavasti sairaita *C9<sup>HRE</sup>*-kantajia oli noin 4600, joista 26 % oli FALS- ja 74 % SALS-tapauksia. Tämän analyysin perusteella valtaosa potilaista, joilla on *SOD1*- tai *C9<sup>HRE</sup>*-mutaatio, luokittelevat sporadisiksi osoittaen edellä kuvatun SALS/FALS-jaottelun ongelmallisuuden. Jos yhdestä maasta ei ollut useampia tutkimuksia, tutkijat käyttivät laajempaa alueellista arviota. Osa maakohtaisista aineistoista oli myös pieniä.

Pienet tutkimukset eivät voi kattavasti edustaa edes yhtä maata tai aluetta, jos sellaisiksi valitaan suuret maat kuten USA, Venäjä, Kiina tai Intia. Tuloksia voidaan pitää riittävänä osoittamaan, että ALS:n geneettinen tausta vaihtelee mantereittain merkittävästi, ja että ne kallistavat tulkintoja siihen suuntaan, että ainakin yleisimpien geenien osalta perustajamutaatioiden on ollut mahdollista syntyä toisistaan riippumatta eri aikoina ja eri paikoissa(340–342). Kuten ALS:n epidemiologiassa aina, mutaatioiheyksienkin lukuihin vaikuttaa se, onko kohortti koottu väestöpohjaisesti vai jonkin hoitoyksikön tapauksista. Jälkimmäinen otantatapa löytää nuorempia tapauksia(158). On myös näyttöä siitä, että vertailevissa tutkimuksissa kontrolleiksi valikoituu koulutetumpaa väestöä(343), millä voi olla merkitystä, jos tutkitaan myös kokonaisriskiin vaikuttavia ympäristötekijöitä.

Merkittävä tekijä on ALS:n oligogeenisyys, millä tarkoitetaan muutaman eri geenimuutoksen yhdessä aiheuttamaa sairautta. Zoun 2017 meta-analyysissä kaksi neljästä valtamutaatiosta esiintyi samanaikaisesti 0,4 %:ssa FALS-potilaita, mikä oli merkitsevästi enemmän ( $p= 1,57 \times 10^{-7}$ ) kuin mitä olisi odotettavissa sattuman kautta. Useimmin kyseessä oli tilanne, jossa *TARDBP*-, *FUS*- tai *SOD1*-mutaatio esiintyi yhdessä *C9<sup>HRE</sup>*:n kanssa(335).

Lisäksi kokonaisuuden tulkintaan vaikuttaa se, että varhaisemmat valtamutaatioihin keskittyneet tutkimukset eivät tavoita harvinaisempien varianttien osuutta. Näitä tutkittiin laajassa GWAS-tutkimuksessa 2021(344). Tutkimus käsitti yli 29 000 ALS-potilaan ja 122 000 kontrollin aineiston. Vahvimmat assosiaatiot saatiin seuraaviin: *SOD1p.D91A*, *KIF5A* ja *CFAP410* (aiemmin merkitty *C21ORF2*). *CFAP410*:n kausaalisuutta kirjoittajat pitivät epävarmempina, mutta sen tiedetään vaikuttavan *NEK1*:n kautta, joka on toinen ALS-geeni(345). Yleisen ja harvinaisen variantin yhteisvaikutusta nähtiin *NEK1*:n lisäksi ja *TBK1*:ssä. Syyperusteiset virheet geneeissä *UNC13A* ja *C9<sup>HRE</sup>* kytkeytyvät samanaikaisesti esiintyessään sekä ALS:iin, FTLD:iaan että ALS-FTLD-kompleksiin(346).

Myös epigeneettisten tekijöiden osuudessa on selvittävää ALS:n etiopatogeneesissä. Epigeneetiikalla tarkoitetaan tutkimusta, joka kohdistuu sellaisiin geenien toimintaa sääteleviin tekijöihin, jotka eivät muuta DNA-sekvenssiä. Epigeneettiset prosessit voivat vaihdella eri yksilöissä ja eri solulinjoissa eri aikoina. Tärkeimpiä epigeneettisiä mekanismeja ovat DNA:n metylaatio, histonien muokkaus ja ei-koodaavan mikro-RNA:n aiheuttamat muutokset. Toistaiseksi eniten on tutkittu kahta ensiksi mainittua(347).

### 6.11.3 ALS-mutaatiot

ALS:n taustalla olevien mutaatioiden penetranssi vaihtelee ja mutaatioita löytyy usein myös sporadisilta potilailta. Somaattisten mutaatioiden osuuden arviointi on hankalaa niin kauan kun tutkimuksia ei tehdä useammasta eri kudoksesta.

Ensimmäinen ALS:iin kytkeytyvä geenivirhe *SOD1* löydettiin 1993. Seuraava *TARDBP* löytyi 2008, ja siitä seuraava *FUS* 2009. Vuosina 2010-11 löytyivät *C9<sup>HRE</sup>*, *OPTN*, *VCP* ja *UBQLN2*. *VCP* oli merkittävä siinä mielessä, että se oli aiemmin yhdistetty IBM-Paget'n tauti-kompleksiin ja FTD:aan(348). Näin onnistuttiin avaamaan yhteistä geneettistä linkkiä ALS:n ja FTLD:n välille, ja yhteys voimistui *C9<sup>HRE</sup>*:n löytymisen myötä.

Seuraavaksi käsitellään tarkemmin kahta suomalaisittain tärkeintä ALS:ia aiheuttavaa mutaatiota *SOD1* ja *C9<sup>HRE</sup>*. Näiden jälkeen käsitellään lyhyesti muita ALS:iin kytkeytyviä mutaatioita, joiden osuus suomalaisessa väestössä joko ei ole tiedossa tai on muiden väestöjen tapaan korkeintaan muutaman prosentin luokkaa.

#### 6.11.3.1 SOD1

**SOD1** [Superoksididismutaasi-1(Cu-Zn), SOD1, kromosomi 21, OMIM147450] Ihmisillä ja nisäkkäillä ilmenee kolmea SOD:n muotoa. *SOD1* -geenissä on 5 eksonia ja se koodaa 154 aminohapon proteiinia. *SOD1* on 1990-luvulta alkaen eniten tutkittu ALS:iin kytkeytyvä geeni(349). Tutkimusmateriaalina on ollut kattava arsenaali hiivoista kädellisiin(350). Eniten tutkimuksia on tehty jyrsiöillä. Siirtogeenisiä hiirikantoja on useita, ja eniten tutkittu on *SOD1<sup>G93A</sup>*. Spontaani ja väistävasti periytyvä hiiren motoneuronisairaus tunnetaan jo 1950-luvulta, ja kaksi erilaista mutaatiota on löydetty(351). Koirilla, joiden kanssa ihmisen SOD1 on 79 % samanlainen, tunnetaan kaksi spontaania *SOD1*-mutaatiota(352,353), jotka aiheuttavat ALS:n kaltaisen taudin, kuitenkin yleensä vasta homotsygotissa muodossa.



## Proteiini

SOD1 on yksi kolmesta isoentsyymistä. SOD1 katalysoi superoksidiradikaalien hapettumista ja pelkistymistä vetyperoksidiksi ja hapeksi. SOD1 on tärkeä antioksidantti, ja sitä esiintyy lähes kaikissa elimistön soluissa, erityisesti maksassa ja hermostossa. Arviolta 1 % solun proteiineista on SOD1:tä. Se esiintyy pääosin sytoplasmassa, mutta myös mitokondrioissa ja vesikkeleissä. Siihen sitoutuu yksi kupari- ja yksi sinkki-ioni(354). Oksidatiivinen stressi, mitokondrioiden virheellinen toiminta, proteiinien aggregaatio ja aksonikuljetuksen säätelyn häiriöt ovat kaikki olleet tarjolla mekanismeiksi SOD1:een liittyvien sairauksien oletetuissa etiopatogeneeseissä(354). Varhaisemmat tutkimukset painottuivat entsyymäattisen toiminnan muutosten selvittämiseen, uudempien tulokset tukevat hypoteesejä proteiinin laskostumisongelmista ja prionin kaltaisesta leviämisestä(355). Yksi mekanismi ei sulje toista pois.

Ns. knock out- eli poistogeeniset hiiret eivät kehitä ALS:n kaltaista taudinkuvaa, joskin ne herkistyvät eri tavoin aiheutetuille motoneuronivaurioille. Ylimääräisen normaalin *SOD1*:n (*wtSOD1*) on osoitettu aiheuttavan tautia siirtogeenisissä *SOD1<sup>G85R</sup>*-hiirissä ja ihmisperäisen laskostuneen SOD1:n (selkäydinhomogenaatti, *A4V*-mutaatio) injisoiminen hiiriin tuotti niin ikään merkittävät patologiset löydökset, mitä ei tapahtunut sporadista ALS:ia sairastavista potilaista peräisin olevilla kudoksilla(356). Ihmisperäisen kudoksen luovuttajat olivat *SOD1*- ja *C9<sup>HRE</sup>*- negatiivisia sekä Alzheimerin tautia ja muita neurologisia sairauksia sairastavia. Hiirimallien yksi ongelma on se, että ihmisellä olennaisesti ALS:iin kytkeytyvää aivokuoren motoneuronien katoa ei juurikaan nähdä siirtogeenisillä SOD1-hiirillä(357). Kolmenkymmenen vuoden aikana tehdyistä noin 4000 tutkimuksesta huolimatta SOD1:n poikkeavaa toimintaa ALS:ssa ei tunneta tarpeeksi.

## Geenivirheet

Vuonna 1993 löydettiin 11 erilaista *SOD1*-pistemutaatiota 13 perhettä käsittäneessä kytkentäanalyyysissä(358). Sittemmin eri mutaatioita on löytynyt tästä 5 eksonista koostuvasta ja 154 aminohappoa koodaavasta geenistä noin 220 (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>). Noin neljänneksellä näistä on varmennettu kausaliteetti eli ne aiheuttavat ALS:a. Tämä on osoitettu joko laajoissa sukupuissa, tilastollisepidemiologisen näytön avulla tai siirtogeenisillä jyrksijöillä. Osa mutaatioista muuttaa SOD1:n rakennetta ja osa sen entsyymäattista aktiivisuutta.

*SOD1*-mutaatioiden aiheuttamat taudinkuvat vaihtelevat erittäin paljon hyvin nopeasta taudista (*A4V*, *G41S*, *H43R*, *L84V*, *L84V*, *G85R*, *N86S*) erittäin hitaaseen (*G41D*, *H46R*, *D91A*, *G93C*, *L117V*, *L144F*).

Mutaatiot periytyvät harvoja poikkeuksia lukuun ottamatta autosomeissa vallitsevasti. Esimerkkinä Pohjois-Amerikassa vallitsevin (n. 50 % kaikista ALS-SOD1-tapauksista) on mutaatio p.A5V (voidaan merkitä myös A4V käyttäen aiempaa numerointia), joka aiheuttaa rajun raaja-alkuisen alle 2 vuodessa tappavan taudin. Sen taustalla arvellaan olevan kaksi perustajamutaatiota, toinen on peräisin Amerikan natiivikansoilta ja toinen eurooppalaisilta tulokkailta. p.A5V:n iäksi on arvioitu 400-500 vuotta(359).

## *SOD1*p.D91A

Maailmanlaajuisesti ja Euroopassa yleisin mutaatio on p.D91A (voidaan merkitä myös D90A, käyttäen aiempaa numerointia, tietokanta SNP tunnus rs80265967), joka aiheuttaa taudinkuvaltaan kaikista *SOD1*-mutaatioista yhteneväisimmän ja väistyvästi periytyvän ALS:n. Tämä tarkoittaa sitä, että molemmilta vanhemmiltaan geenivirheen p.D91A perinyt sairastuu. *SOD1*p.D91A on löydetty ALS-potilailta joskus heterotsygoottisena. Tällöin taustalla on todennäköisesti jokin muukin syy tai muu mutaatio lisäksi. D91A-kantajafrekvenssi on Suomessa noin 1-2 %. *SOD1*p.D91A on kuvattu heterotsygoottisena osana ALS:n oligogeenista kokonaisuutta(322). Kirjallisuudessa esiintyy raportteja, joissa

*SOD1p.D91A* nimetään kausaaliseksi heterotsygoottisessa muodossaan(360). Oligogeenisyyttä ei tällaisissa tapauksissa kuitenkaan ole pystytty poissulkemaan. *SOD1p.D91A*-mutaation taustalla on katsottu olevan muiden *SOD1*-mutaatioiden tapaan useampiakin perustajamutaatioita, ja niiden iästä on esitetty arvioita 20 000 ja 1500 vuoden välille(361).

*SOD1p.D91A*:n esiintymä ei Euroopassakaan ole tasainen, vaan vaihtelee suuresti ollen Pohjoismaissa 50-kertainen muuhun Eurooppaan verrattuna(361). Jo Puolassa p.D91A on harvinainen. Pohjoismaissa sen kantajafrekvenssi vaihtelee alueesta riippuen 0,5–5 %. Korkeimpia tunnuslukuja esiintyy Ruotsin Norbottenissa ja Suomen Länsi-Lapissa ja erityisesti Torniojokilaaksossa (2,5%)(361). Noin 1 %:n keskimääräisen kantajafrekvenssin perusteella Suomessa olisi noin 50 000 heterotsygoottia *SOD1p.D91A*:n kantajaa.

Varhaisemmat spekulatiot ehdottivat p.D91A:n haplotyyppiin liittyväksi jonkinlaisen suojaavan tekijän, joka aiheuttaisi hitaasti etenevän taudinkuvan, mutta tällaista ei koko *SOD1*:n kattavissa sekvennoinneissa ole löytynyt(362). Sen sijaan on kuvattu klassinen TDP-43-patologia *SOD1p.D91A*:n suhteen heterotsygootilla bulbaarialkuisella ALS-potilaalla, mikä viittaa vahvasti siihen, että varsinainen taudinaiheuttaja on jokin muu tekijä, ja heterotsygootti *SOD1p.D91A* on sivulöydös(363). Laajempi tutkimus heterotsygoottisen *SOD1p.D91A*:n esiintymästä Pohjoismaissa on suunnitteilla.

*SOD1p.D91A*-ALS:n homotsygoottina aiheuttama tauti on vakuuttavasti dokumentoitu. Siitä huolimatta se esiintyy ClinVar-tietopankissa määreellä, joka ilmoittaa sen taudinaiheuttamiskyvyn olevan tulkinnanvarainen (engl. conflicting interpretations of pathogenity). Toiset tietopankit kuten ClinGen ja GenVar ilmoittavat asian oikein, eli sen aiheuttavan tautia homotsygoottisessa muodossaan tai heterotsygoottisena toisen riskitekijän kanssa. Tällöin ”toinen riskitekijä” on taudin varsinainen aiheuttaja, sillä *SOD1p.D91A*:n heterotsygotiaan liittyvä absoluuttinen riski on varsin pieni.

Homotsygootin p.D91A-mutaation aiheuttama tauti on hyvin tyypillinen, aina alaraaja-alkuinen ja kulultaan hidask: potilaat elävät km. 14 vuotta, ja yli 30 vuotta kestäneitä muotoja tunnetaan, myös Suomessa. Toisaalta variaatiotakin on: sairastumisiän on raportoitu vaihtelevan 20 ja 94 ikävuoden välillä. Pääsääntöisesti *SOD1p.D91A*-potilaat ovat sairastuessaan km. 10 vuotta nuorempia kuin klassiseen ALS:iin sairastuvat. Alle 20-vuotiaanakaan sairastuminen ei ole mahdotonta. *SOD1p.D91A*:n taudinkuvaan kuuluu ns. prepareettinen vaihe, jossa potilas voi kokea mm. selkä- ja alaraajojen kipuja, alaraajojen puutumista ja kömpelyyttä. Tämän vaiheen keston on raportoitu vaihtelevan kuukausista seitsemään vuoteen, ja sinä aikana varsinaisia kliinisiä neurologisia poikkeavuuksia ei välttämättä löydy. Kipujakso vie klinikon ajatukset usein muuhun suuntaan kuin ALS:iin. Hieman myöhemmin ilmaantuu lihasheikkoutta, faskikulaatioita, alaraajaheijasteiden heikentymistä samaan aikaan kun yläaraajojen heijasteet vilkastuvat. Babinskin merkki muuttuu useimmiten positiiviseksi sairauden alussa. Dysartria kehittyy keskimäärin 6 vuodessa. *SOD1p.D91A*-potilailla on osoitettu olevan myös sensorisia poikkeavuuksia ja virtsaamisen vaikeuksia, mutta ei sen sijaan merkittäviä kognitiivisia muutoksia. Osalla potilaista sensorimotorisia oireita saattoi olla jopa kolmen vuoden ajalta ennen diagnoosia, ja tänä aikana ENMG-tutkimuksissa ei voitu osoittaa poikkeavaa.

Hitaudesta ja alkuvaiheen epätyypillisistä oireista johtuen p.D91A-homotsygoottisen mutaation tunnistaminen on alussa kliinisesti vaikeaa. Andersenin ja kumppaneiden työssä löydettiin 30 FALS/*SOD1p.D91A*- ja 6 SALS/*SOD1p.D91A*-potilaan lisäksi seitsemän p.D91A:n suhteen homotsygoottia henkilöä, joilla ei ollut ALS:n oireita. Heidän ikänsä vaihteli 54 ja 68 vuoden välillä. Osalla heistä oli prepareettista vaihetta muistuttavia lieviä oireita, mutta heidän myöhemmistä vaiheistaan ei ole julkaistua tietoa(364).

Tunnusomaista *SOD1*-mutaatioille on se, että niiden aiheuttaman ALS:n oirekuvan kirjo on erittäin laaja, ja että ne yleensä eivät aiheuta kognitiivista tasonlaskua. Kuitenkin yksittäisiä

dementoituvia *SOD1*-ALS-potilaita on kuvattu, mukaan lukien samanaikainen FTLD (365).

#### *SOD1*p.A90V

Oligogeenisen vaikutuksen tyypistä mekanismeja ehdotettiin taustasyiksi suomalaisessa 454:n potilaan tutkimuksessa, joka käsitteli *SOD1*p.A90V-potilaita (rs1280042397), eli kolmanneksi (1,5%) yleisintä Suomessa esiintyvää ja ALS:iin heterotsygoottisena assosioituvaa mutaatiota(366). Tämä mutaatio ei kuitenkaan yksinään riittänyt aiheuttamaan ALS:ia. Tutkimuksessa arvioitiin, että p.A90V-mutaation myötävaikuttajina voisivat toimia potilailta löydetty useat muut mutaatiot, jotka muokkaavat taudin penetranssia. Yhdellä potilaalla esiintyi toisessa alleelissa p.D91A ja toisessa p.A90V (ns. yhdistelmäheterotsygotia, engl. compound heterozygosity). *SOD1*p.A90V kuvautui raaja-alkuisena ja hitaahkona (kesto 7 - 25+ vuotta) tautina, johon liittyi usein lieviä sensorisia poikkeavuuksia. Neuropatologisessa tutkimuksessa ei ollut TDP-43-patologiaa kuten ei yleensäkaan *SOD1*-mutaatioissa sopien siihen, että mutaatio p.A90V oli tutkitulla potilaalla keskeinen tautityypin määrittäjä. Kaikki 8 potilasta olivat sporadisia, mutta tulokset viittasivat yhteiseen perustajamutaatioon.

#### Neuropatologia

*SOD1*-ALS:ssa vauriot ovat LMN-painotteisia. Niissä voidaan nähdä myös Lewy-kappaleiden kaltaisia muutoksia. Immunohistokemiallista värjäytymistä todetaan *SOD1*:lle, ubikitiinille, fNf:lle ja erilaisille kaitsijaproteiineille, mutta ei TDP-43:lle tai FUS:lle. Alfa-synukleiiniä on osoitettu kolokalisoituneena *SOD1*:n kanssa(367). TDP-43-negatiivisuus koskee myös suomalaisille tyypillisiä mutaatioita *SOD1*p.D91A ja *SOD1*p.A90V.

*SOD1*-p.D91A:n homotsygoottisessa muodossa on todettu inhibitoristen ratojen suhteellinen säästyminen, mikä saattaa olla yksi syy tavanomaista ALS:ia hitaammalle etenemiselle(368).

#### Penetranssi

*SOD1*-mutaatioiden suuri määrä tuottaa laajan kirjon eri tavoin penetroituvia mutaatioita. *SOD1*p.D91A-mutaation penetranssia on arvioitu suhteellisen korkeaksi(369). Lopullista käsitystä asiasta ei kuitenkaan ole. *De novo*-mutaatioita on myös kuvattu(370). Tutkimuksessa pystyttiin sekvensoimaan biologisten vanhempien genomi.

#### Antisipaatio

Antisipaatiota on kuvattu useissa *SOD1*-FALS perheissä(371), joskaan toisten mutaatioiden vaikutusta ei aina ole täysin voitu sulkea pois. On mahdollista, että taustalla vaikuttavat muut geneettiset, epigeneettiset ja/tai ympäristöperäiset syyt. ALS-antisipaatiotutkimusten on myös esitetty kärsivän palautuminen keskiarvoa kohti (engl. regression toward the mean) -ilmiöstä(372).

### 6.11.3.2 C9ORF72

#### Geeni

**C9ORF72** [(engl. chromosome 9 open reading frame 72, alias DENN Protein regulating RAB-GTPase, guanine nucleotide exchange factor, OMIM614260)]. Geeni on vahvasti konservoitunut kädellisillä, ihmisen, simpanssin ja rhesusapinan välillä ortologia eli samankaltaisuus on 99,58 %. Tämä viittaa tärkeään biologiseen funktioon. Hiirellä ja rotallakin geenin ortologia ihmisen suhteen on yli 98 %, sekä seepikalalla 75,97 %. Eleganssimadolla se on vähäinen (14,7 %), eikä banaanikärpäsellä katsota olevan sitä

ollenkaan(373). Hiirimalleja on kehitetty toistakymmentä, joista osa ei mallinna ALS:ia tai FTLD:ta lainkaan. HRE-toistojaksoja on osoitettu vain ihmisellä, simpanssilla ja gorillalla. *C9ORF72* sisältää 2 ei-koodaavaa eksonia (1a ja 1b) sekä 10 koodaavaa eksonia. Se ilmentyy vähintään kolmena transkriptiovarianttina, joista variantit 2 ja 3 koodaavat identtiset 481 aminohapon ketjut (valtamuoto proteiinista), ja variantti 1 proteiiniin, jossa on 222 aminohappoa.

### Proteiini

*C9ORF72* on kaikissa kudoksissa ilmenevä proteiini, joka soluissa paikantuu erityisesti tumaan ja solulimaan. Sitä on erityisesti aivokuorella ja motoneuroneissa etenkin tumassa, perinukleaarissa kalvostossa, endosomi/lysosomi-rakenteissa ja presynaptisissa hermopääteissä. Lisäksi sitä on runsaasti immuunijärjestelmän soluissa. Sen tarkka funktio elimistössä ei ole tiedossa, mutta sen on osoitettu myötävaikuttavan mm. niiden proteiinien kanssa, jotka liittyvät ainakin nukleosyttoplasmiseen kuljetukseen, RNA:n prosessointiin, membraanittomien soluelinten muodostukseen, translaatioon ja ubikitiiniin liittyvään proteiinien metaboliaan sekä autofagiaan ja immuunijärjestelmän aktivaatioon(373). *C9ORF72*:n puutos (poistogeeninen hiiri) aiheuttaa hiirillä laaja-alaisen fataalin autoimmuunitaudin(374).

*C9<sup>HRE</sup>*:n löytymisen aikoihin *C9ORF72*:n funktioista ei tiedetty käytännössä mitään.

### Haplotyyppi

Haplotyyppi on yhtenä blokkina periytyvä polymorfisten alueiden joukko genomissa. Vuonna 2000 osoitettiin ALS:n ja FTLD:n geneettinen yhteys kytkentäanalyysillä(375). Vuonna 2006 yhteys tarkentui (376–379). Alkuun tutkimuksiin oli käytettävissä vain kaksi monijäsenistä perhettä Alankomaista ja Skandinaviasta. Sitten yhteys tarkentui lisää ALS:n osalta 2009 ja 2010(380,381) ja FTLD:n osalta 2010(382). Näissä tutkimuksissa genomien alue, jossa yhteinen tekijä sijaitsi, kaventui 7,1 Mb:iin.

Ensimmäinen tämän yhteenvedon osatyö (I) rajasi kromosomissa 9 sijaitsevan ALS:n ja FTLD:n kannalta olennaisen alueen assosiaation 42 SNP:n ja 232 kb:n kokoiseen haplotyyppiin (Finnish risk haplotype), joka nosti ALS:in ja FTLD:n riskin 20-kertaiseksi(109). Tämä 42-SNP:n haplotyyppi pystyttiin tiivistämään 20-SNP:n 140 kb:n haplotyyppiin (342). 20-SNP:n haplotyyppi on yleinen Pohjois-Eurooppalaisessa väestössä(342). Se assosioituu heikommin UK- ja USA-peräisessä väestössä, jonkin verran irlantilaisessa, eikä ollenkaan italialaisperäisessä. Myös tätä 20-SNP:n haplotyyppiä on kirjallisuudessa kutsuttu nimellä Finnish risk haplotype. Suomalaisessa väestössä on sittemmin kuvattu useita ALS/FTLD:hen assosioituvia haplotyyppijä(147), joiden yhteys esimerkiksi UK-peräiseen väestöön on vähäisempi. Monikansallisessa tutkimuksessa, jossa selvitettiin 82-SNP:n haplotyyppiä, sen todettiin olevan yleisin CEPH -peräisessä (ranskalaisten ja utahilaisten monilapsisten perheiden DNA-kokoelmat) aineistossa, toiseksi yleisin se oli englantilais-skotlantilaisperäisessä ja toskanalaisperäisessä aineistossa(341). Tässäkin tutkimuksessa huomattavasti alemmat esiintymät todettiin aasialaisperäisessä ja afrikkalaisperäisessä väestössä.

ALS:iin kytkeytyvän haplotyyppin jatkotutkimuksissa vuonna 2011 osoitettiin kahdessa yhtä aikaa julkaistussa artikkelissa *C9ORF72*-geenin ei-koodaavalla alueella esiintyvän toistojaksopidentymän GGGGCC ( $G_4C_2$ , hexanucleotide repeat expansion, *C9<sup>HRE</sup>*) kytkeytyminen ALS:iin(383,384). Toinen tutkimus on tämän yhteenvedon osatyö (II). *C9<sup>HRE</sup>*:n on todettu kytkeytyvän erittäin voimakkaasti Finnish risk -haplotyyppiin myös eurooppalaisessa FTLD-potilasaineistossa(385).

Puhuttaessa Finnish risk-haplotyypistä ja sen esiintymästä muissa väestöissä on ymmärrettävä, että ei ole olemassa yhtä ainutta suomalaista haplotyyppiä, vaan ALS/FTLD-tautia aiheuttavat toistojaksomutaatiot eli *C9<sup>HRE</sup>* ilmenevät osana useita kymmeniä todettuja

eri pituisia versioita Suomesta ensimmäisenä löytyneestä haplotyypistä. Niiden ilmenemistiheydet ovat erilaisia eri väestöissä. On kuitenkin merkillepantavaa, että ilmeneminen on sikäli maailmaanlaajuista, että samoja tai lähes samoja haplotyyppiä esiintyy Länsimaista Intiaan, Kiinaan ja Japaniin.

$C9^{HRE}$ :hen liittyvien haplotyyppien yksi mahdollinen ominaisuus on ns. välimuotoisten (engl. intermediate) alleelien epävakaus.  $C9^{HRE}$ -toistojakson alleelit, joissa on 2-6 toistojaksoa ovat väestössä yleisimpiä (alleelifrekvenssi noin 83 %), välimuotoisissa alleeleissa on 7-45 toistojaksoa (alleelifrekvenssi noin 17 %)(386).  $C9^{HRE}$ :ssä tapahtuu hyppäys, ja aidossa ekspansiossa on tyypillisesti satoja tai tuhansia toistojaksoja.  $C9^{HRE}$ :n taustahaplotyyppiä esiintyy myös pitempien välimuotoisten alleelien kanssa(387). On alustavaa viitettä siitä, että välimuotoiset alleelit olisivat alttiimpia tuottamaan solulinjaan patologisia määriä toistojaksoja eli ekspansioita(385). Toisaalta epävakaus on  $C9^{HRE}$ :hen itseensä liittyvä ominaisuus, sillä kehon eri soluissa ekspansion koko vaihtelee suuresti (mosaikismi)(315,388).

### Geenivirhe ( $C9^{HRE}$ )

$C9^{HRE}$  eli geenissä  $C9ORF72$  sijaitseva toistojaksumutaatio on ALS:n, FTLD:n ja ALS-FTLD:n yleisin geneettinen syy eurooppalaisperäisessä väestössä. Kiinalaisessa väestössä  $C9^{HRE}$  on selvästi harvinaisempi lukuun ottamatta Taiwania(389). Taiwanin historiaa leimaa alankomaalaisten, espanjalaisten ja portugalilaisten vaikutus etenkin 1600-luvulla. Vuonna 2021 tehdyssä WES + RP-PCR-tutkimuksessa mannerkiinalaisessa väestössä  $C9^{HRE}$  ei ole neljän yleisimmän mutaation joukossa FALS-osapopulaatiossa, mutta on yllättäen toiseksi yleisin (1,31 %) SALS-osapopulaatiossa(390). Se on myös toiseksi yleisin käytöshäiriöin ilmenevän bvFTD:n geneettinen syy HANKIINALAISessa väestössä  $MAPT$ -mutaatioiden jälkeen(391). Japanissa  $C9^{HRE}$  on harvinainen lukuun ottamatta osaa Kiin niemimaata, jossa sen esiintymäksi on saatu 20 % (3/15)(392). Tämän on katsottu selittyvän perustajamutaatiolla Mien ja Wakayaman prefektuureissa, mutta se ei yksin selitä korkeata ALS-esiintymää koko Kiin alueella, jossa esiintymän katsotaan kytkeytyvän Guam-tyyppiseen ALS:iin. Maailmanlaajuisesti arvioituna  $C9^{HRE}$  on ainoa ALS-mutaatio, jonka esiintymäksi SALS-populaatioissa on raportoitu >2 %(393).  $C9^{HRE}$ :n taustalla saattaa teoriassa olla yksikin perustajamutaatio, ja Pohjois-Euroopassa mutaation arvellaan syntyneen n. 1500 vuotta sitten(394). Viiden eurooppalaisen (UK, Ruotsi, Belgia, Alankomaat, Italia) väestön pohjalta tehdyssä tutkimuksessa niin ikään ehdotettiin perustajamutaatiota, ja sen iäksi saatiin 6300 vuotta ja 251 sukupolvea, kuitenkin toisella metodilla arvio oli 3300 vuotta ja 131 sukupolvea, ja kolmannella 12000 vuotta ja 479 sukupolvea(341). Tällaiset arviot ovat vahvasti riippuvaisia väestön lisääntymistä kuvaavista arvoista ja jonkin verran sukupolvien pituuden määrittelystä. On myös esitetty, että  $C9^{HRE}$ :n esiintymä Länsi-Euroopassa selittyisi sen leviämisenä viikinkien valloitusretkien myötä(395), mutta tästä ei ole tutkimukseen perustuvaa näyttöä. Suomessa  $C9^{HRE}$ :n esiintyminen ei suoraan korreloi viikinkivaikutukseen, sillä sen frekvenssi on suurinta Savossa ja vähäisintä Pohjanmaan rannikolla muiden länsirannikon alueiden ollessa lähellä maamme keskiarvoa(147). Toisaalta mutaation levittäminen on mahdollista hyvinkin pienen ihmisryhmän toimesta. Mahdollisia esiintymiä viikinkien idänreittien varrella ei ole tutkittu. Taiwanilaisessa tutkimuksessa  $C9^{HRE}$ :n osuus FALS-tapauksista oli 18,2 % ja SALS:sta 2,0 %: Yhteensä potilaita oli 6, ja suomalainen riskihaplotyyppi löytyi 4 potilaalta. Kirjoittajat pitivät mahdollisena mutaation saapumista saarelle 1600-luvulla alankomaalaisen hallinnon aikana(396). Kiinasta on julkaistu yksi tutkimus, jossa 2  $C9^{HRE}$ :tä kantavalla SALS-potilaalla oli suomalainen 20-SNP:n haplotyyppi, ja yhdellä ei (397). Intiasta on julkaistu tuore (2020) tutkimus, jossa 19/593 ALS:ia sairastavaa osoittautui  $C9^{HRE}$ :n kantajiksi. Näistä 15/19 oli suomalainen

haplotyyppi ja 4/19 ei(398). Ruotsalaisessa *C9<sup>HRE</sup>*- ja haplotyyppitutkimuksessa, jossa niin ikään hyödynnettiin yleisiä SNP-markkereita, tunnistettiin *C9<sup>HRE</sup>*:lle kaksi taustahaplotyyppiä, jotka erosivat kahden SNP:n osalta (rs7868845 ja rs2477518) (399). Molemmat markerit sijaitsevat alavirtaan *C9<sup>HRE</sup>*:stä ja saattavat edustaa rekombinaatiota alkuperäisessä haplotyyppissä. Kysymys perustajahaplotyyppistä on vielä avoin, ja sen selvittämiseksi tarvitaan lisää sekvensointipohjaisia tutkimuksia, jotta harvinaiset ja voimakkaammin *C9<sup>HRE</sup>*:en korreloivat variantit kuten rs139185008(147) tulevat analyysiin mukaan. On mahdollista, että *C9<sup>HRE</sup>* on syntynyt eri aikoina eri puolilla maailmaa, mutta Suomen isolaattipiirteistä johtuen rikastunut Suomeen(400).

Sama mutaatio voi syntyä itsenäisesti useamman kerran. Esimerkiksi SBMA:n aiheuttajamutaation on arvioitu syntyneen vähintään muutamia kertoja eri paikoissa ja aikoina(401). Samoin suomalaisen gelsoliini-amyloidoosin aiheuttavan *GSNp.D214N*-mutaation arvioidaan syntyneen toisistaan riippumatta suomalaisilla ja japanilaisilla potilailla(402), mutta kaikilla tutkituilla suomalaispotilailla on todettu sama haplotyyppi(342). Toisin taas on DM 1:n, Friedreichin ataksian (FRDA) ja eräiden, mutta ei kaikkien SCA-tautien kohdalla. Samassa populaatiossa voi olla sekä useita riippumattomasti syntyneitä mutaatioita, että mutaatioita, joiden taustalta löytyy perustajavaikutus. Noin 7000 vuotta sitten alkunsa saaneen perustajavaikutuksen on raportoitu löytyvän 55%:lta eurooppalaista alkuperää olevasta HD:tä sairastavien joukosta(403).

On arvioitu, että 8–26 toistojakson pituiset GC-rikkaat rakenteet edistävät mm. hairpinmuodostusta, joka haittaa DNA:n replikaatiota(404). Silmukointivirheiden tiedetään voivan vaikuttaa koko lukukehityksen virheluentaan translaatiossa.

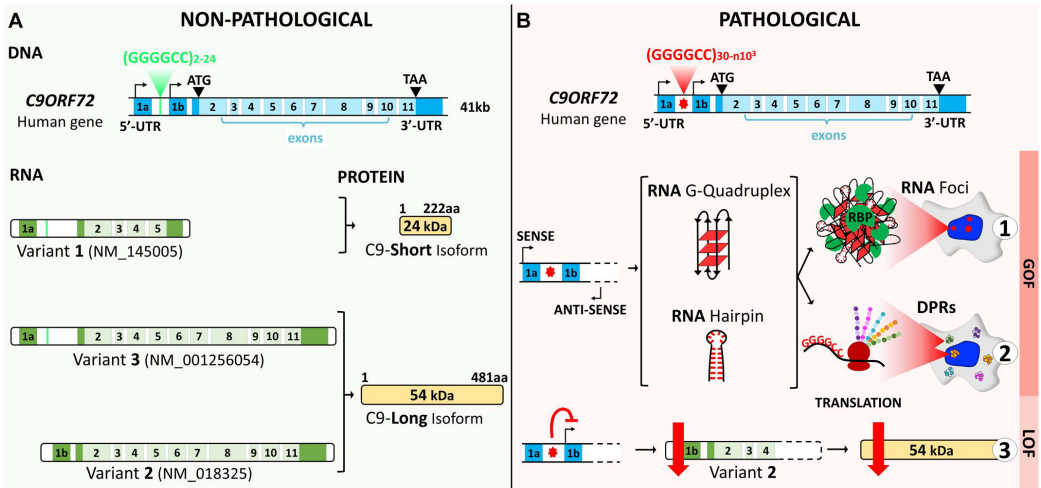
#### Vaikutusmekanismit

Normaalisti *C9ORF72*:n koodaamassa transkriptiossa syntyy vähintään 3 erilaista mRNA transkriptivarianttia (V1-V3), joista V1 tuottaa proteiinin lyhyen isoformin ja V2 sekä V3 kumpikin pitkän isoformin. Transkriptit V1 ja V3 ilmenevät erityisesti aivoissa.

Toistojaksotauteja on luokiteltu sen mukaan, sijaitseeko toistojakso esimerkiksi eksonissa, intronissa vai promoottorialueella(15). *C9<sup>HRE</sup>* sijaitsee ensimmäisessä intronissa, joka toimii myös promoottorialueena mRNA V2:n läheisyydessä. Sen haitallisen vaikutuksen ajatellaan välittyvän kolmen mekanismin kautta(405). Yksi ei poissulje toisia(406). Mekanismit eivät ole *C9<sup>HRE</sup>*:lle spesifisiä. *C9ORF72*:n osalta ne on koottu kuvaan 6.

1. Haploinsuffiensi. Termillä tarkoitetaan sitä, että sinänsä normaalisti toimivan proteiinin tuotanto on vajaata geenivirheen takia. On osoitettu, että *C9<sup>HRE</sup>* estää ainakin V2 transkriptiota, jonka promoottorialueelle *C9<sup>HRE</sup>* sijoittuu(384,407) (Kuva 6.A.). Alentuneita transkriptien määriä on raportoitu lymfosyyteissä(408), iPSCs-peräisissä hermosoluissa(409) ja ALS- sekä FTD-potilaiden kudoksissa(410). Lisäksi on raportoitu *C9<sup>HRE</sup>*-alleelin lisääntyneestä metylaatiosta(411). Poistogeenisillä seeprakaloilla on havaittu heikentynyttä aksonikasvua ja motorisia ongelmia(408). Sen sijaan poistogeenisille tai ASO:illa käsitellyille hiirille ei kehittynyt motorisia ongelmia, mutta niillä havaittiin autoimmuunio ongelmia ja alentunut elinikä(412–414). Tämän vaihtoehdon arviota vaikeuttaa se, että *C9<sup>HRE</sup>*:n toiminnot ovat tuntemattomia. On kuvattu kaksi potilasta, joilla *C9<sup>HRE</sup>* esiintyi homotsygoottina, ja heidän taudinkuvansa mahtuivat aiemmin todettujen *C9<sup>HRE</sup>*-tautien kliiniseen vaihteluväliin. Tämän, kuten myös poistogeenisten hiirten ALS-FTLD-tyyppisen oireiston puuttumisen voidaan katsoa puhuvan geenin toiminnanmenetysmekanismia vastaan.

2. RNA-vyyhtien (engl. RNA foci) muodostuminen. RNA-toksisuuteen johtavassa tapahtumaketjussa  $C9^{HRE}$ :n kaksisuuntainen transkriptio tuottaa  $C_2C_4$ - ja  $C_4C_2$ - RNA-toistojaksoja, joissa on toistuvia jaksoja guaniini-nukleotideja (G). Neljä G-jaksoa pystyy liittymään toisiinsa vetysidoksin siten, että muodostuu sekundaarirakenteita (Kuva 6.B.). Nämä ovat sekä DNA:n että RNA:n kolmiulotteiseksi laskostuneita vyyhtejä, joista käytetään nimityksiä G-quadruplex ja hairpin-rakenne, ja niitä on osoitettu muodostuvan  $C9^{HRE}$ :stä(370). Nämä yhdistyvät RNA:ta sitovien proteiinien kanssa komplekseiksi, jotka toksisina estävät sitoutuneiden proteiinien normaalia toimintaa ja mahdollisesti myöskin altistavat RAN-translaatiolle (engl. repeat associated Non-AUG translation), jossa tuotetaan poikkeavia polypeptidejä (415). G-quadruplexit sitoutuvat myös DNA:han ja osallistuvat geeniekspression säätelyyn(416). RNA-vyyhtejä on osoitettu ALS-FTD-potilaiden hermokudoksissa(417), mutta myös muissa kudoksissa kuten valkosoluissa, fibroblasteissa ja iPSC-peräisissä hermosoluissa(418).
  
3. DPR (engl. dipeptide repeat) -toksisuus puolestaan syntyy, kun riittävän pitkä  $C9^{HRE}$  mahdollistaa RAN-translaation, vaikka aloituskodoni ATG puuttuukin. Tässä prosessissa  $C9^{HRE}$  sallii transkription sense- ja anti-sense -suuntiin, mikä lopulta tuottaa viittä tyyppiä sakkautumaan taipuvaisia dipeptidi-proteiineja (DPR). Ne ovat monotonisia, sillä ne muodostuvat ainoastaan kolmesta sense-suuntaisesta kodoniparista GGG-GCC (Gly-Ala), GGG-CCG (Gly-Pro), GGC-CGG (Gly-Arg) ja niitä vastaavista antisense-kodoneista CCC-CCG (Pro-Arg), CCG-GCC (Pro-Ala), GCC-CCG (Gly-Pro), GGC-CCC(Gly-Pro). Gly-Pro-pohjaiset DPR:t voivat transkriptoitua kummastakin suunnasta. DPR-sakkaumia on todettu useissa hermokudoksissa(419–421), ja ne saattavat ilmetä tähdenmuotoisina muodostelmina hermo- ja tukisoluisissa(422). DPR-inkluusiot värjäytyvät p62-vasta-aineella (SQSTM1), kun taas TDP-43-värjäytyvyys on vaihtelevampaa(423,424), mutta myös niitä pidetään ALS:n ja FTD:n tunnusmerkkeinä(425). DPR-proteiinien toksiset vaikutukset ovat moninaiset, ja niiden on osoitettu aiheuttava motorisia ja käytöshäiriöitä myös siirtogeenisillä hiirillä, joskin tuloksissa on vaihtelua(426). DPR-toksisuuden kaltaisen prosessin tiedetään vaikuttavan MD1:ssä ja useissa SCA-sairauksissa(427).



**Kuva 6.**

C9ORF72 geenin rakenne, transkriptit ja proteiinin isoformit nomaalissa (A) ja patologisessa (B) tilassa. Normaalisessa tilassa (A) C9ORF72 lokus sisältää 2 ei-koodaavaa (1a ja 1b) eksonia ja 10 koodaavaa (2-11). Näistä syntyy vähintään 3 koodaavaa varianttia, V1, joka sisältää eksonin 1a ja eksonit 2-5, sekä variantin V2, joka sisältää eksonin 1b ja eksonit 2-11, sekä variantin V3, joka sisältää eksonin 1a ja eksonit 2-11. Näiden kolmen variantin vaihtoehtoinen silmukointi tuottaa 2 erilaista isoformia: V1 tuottaa 222-aminohapon isoformin (24kD), ja V2 ja V3 481 aminohapon isoformin (54kD).

Patologisessa tilassa (B) *C9<sup>HRE</sup>*, joka sijaitsee ei-koodaavien eksonien (1a ja 1b) välissä, aiheuttaa 3 mahdollisella mekanismilla soluvaurion: *C9<sup>HRE</sup>*:n kaksisuuntainen transkriptio tuottaa C<sub>4</sub>C<sub>2</sub> sense- ja C<sub>2</sub>C<sub>4</sub> antisense-tyyppiset laajentuneet RNA-jaksot. Nämä HRE-transkriptit muodostavat G-quadruplex- ja hairpin-rakenteita, jotka puolestaan muodostavat RNA-vyyhtejä ja kiinnittyvät RNA:ta sitoviin proteiineihin (RBP)(1). Laajentuneiden RNA-vyyhtien pohjalta käynnistyy toistojaksoihin liittyvä RAN-translaatio, mikä tuloksena syntetisoi dipeptidi- proteiinijaksoja (DPR)(2). Lopulta *C9<sup>HRE</sup>*:n läsnäolo jarruttaa transkriptiota, mikä johtaa normaalin C9ORF72:n vähentyneeseen muodostukseen (3). GOF=gain of function, LOF=loss of function.

Lähde.: Smeyers J, Banchi E-G, Latouche M: C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Front Cell. Neurosci.*, 05 May 2021 Kuvan käyttöoikeudet: Smeyers, Banchi, Latouche. Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, APHP, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, DMU Neuroscience 6, Paris. Kuvan käyttöoikeudet: Open access article.

## Neuropatologia

ALS/FTLD kuuluu TDP-43-proteinopatioihin, mutta *C9<sup>HRE</sup>*:n aiheuttamassa ALS/FTLD:ssä on ominaispiirteitäkin. Useimmat ubikitiinillä värjäytyvät inkluusiot ovat *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:ssa positiivisia p62-proteiinille mutta negatiivisia TDP-43:lle, ja tätä voidaan käyttää erotusdiagnostisena markkerina muusta syystä johtuvan ALS:n ja *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:n välillä (428,429). Toinen *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:lle tunnusomainen löydös ovat dipeptidiproteiinit (DPR), jotka ovat seurausta kaksisuuntaisesta RAN-translaatiosta (kts. edellä). Nämä paikantuvat p62- mutta eivät TDP-43-inkluusioihin. Lisäksi *C9<sup>HRE</sup>*-ALS:ssa nähdään tumissa RNA-vyyhtejä, jotka ovat tyypillisiä toistojaksotaudeille. p62-muutoksia nähdään myös ei-motorisella alueella - näitä ovat aivojen etuosan kuorikerros ja aivoturson (hippocampus) kerros CA4(430).

Täyttä konsensusta ei inkluusioiden keskinäisestä jakaumasta *C9<sup>HRE</sup>*-ALS/FTSD-tautikokonaisuudessa toistaiseksi ole. Schipper ja kumppanit julkaisivat 2016 systemaattisen katsauksen, joka perustui 261 *C9<sup>HRE</sup>*-potilaan neuropatologiseen tutkimukseen(431). Lopullisessa analyysissä oli 79 ALS-, 80 FTD- ja 80 ALS/FTD-



potilasta. Merkittävin tulos oli TDP-43-inkluusioiden vähyys (4 %) verrattuna p62- (94 %) ja DPR- (97 %) inkluusioiden esiintymään. Prosentteilla tarkoitetaan niiden potilaiden osuutta, joilla kyseinen löydös todettiin. Mustatumakkeessa TDP-43 esiintyi korkeana (95 %) ja aivotursossa esiintyi kaikkia kolmea inkluusiota. DPR-lokalisaation osalta kirjoittajat esittivät varauksia siltä osin, että koska kaupallisia DPR-vasta-aineita ei ollut saatavilla, tutkijat olivat käyttäneet itse tuottamiaan vasta-aineita, jotka eivät taanneet täyttä vertailukelpoisuutta eri raporttien välillä. Yhteenvedon kirjoittajat kuitenkin toteavat, että katsaus vahvisti aiempaa käsitystä, jonka mukaan p62- ja DPR-positiiviset inkluusiot etenkin pikkuaivoissa ovat tunnusomaisia *C9<sup>HRE</sup>*-ALS/FTSD:lle. TDP-43-inkluusioita löytyy myös lihaskudoksesta useissa myopatioissa(69).

Kokonaisuutena *C9<sup>HRE</sup>*:n kuten muidenkin tunnettujen noin viidenkymmenen(15) neurologisen toistojaksosairauden neuropatologisesta palapelistä puuttuu yhä paloja. Ei ole selvää, miksi geenivirheitten tuottamien proteiineräjähdysten määrä ja lokalisaatio eivät useinkaan korreloi kliinisiä oireita aiheuttavien keskushermoston vaurioiden lokalisaatioiden kanssa. On mahdollista, että herkäät motoneuronit kuolevat ennen havaittavien kertymien ilmaantumista, tai sitten kertymät sinänsä ovat sekundaarisia muutoksia(432).

Astrosyyttien ja gliasolujen osuutta HRE-tautien patogeneesissä on myös selvitelty(433). *C9<sup>HRE</sup>*-ALS/FTLD-potilailta eristetyissä ihon fibroblasteissa on osoitettu olevan monia proteomimisiä eroja kun niitä on verrattu valtamutaatioiden suhteen negatiivisten SALS-potilaiden fibroblasteihin(434). Siten fibroblastit (kuten indusoiduista pluripotentista kantasoluista eli iPSC-soluista muokatut hermosolut) ovat varteenotettava tapa tutkia ALS:n patognomisia tapahtumaketjuja elävältä ihmiseltä otetuilla soluilla.

## Pituus

Yli puolella ihmisistä toistojakso esiintyy kummassakin alleelissa 2 kertaa, ja yli 98 %:ssa 2-16 kertaa(387,435). Niin sanotut välimuotoiset (engl. intermediate) alleelit ovat kooltaan 7–45 toistojaksoa (alleelifrekvenssi noin 17 %). *C9<sup>HRE</sup>*-sairauksissa ekspansion pituus hyppää tyypillisesti sadoista tuhansiin.

Toistojaksojen pituudella saattaa olla merkitystä puhkeamisen riskin ja taudinkuvan kannalta. Karkeasti yleistäen toistojaksosairauksissa pitempi toistojakso merkitsee vaikeampaa taudinkuvaa, mutta *C9<sup>HRE</sup>*-ALS/FTLD:n osalta tällainen on vielä varmuudella osoittamatta(436–438). Korrelaation on raportoitu olevan positiivinen, negatiivinen tai puuttuva.

On myös huomattava, että mosaikismista johtuen toistojaksojen määrä ei ole yksilötasollakaan sama eri kudoksissa tai soluissa. On myös tuloksia, joiden mukaan toistojaksojen määrä kasvaa iän myötä ja toisaalta jopa vähenee seuraavassa sukupolvessa(436-439). Ennen kuin on käytettävissä tarkempia menetelmiä toistojaksojen määrän kuvaamiseksi, eivät arviot niiden ja taudinkuvan yhteyksistä ole yleistettävissä luotettavasti. Lyhyempien toistojaksojen osuuden on osoitettu korreloivan parempaan ennusteeseen uudella No-Amp-tekniikalla toteutetussa sekvenssointitutkimuksessa(440).

*C9ORF72*:n toistojaksojen määrä saattaa vaihdella eri etnisissä populaatioissa(441).

Esiintymät ovat Aasiassa alhaisemmat, samoin aasialaisilla on *C9<sup>HRE</sup>*:n pituus todettu väestötasolla eurooppalaisia lyhyemmäksi(441).

Ns. intermediate-toistojaksojen merkitystä on myös tutkittu. Intermediate on tällöin määritelty tutkimuksesta riippuen 7-9 ja 24-45 toistojakson välille. SLE :tä (Yleistynyt punahukka) sairastavilla on todettu verrokkeja korkeampi luku intermediate-alleleja(442). Tuoreessa raportissa todetaan, että >10 toistojakson välimuotoisiin alleleihin liittyy kohonnut riski sairastua COVID-19 -infektion vakavaan, hengityskonehoitoakin vaativaan muotoon(443). Riski sairastua ALS:iin on raportoitu meta-analysissä kohonneeksi

henkilöillä, joilla oli 24-30 toistojaksoa(444). Tätä ei voitu vahvistaa suomalaisessa tutkimuksessa; noin 1%:lla suomalaisista ALS-potilaista ja verrokeista oli vähintään 24 toistojakson välimuotoinen alleeli, jotka ovat suomalaisväestössä yleisempiä kuin muualla(386,387). Kuitenkin, jos henkilöillä oli kaksi kopiota välimuotoisia alleeleja, joista toinen oli vähintään 17 toistojaksoa pitkä, lisääntyi ALS:n riski merkittävästi. Vetosuhde (Odds ratio, OR) oli 5,3 ( $p=0,002$ ), jos pitempi alleeli oli  $\geq 17$  toistojaksoa, ja 15,2 ( $p=0,00016$ ), jos pitempi alleeli oli  $\geq 21$  toistojaksoa(387) viitaten siihen, että toistojakson pidentyessä myös ALS:n riski kasvaa.

#### Penetranssi

$C9^{HRE}$ :n penetranssi on epätäydellinen ja riippuu iästä. On arvioitu, että se on 50 % 58-vuoden iässä ja  $>90$  % 83-vuoden iässä(445). FALS:n ja SALS:n penetranssien välillä ei ole oleellista eroa.  $C9^{HRE}$ -ALS alkaa hieman aikaisemmin kuin  $C9^{HRE}$ -FTD ja spinaalialkuinen  $C9^{HRE}$ -ALS hieman aikaisemmin kuin bulbaarialkuinen(446). Ottaen huomioon, että keskimääräinen sairastumisikä on noin 60 vuotta, ei ole pidetty kovinkaan todennäköisenä, että mikään negatiivinen valintapaine olisi kohdistunut  $C9^{HRE}$ :n kantajiin menneinä vuosisatoina tai -tuhansina, jolloin elinajan odote oli selvästi 60 vuotta alempi. Oireettomia kantajia on myös raportoitu esiintymistiheyksillä 0,1-0,2 % (315,386). Brittiläisessä vuoden 1958 syntymäkohortissa vuonna 2013 kantajia oli 0,13%(315) ja suomalaisessa 60-104 vuotiaista koostuneessa aineistossa kantajia 0,2%(386).

#### Antisipaatio

Jos  $C9^{HRE}$ -FALS-potilaiden sairastumisiän osoitetaan olevan alemman kuin  $C9^{HRE}$ -SALS:ien, puhuisi tämä antisipaation puolesta. Antisipaatiolla tarkoitetaan tilannetta, jossa tauti alkaa nuoremmalla iällä ja/tai ilmenee vaikea-asteisempuna seuraavissa sukupolvissa.  $C9^{HRE}$ -ALS:ssa tällaisesta erosta on saatu viitteitä(447,448), mutta antisipaation mahdollisuuden arviota vaikeuttaa mm. se, että tarkkaa toistojaksojen määrää eri sukupolvissa on toistaiseksi ollut haastavaa arvioida. Lisäksi on saatu viitteitä siitä, että  $C9^{HRE}$ -ALS periytyisi tilastollisesti useammin äidin kuin isän kautta(448).

#### Sukupuoli

On mahdollista, että  $C9^{HRE}$ -ALS:n ilmenemiseen vaikuttaa sukupuoli. Vuonna 2017 julkaistussa meta-analyysissä, johon osallistui 1244 ALS:ia sairastavaa  $C9^{HRE}$ :n kantajaa tuotti tuloksen, jossa sairastavia naisia oli hieman enemmän kuin miehiä (RR 1,16, 95 % CI 1,04–1,29). Sukupuolieroa ei todettu niillä 488:lla  $C9^{HRE}$ :n kantajilla, joiden tauti ilmeni FTLD:nä(449). Tämä ALS:n kohdalla havaittu ero saattaisi osin selittää niitä tutkimushavaintoja, joiden mukaan Suomessa ALS on sukupuolilla yhtä yleinen tai yleisempi naisilla(117,118). Myöskin heritabiliteettiarvioissa  $C9^{HRE}$ -ALS vaikuttaisi periytyvän odotettua useammin äiti-tytär -pareissa(314).

#### Laboratoriodiagnostiikka

$C9^{HRE}$  määritetään useimmiten perifeerisen veren valkosoluista. Toistojaksopidentymää ei ole vielä pystytty sekvensoimaan eikä monistamaan tavanomaisella polymeraasiketjureaktiolla (PCR). Uuden sukupolven (PCR-free) sekvensointidatasta  $C9^{HRE}$  pystytään suhteellisen luotettavasti osoittamaan käyttämällä Expansion Hunter-nimistä ohjelmistoa, mutta ekspansion kokoa ei pystytä siitä määrittämään(450,451). Ensimmäiset onnistuneet long-read -sekvensit  $C9^{HRE}$ :n yli raportoitiin vuonna 2018(360), ja tällä menetelmällä voidaan määrittää ekspansion koko sekvensoitujen DNA-segmenttien osalta. Lopputuloksena saadaan tyypillisesti useamman kokoisia ekspansioita somaattisen mosaikismin vuoksi. Mutaatio voidaan osoittaa myös melko vaativalla Southern blot -menetelmällä, jossa toistojakson monistuma näkyy selkeän juovan sijasta intensiteetiltään

liukuvana pilvenä, joka edustaa eri soluissa esiintyviä vaihtelevan kokoisia toistojaksoja (mosaikismi).

Käytännössä  $C9^{HRE}$  osoitetaan useimmiten kaksivaiheisella PCR-testillä. RP-PCR (Repeat-primed PCR) on tällä hetkellä kultainen standardi. Sillä saadaan pitenevä sarja PCR-tuotteita, kunnes monistuminen vähitellen hiipuu.  $C9^{HRE}$ :n läsnä ollessa tuloksena on laskeva sahanteräkuvio.  $C9^{HRE}$  voidaan vielä varmentaa tekemällä toistojaksoalueen yli PCR. Tällöin tyypillisesti näkyy vain normaali alleeli (monoalleelinen amplikoni), sillä  $C9^{HRE}$ :n yli ei PCR pysty amplikonin tuottamaan. Amplikoni on molekyylibiologiassa pala DNA:ta tai RNA:ta, joka on monistus- tai replikaatiotapahtumien lähde ja/tai tuote. Tätä menetelmää käytetään nykyisin geenidiagnostiikassa, mutta siihen liittyy myös erilaisia käytännön ongelmia.

Patologisena rajana on yleensä pidetty 30–45 toistojaksoa, mutta tämä on asetettu paljolti RP-PCR-tekniikan rajoitteista johtuvista syistä. Se tunnistaa ~60 toistojaksoa, mutta ei pysty laskemaan todellista ylärajaa. Toistojaksojen todelliset määrät ovat  $C9^{HRE}$ -sairauksien yhteydessä luokkaa satoja - tuhansia, mikä on osoitettu Southern blot- ja uudemmilla tekniikoilla.

Vuonna 2014 tehtiin sokkotesti 14 eri laboratoriolle, ja vain 5/14 raportoi PCR-perusteisen testituloksensa samana kuin etukäteen saatu Southern blot-menetelmän tulos. Sekä  $C9^{HRE}$ :n suhteen vääriä positiivisia että vääriä negatiivisia tuloksia ilmoitettiin (452).

Southern blot-tekniikka vaatii suhteellisen paljon materiaalia ja on työläs. Se ei myöskään ole käytettävissä kaikissa laboratorioissa. Sama koskee WGS- ja osin LRS (long-read sequencing) -tekniikoita (453). Uudemmillakin tekniikoilla hyvin pitkien toistojaksoketjujen koon tarkka määrittäminen on haastavampaa kuin lyhyempien.

$C9^{HRE}$ :n sisältävien haplotyyppien tunnistaminen tekemällä SNP-hakuja voi sinänsä nopeuttaa  $C9^{HRE}$ :n löytymistä suurista näyteaineistoista, mutta itse  $C9^{HRE}$ :n varmasta esiintymisestä kyseisessä näytteessä saatikka toistojaksojen määrästä tällainen ei kerro.

#### 6.11.4 Mutaatioiden tutkiminen käytännön kliinisessä työssä

Geenitesteillä on ominaispiirteitä, jotka erottavat ne muista laboratoriotutkimuksista. Ihmisen perimä pysyy kutakuinkin muuttumattomana koko elämän ajan (pois lukien yksittäisten solukloonien somaattiset mutaatiot), joten geenitutkimus voidaan tehdä missä iässä tahansa alkiovaiheesta vanhukseen. Testin tulos on elinikäinen ja peruuttamaton. Geenitestin tulokset koskevat paitsi tutkittavaa myös hänen lapsiaan ja muita sukulaisiaan. Näistä syistä ihmiset kokevat tiedon geenituloksistaan usein erittäin merkittävänä, ja tietosuojan merkitys korostuu tavallista enemmän (Lääkäriliitto).

Kaikkia geenitestejä edellyttää tutkittavan perusteellinen informointi. Samoin on varauduttava informoimaan uudelleen, jos tarvetta ilmenee. Potilaan tehtävä on informoida sukulaisiaan.

ALS kuuluu sairauksiin, joiden geenitesteistä informoiminen on usein perusteltua ohjata perinnöllisyyslääketieteen yksikköön. Tämä ei ole välttämätöntä, jos hoitava lääkäri (käytännössä neurologi) hallitsee kysymyksenasettelun. Olennaista on ymmärtää, että negatiivinen geenitesti ei poissulje ALS:ia. Toinen tärkeä asia on se, että positiivinen valtamutaation testitulos vaikuttaa potilaan ja hänen sukuunsa täysin eri lailla riippuen siitä, kummasta mutaatiosta on kysymys. Valtamutaatioiden testauksesta todetaan tässä seuraavaa:

1. **SOD1p.D91A**. Testi kannattaa tehdä, jos tauti on hidas, epätyypillinen ja alaraaja-alkuinen. Positiivinen tulos on lähes aina se, että ALS:ia sairastava on homotsygoottinen mutaation suhteen. Tällöin hänen vanhempansa ja lapsensa ovat heterotsygootteja, eivätkä sairastu. Lisäksi potilaalle voidaan kertoa, että hänen sairautensa on suurella

todennäköisyydellä hidas, keskimääräinen elinaika on noin 15 vuotta, mahdollisesti enemmänkin. Älyllisten toimintojen heikkeneminen ALS:iin liittyvästä syystä on erittäin epätodennäköistä. Tällä hetkellä käytössä olevalle synnyksellään lääkityksille ei ole tiedossa estettä, mutta sellaisten tehoa ei tässä potilasryhmässä ole tutkittu.

Koska alleelin esiintymä on 1 % luokkaa Suomessa, on populaatiossa paljon oireettomia kantajia. Oireettoman henkilön testaaminen *SOD1p.D91A*:n suhteen ei ole perusteltua kuin poikkeustapauksissa.

2. **C9ORF72**. ALS-geenitestauksesta on laadittu eurooppalaisia suosituksia, mutta *C9ORF72*:n toistojaksomutaation *C9<sup>HRE</sup>* löytymisen jälkeen tehtyjä, yleisesti kliiniseen käyttöön hyväksytyjä päivityksiä ei ole. Löytö laajensi geenitestin mahdollisuuden myös FTLD-ryhmän sairauksia koskeviksi. Kyseessä on vallitsevasti periytyvä mutaatio, joten geenitestistä saatu tieto vaikuttaa tutkitun koko sukuun.

ALS-diagnoosi on useimmiten mahdollista tehdä ilman geenitestejäkin. FTLD-ryhmän sairauksissa kliininen kuva on etenkin sairauden alussa epämääräisempi, ja erotusdiagnoosiikka voidaan joutua tekemään psykiatristen sairauksien suhteen (454). Tällöin on mahdollista, että *C9<sup>HRE</sup>*:n testaamiselle on painavampia syitä, koska esimerkiksi pitkittyneiden psyykenlääkekokeilujen kyllästyvien hoitolinjauksien osuutta voidaan ainakin teoriassa vähentää.

Genomiikan kehitys on laajentanut testauksen mahdollisuuksia radikaalisti, ja kaupallisesti saatavien testien kirjo laajenee.

Yksittäisten geenivirheiden kohdalla tuloksia ilmaistaessa on käytetty standardointia luokkiin patogeeninen, todennäköisesti patogeeninen, merkitys epävarma, todennäköisesti hyvänlaatuinen ja hyvänlaatuinen. Toistojaksomutaatioiden kohdalla on suositettu standardointia näytönasteluokkiin väestötason tieto, laskennallinen, funktionaalinen ja sekvensointiin perustuva tieto.

*C9ORF72*-toistojaksomutaatio *C9<sup>HRE</sup>* ei ole varmuudella aina patogeeninen, sen penetranssin arvellaan olevan 60 ikävuoden paikkeilla 50 %, mutta vanhemmista ikäryhmistä tarvitaan lisää tietoa. Oireettomia kantajia on raportoitu, jopa iäkkäiden parissa tiheydellä 1/500.

Kliinikon tehdessä arviota vallitsevasti periytyvän ALS:n tai FTLD:n mahdollisuudesta, tulisi haastattelu tehdä ainakin kolmen sukupolven osalta. Sen tulisi kartoittaa mahdolliset sukulaiset, joilla on todettu ALS, FTD, muu dementia, merkittävä psykiatrinen sairaus tai itsemurha (kts. osatyö IV, FALS-NP-luokitus).

Mikäli ALS-diagnoosi on varma, ei ole ehdottomia perusteita tehdä testiä. Jos potilas haluaa testin, on käytävä perinpohjainen keskustelu positiivisen tuloksen merkityksestä. On kerrottava, että kyse ei aina ole kyllä/ei-vastauksesta, ja että testitulokseen liittyy epävarmuustekijöitä.

Toistojaksojen lukumäärän selvittäminen ei täysin ongelmatonta, eikä välimuotoisten toistojaksojen (7–45 toistojaksoa) merkitystä täysin tunneta, etenkin jos niitä nähdään kummassakin alleelissa. Alaraja, jota suuremmat toistojaksot aiheuttavat taudin ei sekään ole ehdoton. Eri laboratorioiden on myös todettu tuottavan toisistaan eriäviä testituloksia.

Positiivinen testitulos tuo esiin noin 15 %:n mahdollisuuden, että ALS:na alkaneeseen tautiin tulee myöhemmässä vaiheessa mukaan kognitiivinen eli älyllisiin toimintoihin vaikuttava oireisto. Tämä on tyypiltään frontotemporaalinen dementia (FTD), ja sen oireet voivat olla yllättäviä, työläästi diagnosoitavia ja vaikeasti invalidisoivia. Dementian mukaantulo voi vaikuttaa kriittisiin hoitolinjauksiin kuten PEG-letkuun tai pysyvään

mekaaniseen ventilaatioon. Hoitolinjauksia ei kuitenkaan voida tehdä potilaan geneettisen statuksen perusteella.

Oma lukunsa ovat oireettomat henkilöt, joiden sukulaisella on todettu ALS-FTLD -ryhmän sairaus, ja jotka haluavat ennakoivan geenitestin. Suomessa on toistaiseksi ollut vallalla konsensus, jonka mukaan oireettomia henkilöitä ei testata. Tässä noudatetaan älä vahingoita – periaatetta (*primum est non nocere*). Konsensus saattaa olla muuttumassa.

Huolimatta siitä, että Suomessa ei ennakoivia testejä aina tehdä, on lääkärin, jolta tällaista kysytään, syytä etukäteen tehdä itselleen selväksi seikat, jotka puhuvat testausta vastaan tai sen puolesta. Ilman molempien hahmottamista on keskustelu tulokseton.

Oireettoman henkilön osalta tulos voi toistaiseksi olla merkityksellinen esimerkiksi perhesuunnittelun kannalta. Tässä yhteydessä on sallittua suhtautua luottamuksella ALS:n hoidon tulevaisuudennäkymiin.

Moni ihminen kokee vähemmän ahdistavaksi elää tiedon kuin epätietoisuuden tilassa. Perinnöllisen syövän osalta on näyttöä siitä, että geenitestiin edettäessä ahdistavin vaihe on jakso ennen testausta ja erityisesti testituloksen ilmoittamisen yhteydessä – myös niillä, joiden testituloksella oli negatiivinen – minkä jälkeen sopeutuminen tulokseen käynnistyy(455). *C9<sup>HRE</sup>*:n kohdalla ongelmaa seuraa siitä, että positiivinen tulos ei oireettoman kohdalla sisällä yksiselitteistä tietoa. Tarkkoja arvioita siitä, sairastuuko kantaja, ja jos sairastuu niin mihin ja milloin, ei voida antaa. Yleisesti hyväksytyä suositusta oireettomien henkilöiden testaukselle ei toistaiseksi ole. Katsaus, jossa on esimerkkejä erityisesti *C9<sup>HRE</sup>*:n osalta ongelmaa sivuavista skenaarioista on julkaistu 2022(26).

Oman lukunsa geenitestaukseen tuovat geenivirhekohtaiset hoitokokeilut, jotka tulevat yleistymään. Tällöin geenitesti on indisoitu, mikäli se on portti kliiniseen tutkimukseen. Kliiniseen tutkimukseen osallistuminen tai osallistumatta jättäminen ei saa vaikuttaa potilaan muuhun hoitoon. Kun ALS:n oireiden ilmetessä oireilevan alueen liikehermoista karkeasti puolet katsotaan menetetyiksi, on selvää, että tuloksellisten hoitojen tulee käynnistyä mahdollisimman varhain. Oireettomien ALS-mutaatioiden kantajien prospektiivinen kohortti on muodostettu Miamin yliopistossa (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00317616>) vuonna 2006. Lääkeyhtiö Biogen on käynnistänyt oireettomilla *SOD1*-mutaation kantajilla, joilla veren NFL-taso on koholla, faasi 3:n interventiotutkimuksen (RCT, NCT04856982) intratekaalisella ASO toferseenillä. Tutkimuksen arvioitu valmistuvan vuonna 2027.

## 6.11.5 Muut geenivirheet

**TARDBP** [TAR DNA-Binding Protein 43 (TDP-43), kromosomi 1, OMIM605078].

Ensimmäiset *TARDBP*-mutaatioita kantavat ALS-potilaat kuvattiin vuonna 2007, ja nykyään mutaatioita tunnetaan ~30 erilaista. Maailmanlaajuisesti FALS-potilaista 2–5 %:lla on löydettävissä *TARDBP*-mutaatioita ja SALS-potilailta noin 1 %:lla. Taudinkuva on pääasiassa klassinen ALS. *TARDBP*-mutaatiot ovat suomalaisessa ja pohjoismaisessa väestössä harvinaisia(456).

TDP-43 on toistaiseksi merkittävin ALS:n patogeneesissä ilmenevä proteiini. Viimeaikaiset tutkimustulokset viittaavat siihen, että TDP-43:n poikkeava ilmeneminen on todennäköisemmin neurodegeneraation aiheuttaja kuin sekundaarinen tapahtumaketjun osa(457). TDP-43:n on kuvattu vuorovaikuttavan yli 6000 geenin transkriptiossa, ja aikuisilla hiirillä toteutetun ASO-vaikutuksen muuttavan ~360 geenin toimintaa. Yksi olennainen TDP-43:n vaikutuksen kohde ihmisellä on STMN2-proteiini, jonka silmukointivirheet ja alentunut toiminta on osoitettu ei-SOD1-peräisessä ALS:ssa(458).

**FUS** [Fused in sarcoma, kromosomi 16, OMIM137070] *FUS*-mutaatiot kuvattiin 2008. *FUS* liittyy mm. RNA:n silmukointiin. Neuropatologisissa tutkimuksissa *FUS* lokalisoituu hermokudoksessa TDP-43:n tapaan. Maailmanlaajuisesti mutaatioiden arvioidaan vastaavan 3-5 % FALS- ja <1 % SALS-tapauksista. *FUS*-mutaatiot ovat Suomessa harvinaisia(338). Korkeimmat esiintymät FALS-potilailla on kuvattu Saksasta (8,7 %). *FUS*-mutaatioiden merkittävä piirre on niiden liittyminen nopeasti eteneviin juveniiliin ALS:iin, jossa sairastuminen tapahtuu <25 vuoden iässä ja vielä harvinaisempaan pediatriseen ALS:iin, jossa sairastumisiäksi on määritelty <18vuotta. Liitännäisoreena on usein kuvattu posturaalista vapinaa(459). Useimmat nuorimmat raportoidut potilaat ovat olleet poikia. Myös Suomessa on ollut tapauksia, joissa sairastuminen on tapahtunut < 15 vuoden iässä. On arvioitu, että < 40 vuoden iässä ALS:iin sairastuneista *FUS*-mutaatiot vastaavat jopa 35 % tapauksista, juveniilissa ALS:ssa 43 % ja pediatriisessa 52 %. *FUS*-mutaatioita on raportoitu myös iäkkäämmillä, ja kliinisenä piirteenä on kuvattu klassisessa ALS:ssa harvinaisempi pään roikkumisoire(460). Juveniilissa ALS:ssa on *FUS*:n lisäksi kuvattu mutaatioita *SETX*-geenissä(461). Jonkin verran on kuvattu myös *SOD1*-mutaatioita juveniileilla potilailla. *FUS*-mutaatioissa huomattavaa on myös *de novo*-mutaatioiden suuri osuus(462). *FUS*-FALS-potilailla ei todeta TDP-43-neuropatologiaa(454).

**TBK1** [Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor NF- $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase 1, kromosomi 12, OMIM604834] *TBK1* on seriini- ja treoniini-kinaasi, joka osallistuu mm. inflammatorisiin prosesseihin ja kahden substraattinsa fosforylaatioon. Nämä ovat optineuriini (*OPTN*) ja p62, jotka puolestaan osallistuvat autofagiaan. Molempien katsotaan osallistuvan ALS/FTD:n havaittaviin patologiisiin prosesseihin. *TBK1*:n geenivirheitä on raportoitu löytyvän n. 1–2 %:lta ALS/FTD-potilailta, ja se on yleisempi Euroopassa kuin Aasiassa. *TBK1*:n katsotaan liittyvän lähinnä lisääntyneeseen riskiin sairastua ALS/FTD:aan(463). Harvinaisia *TBK1*-mutaatioita, joiden merkitys on vielä epäselvä, on löydetty 3/315 (1 %) ALS-potilaalta Suomessa koko perimän sekvensoinnissa (julkaisematon havainto).

**OPTN** [Optineuriin, kromosomi 10, OMIM602432] *OPTN*-mutaatiot kuvattiin ensimmäisen kerran 2010 Japanissa. Optineuriini liittyy ubikitiinin prosessointiin ja autofagiaan, missä sitä säätelee myös *TBK1*. Eurooppalaisessa väestössä *OPTN*-mutaatioita on raportoitu löytyneen 0,3 % SALS ja 1,5 %:lta FALS-potilailta(464). *OPTN*-mutaatiot ovat Suomessa todennäköisesti harvinaisia.

**VAPB** [Vesicle-associated membrane protein associated protein B, kromosomi 20, OMIM605704] *VAPB*-mutaatiota on kuvattu lähinnä yksittäisissä perheissä, alkuun brasilialaisissa 1960-luvulla ja sittemmin Japanissa. Taustalla on katsottu olevan perustajavaikutus liittyen Portugalin kauppareitteihin 1700-luvulla. *VAPB*-mutaatioiden katsotaan esiintyvän usein muiden mutaatioiden kanssa ja aiheuttavan tavanomaista hitaamman ja monimuotoisen ALS:n. Toisaalta *VAPB*-mutaatioita on löytynyt myös terveiltä verrokeilta mm. ruotsalaisessa aineistossa, joten sen patogeneisyydestä ei ole täyttä varmuutta(465). *VAPB*:n rakennemuutokset liittyvät mm. endoplasmisen verkoston rakennehäiriöihin(466). *VAPB*-mutaatiot ovat Suomessa harvinaisia(467).

**VCP** [Valocin-containing protein, kromosomi 9, OMIM601023] *VCP* on ATP-aasin toimintoihin kytkeytyvän proteiiniiniperheen jäsen. Vuonna 2004 sen mutaatioiden todettiin aiheuttavan oireyhtymää, jossa esiintyy lihaskudosta, luuta ja aivoja affisioivaa yhdistelmäsairautta IBMPFD (Inclusion body myopathy with early-onset Paget disease and frontotemporal dementia). IBMPFD:n esiintymä maailmanlaajuisesti on useita satoja.

Vuodesta 2010 alkaen on kuvattu useita sukuja, joissa useammalla jäsenellä on ollut klassinen ALS, osalla myös FTD tai muu muistisairaus, mutta ei myopatiaa tai luustosairautta. Neuropatologiset löydökset ovat sopineet ALS:iin. On arvioitu, että *VCP*-mutaatiot käsittävät noin 1-2% FALS-tapauksista(468). *VCP* voi aiheuttaa myös HSP:n(469). Suomessa *VCP*-mutaatio on kuvattu 9 jäsenellä perheessä, jolla oli ALS:n sijasta harvinainen myopaattinen taudinkuva. Osa potilaista lisäksi dementoitui(470).

**ANG** [Angiogenin, kromosomi 14, OMIM105805] Haiman ribonukleaasi A-perheeseen kuuluva proteiini, joka osallistuu mm. verisuonten muodostukseen. *ANG*-mutaatioita on osoitettu myös PD:n ja AD:n perheittäin esiintyvissä muodoissa. Sitten *ANG*-mutaation aiheuttaman ALS:n esiintyvyydeksi on eurooppalaisessa väestössä arvioitu 0,43 %. *SOD1*<sup>G93A</sup> -hiirimalleissa *ANG*:n on todettu omaavan neuroprotektiivisiä ominaisuuksia(471). *ANG*-mutaatio on kuvattu suomalaisella ALS-potilaalla, mutta se on todennäköisesti harvinainen(366).

**SETX** [Senataxin, kromosomi 9, OMIM608465] SETX on RNA/DNA-helikaasi joka liittyy transkription säätelyyn. *SETX*-geeni kuvattiin vuonna 2004 SCA:n ja aksonaalisen neuropatian yhteydessä. Vuonna 2005 perustajamutaation katsottiin liittyvän kanadanranskalaiseen väestöön. Sitten sitä on kuvattu eri puolilta maailmaa. *SETX*-mutaatioiden on todettu vallitsevassa muodossa aiheuttavan juveniilia ALS:ia, ja väistyvässä muodossa okulomotoriseksi tyyppi 2 apraksiaksi nimettyä ataksiaa(472). Harvinaisia *SETX*-mutaatioita, joiden merkitys on vielä epäselvä, on löydetty 5/315 (1,5 %) potilaalta Suomessa koko perimän sekvensoinnissa (julkaisematon havainto).

**ALS2** [Alsin, kromosomi 2, OMIM606352] Alsin liittyy mm. intrasellulaariseen endosomaaliseen kuljetukseen. Sen mutaatio osoitettiin ensimmäisen kerran 2001 juveniilin PLS:n yhteydessä tunisialaisessa perheessä. Useat *ALS2*-mutaatiot aiheuttavat homotsygoottisessa muodossa juveniilin UMN-vauriopainotteisen ALS:n(473). Useimmat potilaat on kuvattu Lähi-Idässä, ja alkamisikä on ollut 1–20 ikävuotta. Ainakin yksi perustajamutaatio on paikannettu 1700-luvulla eläneeseen pohjoisalankomaalaiseen esivanhempaan. *ALS2*-mutaatioiden on osoitettu liittyvän myös hitaasti etenevään varhaislapsuudessa alkavaan nousevaan HSP:hen. *ALS2*-mutaatioita ei tietävästi ole kuvattu Suomessa.

**NEK1** [NIMA-related serine/threonine kinase 1, kromosomi 4, OMIM604588] *NEK1* löydettiin WES- tutkimuksessa 2016. Noin 1 %:lla eurooppalaisista ALS-potilaista on arvioitu olevan tämä geenivirhe heterotsygoottisena. *NEK1*:n on toisaalta katsottu lähinnä assosioituvan kohonneeseen ALS-riskiin(474). Harvinaisia *NEK1*-mutaatioita, joiden merkitys on vielä epäselvä, on löydetty 4/315 (1,3 %) potilaalta Suomessa koko perimän sekvensoinnissa (julkaisematon havainto).

**UBQLN2** [Ubiquilin, kromosomi X, OMIM300204] *UBQLN2* löydettiin 2011. *UBQLN2*:n olennainen tunnettu funktio on tarpeettomien ja väärin laskostuneiden proteiinien poistaminen ubikitiinivälitteisessä makroautofagiassa. Mutaatiota kantavilla ALS-potilailla *UBQLN2* lokalisoituu TDP-43-, p62- ja ubikitiini -inkluusioiden kanssa aivojen, erityisesti aivoturson ja selkäytimen neuroneihin. Immunoreaktiivisuutta on nähty myös ALS/FTD-potilailla, joilla ei ole *UBQLN2*-mutaatiota. Lisäksi reaktiivisuutta on AD:n neurofibrillaarisissa vyhykeissä, PD:n Lewy-kappaleissa sekä *C9*<sup>HRE</sup>-taudeissa. X-kromosomissa vallitsevina periytyvinä mutaatiot aiheuttavat miehille varhemmin puhkeavan ja vakavamman sairauden kuin naisille(475). *UBQLN2*-mutaatiot ovat harvinaisia Suomessa, joskin etsintä on tapahtunut AD- ja FTLD-kohorteista(476).

**ATXN2** [Ataxin-2, kromosomi 12, OMIM601517] Ataxin-2 liittyy stressijyvän aineenvaihduntaan. *ATXN2* kuvattiin 1996 autosomeissa vallitsevasti periytyvän SCA2-sairauden aiheuttajana. SCA2:ssa *ATXN2*-mutaatio ilmenee geenin lukukehyksessä toistojaksomutaationa, jossa >32 CAG-toistojaksoa tuottaa ylipitkän polyglutamiiniketjun. Etenkin isältä perittyinä CAG-toistojaksossa esiintyy pidentymistaipumusta ja antisipaatiota. Toistojaksomäärän 27-33 oli alun perin raportoitu liittyvän lisääntyneeseen ALS-riskiin(477), mutta sittemmin raja on asetunut tasolle  $\geq 31$  toistojaksoa tutkimuksessa, jossa oli mukana myös suomalaisia FALS-potilaita(478). Myös *de novo*-mutaatioiden on osoitettu johtavan ALS:iin(479). SCA2-tauti on Suomessa harvinainen(480).

**KIF5A** [Kinesin heavy chain, kromosomi12, OMIM602821] KIF5A on neuroneissa esiintyvä proteiini, jonka tehtävänä on mikrotubulusten kautta tapahtuvan solunsisäisten rakenteiden kuljetus. *KIF5A*:n mutaatioiden on vuodesta 2002 osoitettu kytkeytyvän useisiin motorisiin oirein ilmeneviin sairauksiin kuten CMT2 ja HSP (SPG10). Kytkeä ALS:iin osoitettiin 2018 GWAS-tutkimuksella, johon osallistui yli 20 000 ALS-potilasta ja 60 000 verrokkaa. Sairastuneet olivat verraten nuoria, keskimääräinen alkamisikä oli 47 vuotta, ja taudin kesto hidaskeskimäärin 10 vuotta. Riski ja penetranssi vaihtelivat mutaation tyypin mukaan, ja mutaatiot paikantuivat eri alueelle (cargo-binding-domeeniin) kuin CMT2:ssa ja HSP:ssä(481). Tällä hetkellä näyttää siltä, että *KIF5A*-mutaatioiden vaikutus välittyisi vahingollisen toiminnanlisäytymisen (engl. gain of function) kautta(482). *KIF5A*:han liittyy sekä korkean penetranssin harvinaisia mutaatioita – jotka ovat harvinaisia myös Suomessa – sekä riskivariantti *KIF5A*p.P986L, jonka alleelifrekvenssi Suomessa on 3%, ja johon liittyy noin kaksinkertainen sairastumisriski(481).

**UNC13A** [UNC-13 homolog A, kromosomi 19, OMIM609894] *UNC13A* on hermojen välittäjäaineiden vapautumiseen ja synapsien vesikkelien toimintaan liittyvä proteiini, joka on tärkeä synapsien muodostumisessa. Sen introniset polymorfiat assosioituvat riskiin sairastua ALS:iin, bvFTD:hen ja lyhentävät elinaikaa(483). Kahdessa tuoreessa tutkimuksessa 2022 osoitettiin, että *UNC13A*:n riskivariantit estävät TDP-43:n kiinnittymistä *UNC13A* DNA:han, ja että tämä aiheuttaa poikkeavan eksonin (cryptic exon) lisäämisen *UNC13A*:n lähetti-RNA:han ja sitä kautta proteiinin toiminnan häiriintymisen(484,485).

*UNC13A*:lla saattaa olla nykyään merkitystä hoitokokeilujen suunnittelussa. Esimerkkinä tästä on kolmen hoitokokeilun *post hoc*-analyysi vuodelta 2017(486). Siinä tutkitun lääkkeen eli litiumin todettiin vaikuttaneen suotuisasti, mutta vastetta ei havaittu ennen kuin tutkimuksen myöhemmässä alaryhmäanalyyysissä, jossa hyöty nähtiin *UNC13A*-riskigenotyyppin (rs12608932 C/C) omaavilla potilailla. Näillä potilailla 12 kuukauden kohdalla eloonjäämisen todennäköisyys lisääntyi litiumlääkityksellä 40,1 %:sta (95 % CI 23,2 - 69,1) 69,7 %:iin (95 % CI 50,4 - 96,3). Luottamusvälin laajuutta selittää se, että hoidettuja *UNC13A*-potilaita oli vain 20 ja verrokkeja 26.

Tuloksen merkitys on paljolti siinä, että se herätti usean hoitokokeilun (valitettavasti ei kaikkien) suunnittelijat ottamaan huomioon tutkimuskohorttien geneettisen statuksen, ja *UNC13A*-genotyyppin katsotaankin olevan riittävä peruste alaryhmien osittamiselle. *UNC13A* genotyyppi on Suomessakin ALS:n riskitekijä (OR ~1,4). Tarkempi tutkimus aiheesta on Suomessa käynnissä.

**CHCHD10** [Coile-Coil Helix Coiled Coil-Helix Domain containing Protein 10, kromosomi 22, OMIM615903] *CHCHD10* lokalisoituu mitokondrioiden intermembraanitalaan. Sen funktio on tuntematon. Sitä on kuvattu taudinkuvaltaan epätyypillisissä ALS-FTD-



perheissä ja useissa muissa tiloissa CMT:stä ataksioihin ja mitokondriaalisiin myopatioihin. Myös suomalaisella valtamutaatio *CHCHD10*p.G66V:n kantajalla on kuvattu ALS-tyyppinen taudinkuva(487). Selkein kuvaus on tehty eksonissa 2 sijaitsevan p.G66V:n aiheuttaman SMAJ:n eli Jokela-tyypin spinaalisen lihasatrofian osalta(61,488). Kyseessä on autosomissa vallitsevasti periytyvä ALS:n kaltainen, mutta sitä huomattavasti hyvänlaatuisempi tauti, jolle ovat tyypillisiä alaraaja-alkuisuus, lihaskrampit, faskikulaatiot, LMN-painotteisuus (puuttuvat heijasteet) ja korkea CK-taso. Taustalla vaikuttaa perustajamutaatio, ja lähes kaikki potilaat ovat geneettiseltä taustaltaan Pohjois-Karjalasta(489).

***SQSTM1*** [Sequestosome 1, p62-protein, kromosomi 5, OMIM601530] Tämä ubikitiiniä sitova proteiinia koodaava geeni löytyi 1995 alun perin luuston Paget'n taudin ja inkluusiokappalemyosiitin (IBM) tutkimusten yhteydessä. *SQSTM1* on todettu ALS-, FTD- ja ALS-FTD-potilailla. Sen funktion on esitetty liittyvän ainakin proteiinien ubikinaatioon, oksidatiivisen stressin säätelyyn sekä neuroinflammaatioon. *SQSTM1*:n on raportoitu esiintyvän yhdessä *C9ORF72*:n ja *TBKI*:n kanssa. Sen todellinen osuus ALS:n aiheuttajana on osin selvittämättä. Harvinaisia *SQSTM1*-mutaatioita, joiden merkitys on vielä epäselvä, on löydetty 2/315 (0,6 %) potilaalta Suomessa koko perimän sekvensoinnissa (julkaisematon havainto). Toinen mutaatioista (*SQSTM1*p.P392L) on kuvattu alun perin Paget'n taudissa(490).

#### 6.11.6 ALS-mutaatiot kansainvälisissä tieto- ja biopankeissa

ALS:iin kytkeytyviksi raportoitujen mutaatioiden lista muuttuu useita kertoja vuodessa. Mutaation taudinaiheuttamiskyvyn varmuusastetta voi arvioida mm. sen perusteella, mitä asiasta kirjataan eri tietopankeissa. Alla luetellaan joitakin niistä.

ALS Data Browser (<http://alsdb.org>) on 2800 kaukasialaisperäisen ALS-potilaan genomin sekvensointiin perustuva päivittyvä luettelo, jossa 94 % on SALS-potilaita. [ALSoD](#) on niin ikään päivittyvä kytkennän vahvuuden perusteella kategorisoitu luettelo ALS-geeneistä ja niiden varianteista. Nämä ovat kenties helpoin tapa saada nopea käsitys mutaation merkityksestä ALS:n etiopatogeneesissä. Laajempia kirjastoja ovat [gnomAD](https://gnomad.broadinstitute.org/) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), joka sisältää mm. frekvenssidataa ja linkkejä mm. ClinVar-tietokantaan, joka on kliinisesti painottunut mutaatiokohtainen kirjasto (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Osin saman taustainen on 2013 perustettu ClinGen <https://clinicalgenome.org/>, joka on kliinikon kannalta helpollisempi. Kumpikin tekee yhteistyötä suomalaisen 2017 käynnistyneen FinnGen-hankkeen kanssa (<https://www.finngen.fi/fi/>). FinnGen ei keskity mihinkään tiettyyn sairauteen, vaan tutkii laajasti kaikkia aineistossa tarpeeksi esiintyviä sairauksia. FinnGen pyrkii genotyypittämään tietoa noin 520 000 suomalaisesta ja yhdistämällä tätä terveystietoihin tuottamaan uusia innovaatioita. FinnGeniä johtaa Helsingin yliopisto, jonka osana toimiva Suomen molekyylieläketieteen instituutti (<https://researchportal.helsinki.fi/fi/>) vastaa tutkimuksen toteuttamisesta.

### 6.11.7 FTLD-mutaatiot

On arvioitu, että 30-50 % FTLD:stä selittyy autosomeissa vallitsevasti periytyvästä syystä(491).

Kaiken kaikkiaan FTLD:hen kytkeytyviksi kuvattuja geenejä on arvioitu olevan n. 50, ja yleisimmät ovat *C9ORF72* (etenkin suomalaisessa väestössä), *GRN* ja *MAPT*.

Harvinaisempia on tunnistettu geeneissä *VCP*, *UBQLN2*, *SQSTM1*, *UPS*, *CHMP2B* ja *FET*-onkogeneeniperheen geenit, joihin kuuluu mm. *FUS*(492–495). Kiinalaisessa väestössä korostuu lisäksi *CHCHD10*(496). ALS-FTD-perheissä yleisimmät ovat *C9ORF72*, *CHCHD10*, *SQSTM1* ja *TBKI*(497).

Anna-Lotta Kaivorinne Oulun yliopistosta teki vuonna 2012 väitöskirjan, jossa hän käsittelee FTLD:n molekyylogeneettistä esiintymää ja kliinistä taudinkuvaa suomalaisessa väestössä. Väitöskirjassa kuvataan mutaatioita geeneissä ja niistä *C9ORF72*:n merkittävä (lähes 30%) osuus tilan taustalla, ja todetaan mutaatioiden geeneissä *MAPT*, *PGRN*, *CHMP2B* ja *TARDBP* olevan harvinaisia Suomessa. Lisäksi hän toteaa, että n. puolet suvuittain esiintyvistä FTLD-tapauksista on toistaiseksi ilman geneettistä diagnoosia(506).

## 7. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen päätarkoitus oli löytää ja luonnehtia ALS:ia aiheuttavia geneettisiä tekijöitä. Tarkennetut tavoitteet:

- 1) Julkaisu I: Tarkoitus oli tunnistaa ALS:n geneettisiä riskitekijöitä suomalaisessa väestössä perimän kattavalla assosiaatiotutkimuksella (GWAS).
- 2) Julkaisu II: Tarkoitus oli tunnistaa tutkimuksessa I löytynyt kromosomissa 9p21 sijaitseva ALS:iin assosioitua geneettinen riskitekijä toisen polven sekvensointitutkimuksella (NGS).
- 3) Julkaisu III: Tarkoitus oli kuvata *C9ORF72*-toistojaksomonistuman (*C9<sup>HRE</sup>*) esiintymää ja ilmenemisyleisyyttä maailmanlaajuisesti.
- 4) Julkaisu IV: Tarkoitus oli kuvata *C9ORF72*-toistojaksomonistuman ja *SOD1*-mutaatioiden osuutta suomalaisessa ALS:ia sairastavassa väestössä, ja ALS-*C9<sup>HRE</sup>*-taudin kliinisiä piirteitä verrattuna muihin ALS-potilaisiin (pois lukien *SOD1*-ALS).

### 7.1 EETTISET NÄKÖKOHDAT

Tämän yhteenvedon kirjoittaja tutki kaikki tutkimuksiin I-IV osallistuneet suomalaiset potilaat henkilökohtaisesti. Kaikki tutkimusnäytteitä luovuttaneet allekirjoittivat informaation saatuaan suostumuksen, jossa he totesivat ymmärtäneensä tutkimuksen tarkoituksen ja tavoitteet. Tutkimukseen osallistuminen tai siitä poisjääminen ei vaikuttanut kenenkään hoitoon.

Kaikkien tutkittavien osalta heidän omat tutkimusyksikkönsä olivat läpikäyneet eettiset arvioinnit, joiden puoltavan näkemyksen jälkeen tutkimukset voitiin aloittaa. Suomalaisten tutkittavien osalta heistä kertynyt tieto on talletettu HUS Neurokeskuksen Meilahden sairaalassa sijaitsevaan tietopankkiin.

## 8. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 8.1 SUOMALAISET ALS-POTILAAT

GWAS-tutkimuksessa (I) ALS:ia sairastavien DNA-näytteitä oli käytettävissä 442 henkilöltä. Heidät oli tutkittu vähintään kahden neurologin toimesta vuosina 1993–2008. Varsinaiset tutkimusyksiköt olivat Haagan Neurologinen Kuntoutuskeskus, Työterveyslaitos ja Helsingin Yliopistollisen keskussairaalan Neurologian klinikka. Jokaiseen yksikköön tuli lähetteellä henkilöitä myös muualta Suomesta.

Diagnosikriteereinä käytettiin 1993 alkaen El Escorial-kriteeristöä, ja 2001 eteenpäin El Escorial-revised-kriteeristöä. Vuodesta 2008 alkaen kriteereihin liitettiin Awaji-kriteerit (ENMG).

*C9ORF72*- toistojaksoekspansion *C9<sup>HRE</sup>* aiheuttamaa kliinistä kuvaa käsittelevässä tutkimuksessa (IV) käytetty DNA eristettiin aiempien lisäksi yhteensä 836 motoneuronitautia sairastavalta aikuiselta henkilöltä, jotka tutkittiin Helsingin yliopistollisen keskussairaalan Neurokeskuksessa. Viimeinen seurantapäivämäärä oli 21 kesäkuuta 2021. Henkilöt määriteltiin satunnaisiksi (SALS-A) ellei heillä haastattelun perusteella ollut yhtä tai useampaa ALS:ia sairastavaa tai sairastanutta I tai II asteen verisukulaista. Jos ALS:ia sairastava verisukulainen löytyi, henkilö määriteltiin ryhmään FALS-A. Tutkimuksessa (III) suomalaisten ALS:ia sairastavien näytteitä oli 401.

### 8.2 EI-SUOMALAISET ALS-POTILAAT

Toisen polven sekvensointitutkimuksessa (II) hyödynnettiin suomalaisten ALS:ia sairastavien (n=442) lisäksi walesilaista sukua, jossa 9 henkilöllä oli diagnosoitu ALS ja/tai FTD 4 sukupolvessa. DNA:ta oli käytettävissä 4 henkilöltä. Lisäksi hyödynnettiin alankomaalaista sukua, jossa ALS ja/tai FTD esiintyi 6 sukupolvessa. Kummankin suvun sairastuneilla oli osoitettu kytkentä osatutkimuksessa 1 löydettyyn suomalaiseen riskihaplotyyppiin. DNA-näytteitä oli käytettävissä myös 268 henkilöltä (USA 198, Saksa 41, Italia 29).

Kahdelle suomalaiselle ALS-potilaalle (ALS-50 ja ALS-75) tehtiin vuonna 2010 ruumiinavaus nopeutetulla aikataululla menehtymisen jälkeen Liisa Myllykankaan toimesta HUSLAB:in Patologian osastolla. Heidän aivoistaan eristettiin RNA, jota käytettiin *MOB3B*-, *C9ORF72*- ja *IFNK*-geenien mRNA-tuotteiden karakterisoinnissa käyttäen RT-PCR:ää ja Sanger-sekvensointia.

### 8.3 FTD-POTILAAT

Toisen polven sekvensointitutkimuksessa (II), jossa *C9ORF72*:n toistojakso-mutaatio *C9<sup>HRE</sup>* löytyi, oli käytettävissä näytteet 75 suomalaiselta FTD:tä sairastavalta. FTD-potilaat oli tutkittu ja näytteet kerätty Anne M. Remeksen ja Anna-Lotta Kaivorinteen (OYS ja Oulun yliopisto) toimesta pääasiassa Pohjois-Suomen alueelta. Poikittaistutkimuksessa (III) oli yhteensä 1425 Lund-Manchester -kriteerein varmistetun FTD:tä sairastavan näytteet 17 eri alueelta maailmasta ALS-näytteiden tapaan. Myös tässä tutkimuksessa suomalaisten FTD:tä sairastavien näytteitä oli 75 kappaletta.

### 8.4 VERROKIT

GWAS-tutkimuksessa (I) väistyvästi periytyvän mutaation *SOD1*p.D91A suhteen homotsygoottien ALS:ia sairastavien näytteitä oli 72. Nämä toimivat positiivisina

verrokkeina, joilla testattiin GWAS:n herkkyyttä löytää epäsuorasti geenimerkkien avulla kyseisen p.D91A-mutaation tuottama signaali.

Perinteisinä verrokkeina GWAS-tutkimuksessa (I) käytettiin näytteitä Vantaa 85+ -projektista. Tämä ryhmä käsittää kaikki  $\geq 85$ -vuotiaat ( $n=601$ ), jotka asuivat Vantaalla 1. huhtikuuta 1991. Tästä joukosta verrokkiryhmäksi, jonka DNA oli käytettävissä, valikoitui lopulta 521 henkilöä. Verrokkien ikä oli korkeampi kuin ALS:ia sairastavien, mutta tällä varmistettiin sitä, että ryhmässä ei ollut henkilöitä, jotka olisivat vasta sairastumassa ALS:iin. Toisen polven sekvensointitutkimuksessa (II), jossa toistojaksomutaatio  $C9^{HRE}$  löytyi, oli mukana Vantaa 85+ -aineiston lisäksi DNA-näytteet 262 neurologisesti terveeltä henkilöltä USA:sta (NINDS repository at Coriell), 64 Saksasta ja 83 Italiasta. Afrikasta ja Aasiasta oli käytettävissä 300 anonyymiä näytettä (Human Gene Diversity Panel).

RNA:n kudostason ilmentymää tutkittiin (II) 137 terveen verrokin CNS-kudosnäytteistä (AROS Applied Biotechnology AS company laboratories, <http://www.arosab.com>).

Poikkileikkaustutkimuksessa (III) neurologisesti terveiden henkilöiden kontrolleina toimivia näytteitä oli 2585. Näistä suomalaisia oli 478. Muut lähteet olivat: USA 844, Italia 354, Saksa 309, Australia 213, Sardinia 87 ja Human Gene Diversity Panel/Foundation Jean Dausset-CEPH, Pariisi, (biopankki, joka sisältää DNA:ta 52 eri populaatiosta) 300.

Kliinistä kuvaa käsittelevässä tutkimuksessa (IV) kliinisenä vertailuryhmänä oli 455  $C9^{HRE}$ :n sekä *SOD1*-mutaatioiden p.A90V ja p.D91A suhteen negatiivista ALS:ia sairastavaa.

## 8.5 MENETELMÄT

### 8.5.1 GWAS-tutkimus (I)

Perimänlaajuisessa assosiaatiotutkimuksessa 853 näytettä genotyyppitettiin käyttämällä Infinium Human370 BeadChips mikrosirua, jolla voitiin analysoida 345111 yhden nukleotidin muutoksesta aiheutuvaa polymorfismia (SNP) kattaen koko genomia. 110 näytettä analysoidaan käyttämällä Infinium Human 1 M BeadChips mikrosirua, jolla analysoidaan 1 154691 SNP:ia. Alkuperäiset analyysit rajattiin 329355 autosomaaliseen SNP:iin, jotka olivat alustoilla yhteisiä. Toistomittausten Bonferroni-korjaus tuotti kynnyksarvon  $p = 1,52 \times 10^{-7}$  perimänlaajuiselle merkitsevyydelle ( $\alpha=0,05/329\ 355$  autosomaaliset SNP:t). Tarkemmat laatu- ja tilastolliset menetelmät on kuvattu alkuperäisjulkaisussa.

### 8.5.2 NGS-tutkimus (II)

Next generation sequencing (NGS)- eli toisen polven sekvensointitutkimus kohdistettiin osatyössä I tunnistetulle riskihaplotyyppiin alueelle (232 kb), jossa sijaitsi kolme geeniä (*MOB3B*, *IFNK* ja *C9ORF72*). Walesilaisen perheen tiedettiin omaavan kromosomissa 9p21 suomalaisen riskihaplotyyppiin. ALS:ia sairastavan henkilön lymfoblastoidisesta solulinjasta erotettiin kromosomi 9 käyttäen FACS Vantage solulajittelijaa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Alankomaalaisesta perheestä oli käytettävissä 3 sairastavan ja 5 terveen henkilön DNA:ta. Käytössä oli SureSelect kohteenrikastustekniikka (Agilent Inc., Santa Clara CA, USA). Seuraavaksi käytettiin toisen polven HiSeq2000 sekvensoria (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), joka tuotti 56,7 giganukleotidin verran sekvensointidataa verrokkinäytteelle ja 114,4 giganukleotidia tutkimusnäytteelle. Varianttien tunnistamisessa käytettiin vertailussa ihmisen genomidataa (UCSC hg 18).

Seuraavaksi käytettiin Repeat-primed PCR (RP-PCR) -tekniikkaa, koska jos tavanomaisella toistojaksopolymeraasiketjureaktiolla (PCR) monistuu vain yksi alleeli, saadaan RP-PCR:llä

pitenevä sarja PCR-tuotteita, kunnes monistuminen vähitellen hiipuu. Rajoituskohtien pituusanalyysi suoritettiin käyttämällä ABI 370xl geneettistä analysaattoria (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) ja GeneScan-ohjelmaa. Toistojaksot osoitettiin tyypillisenä sahanterän muotoisena kuviona, ja tekniikan yläraja on noin 60 toistojaksoa, sallien karkean jaon yli 30 jakson ja normaalien alleelien (< 20 toistojaksoa) erottamisen.

Toistojakson ilmenemisen varmentamiseksi ja sen koon arvioimiseksi käytettiin fluoresoivaa *in situ* – kromosomimaalaustekniikkaa (FISH) lymfoblastoideissa solulinjoissa. Suomalaisesta fibroblastinlinjasta tutkittiin 4 toistojakson mittaisella oligonukleotidilla solutason ilmentymää (Eurofins MWG operon, Huntsville, AL, USA). C9ORF72 -proteiinin lokalisaatiota pyrittiin osoittamaan tutkimalla kudoksia vasta-aineella, joka tunnistaa tämän proteiinin (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

### 8.5.3 Esiintymää tarkasteleva tutkimus (III)

Tutkimuksessa käytettiin aiemmin kuvattua RP-PCR-tekniikkaa. Kategorisointi terveisiin ja patologisen ekspansioon kantajiin oli sama kuin tutkimuksessa II. Haplotyyppianalyyseissä käytettiin samoja analyysejä kuin tutkimuksessa I. *C9<sup>HRE</sup>*:n ikää arvioitiin Bayesilaisella geenien kytkentäepätasapainon kartoitusohjelmalla (DMLE+ version 2.3). Mutaation ikään suhteutettua penetranssia arvioitiin Kaplan-Meierin menetelmällä.

### 8.5.4 *C9ORF72*-toistojaksomutaation aiheuttamaa kliinistä kuvaa tarkasteleva tutkimus (IV)

DNA eristettiin standardimenetelmillä perifeerisen veren valkosoluista. HRE genotyyppitettiin uudelleen kaikista saatavilla olleista näytteistä RP-PCR:llä aiempien tutkimusten tapaan. Sahanteräkuvio ja > 45 toistojaksoa tulkittiin patologiseksi. Osa näytteistä tyypitettiin uudelleen, käytössä oli FinnGen ThermoFisher Axiom custom array v2 (finngen.fi/fi/node/59). Näin poissuljettiin *CHCHD10*p.G66V ja *SOD1*p.D91A. Analyyseissä käytettiin puuttuvien havaintojen eli tässä tapauksessa genotyyppien paikkausohjelmaa IMPUTE2. Lisäksi arvioitiin salasyntyistä sukulaisuutta tutkimusjoukossa.

## 9. TULOKSET JA POHDINTA

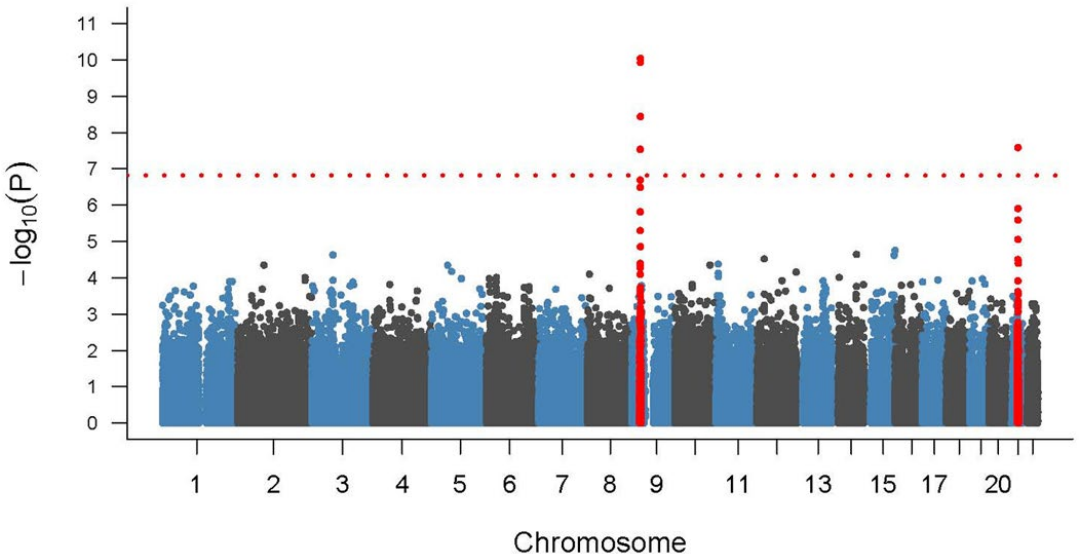
### 9.1 OSATYÖ (I)

Kromosomi 9p21 ja Amyotrofinen lateraaliskleroosi Suomessa: Perimänkattava assosiaatiotutkimus. (*Lancet Neurol.* 2010)

*Chromosome 9p21 in Amyotrophic Lateral Sclerosis in Finland: A Genome-Wide Association Study*

Tutkimuksessa sovellettiin perimänlaajuista assosiaatioanalyysiä (GWAS), ja sen aineistona oli 442 suomalaisen ALS:ia sairastavan ja 521:n verrokin DNA-näytteet. Laatukontrollin jälkeen käytettävissä oli 318167 SNP:ia 405 ALS-potilaalta ja 497 verrokilta. Neljäkymmenen ALS:a sairastavan oli todettu kantavan *SOD1*p.D91A-mutaatiota homotsygoottina, ja nämä toimivat positiivisina verrokkeina, joiden avulla voitiin tarkistaa käytetyn menetelmän assosiaatiosignaalin laatu kyseisessä lokuksessa.

Tutkimuksessa löydettiin kaksi merkitsevää assosiaatiopiikkiä (Kuva 7.). Toinen sijoittui kromosomiin 21q22 (rs13048019,  $p=2,58 \times 10^{-8}$ , OR 4,14, 95 % CI 0 2,32 – 7,40). Tämä vastasi tunnettua autosomaalisesti resessiivistä p.D91A -mutaatiota *SOD1* -geenissä ja oli odotettu löydös. Toinen vastasi aiemmin identifioitua lokusta kromosomissa 9p21.2 (rs3849942,  $p=9,11 \times 10^{-11}$ , OR = 2,16, 95 % CI 0 1,72–2,70). Molempien assosiaatiopiikkien taustalla vaikuttivat merkittävästi 93 FALS-potilaan näytteet, ja löydös vahvistui, kun analyysi rajoitettiin koskemaan FALS-ryhmää.



#### Kuva 7.

Graafinen esitys (ns. Manhattan plot) 405 suomalaisen ALS-potilaan ja 497 verrokin perimän kattavassa tutkimuksessa saaduista p-arvoista. Punainen vaakasuora katkoviiva edustaa perimänlaajuisen merkitsevyytason Bonferroni-korjausta. Punaiset pystysuorat ”pilvenpiirtäjät” edustavat kromosomeja 9p21 ja 21q22.

Kromosomin 9p21 osalta analyysi Haploview-ohjelmalla osoitti, että kaikilta ALS:ia sairastavilta löytyi 42 SNP:n haplotyyppi. Tämä haplotyyppi löytyi 18/497 (3,6 %) verrokilta. Sen kerroinsuhde (OR, Odds ratio) FALS:lle oli 21,0 (95 % CI, 11,2–39,1) eli yhteys oli huomattavan vahva. Haplotyypillä oli yhteistä kattavuutta aiemmin tehdyn, FTD:iaa käsittelevän tutkimuksen kanssa 3 SNP:n osalta, mutta ei toisen, FTD:iaa käsittelevän tutkimuksen, jossa mukana oli myös suomalaisia, ja jossa todettiin assosiaatio kromosomiin 7p21. (498).

Tutkimuksessa todettu kromosomin 9p21 signaali sijaitsee perimässä 232 kb:n alueella, jossa tiedettiin sijaitsevan 3 geeniä: *MOBK2b*, *IFNK* ja *C9ORF72*. Mutaatiohaku tältä alueelta ei paljastanut aminohappomuutoksia, jotka olisivat ilmenneet ALS:ia sairastavien näytteissä mutta eivät verrokeissa.

Klinikkalähtöisen kohortin pohjalta arvioitiin väestötason syyksilukuosuutta (population attributable risk percent, PAR%)(499) eli sitä kuinka suuri vaikutus riskitekijällä on väestön, tai tässä tapauksessa väestön osan (ALS) ylimääräiseen sairastumisriskiin. Toisin ilmaistuna PAR% kuvaa sitä sairauskuorman suhteellista vähenemää, joka saavutettaisiin, jos altistuminen eli tässä yhteydessä geneettinen tekijä voitaisiin poistaa. PAR% oli p.D91A FALS-kohortin osalta 25,5 %. Esimerkiksi tupakoinnin aiheuttaman ennen aikaisen kuoleman PAR%:ksi eurooppalaisissa maissa on laskettu n. 30 % (<http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>). Kromosomin 9p21:n lokus vastasi suuremmasta osuudesta, (PAR%= 37,9 %). Yhdessä p.D91A homotsygotia ja 9p21 lokus vastasivat lähes 1/5 kaikista ALS-tapauksista (PAR% = 19,6 %) ja lähes 2/3 kaikista FALS-tapauksista (PAR% = 64,9 %).

Tutkimuksen tulosta verrattiin 5 kytkeä tutkimuksen, 2 ALS:ia sairastavilla tehdyn tutkimuksen (GWAS) ja yhden FTD:iaa sairastavilla (GWAS) tehdyn tutkimuksen tuloksiin. Aiemmissä tutkimuksissa kromosomin 9 lyhyen haaran osalta (9p.13.2 – 21.3) merkitsevän assosiaation kattavuuden vaihteluväli oli 27,23 Mb – 30,81Mb. Nyt tehty tutkimus supisti kattavan yhteisen alueen 3,58 Mb:iin. Tulos oli tähän mennessä merkitsevin ALS:n assosiaatiotutkimuksen tulos. Tämä puolestaan perustui kytkentäepätasapainoa osoittavaan jo tunnettuun 232 kb:n jaksoon. Tästä jaksosta nyt tehty tutkimus osoitti 42-SNP:n haplotyyppin, joka assosioitui merkitsevästi ALS:iin ja toimii markkerina toistaiseksi löytymättömälle tautia aiheuttavalle mutaatiolle. Koska korkeimmat assosiaatiot kohdistuivat FALS-tapauksiin, voitiin tästä epäsuorasti päätellä, että taustalla on monogeeninen korkean penetraansin omaava tekijä. Koska mutaatiohaku ei osoittanut tulosta, voitiin tästä johtaa olettaa, että patologinen tekijä saattaisi sijaita intronisella tai geenien välisellä alueella.

Samoihin aikoihin tehdyssä FTD:iaa käsittelevässä GWAS-tutkimuksessa havaittiin assosiaatio samassa kytkentäepätasapainojaksossa kromosomissa 9p21 kuin tässä tutkimuksessa(498). Lisäksi kyseisessä tutkimuksessa havaittiin vastaava riskihaplotyyppi. Yhdessä nämä tutkimukset antoivat geneettisen näytön siitä, että ALS ja FTD muodostavat jatkumon, jolle neuropatologisessa mielessä on yhteistä solutason värjäytyminen TDP-43:lla ja ubikitiinillä. Omassa tutkimuksessamme noin 4 % potilaista sai ALS:n myöhemmässä vaiheessa tilan, joka ei ollut ristiriidassa FTLD:n kanssa.

Tutkimuksessa hyödynnettiin Suomen väestön homogeenisyyttä, mikä lisäsi tutkimuksen voimaa, koska geneettinen vaihtelu, eli tautia aiheuttavien geenien määrä populaatiossa on vähäisempi. Samoin alleelinen heterogeenisyys, eli tautia aiheuttavassa geenissä olevien mutatoituneiden alleelien määrä on vähäisempi.

Kromosomeissa 9p21 ja 21q22 havaittujen muutosten todellisesta yleisyydestä suomalaisessa väestössä ei tämän tutkimuksen perusteella voitu esittää tarkkoja arvioita.

*Ennen tätä tutkimusta (1) ALS:ia aiheuttavan tekijän tiedettiin vertauskuvallisesti ilmaistuna asuvan jossakin Helsingin kaupungin kokoisella alueella. Tämä tutkimus vastasi kysymykseen millä kadulla tekijä asuu, mutta talon ja asunnon numero ei vielä ollut tiedossa.*



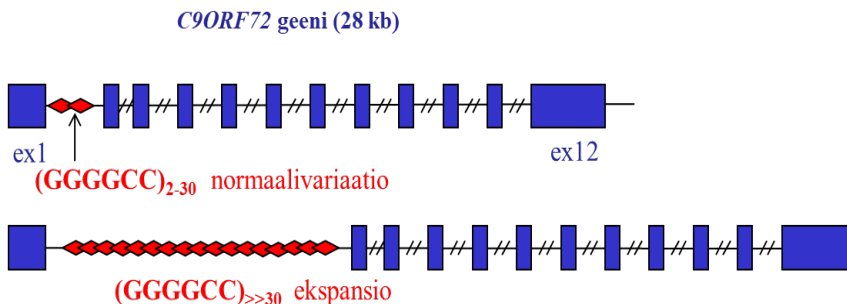
## 9.2 OSATYÖ (II)

Toistojaksomutaatio *C9ORF72*-geenissä aiheuttaa kromosomiin 9p21-kytkeytyvän ALS-FTD:n. (*Neuron*. 2011)

*A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD*

Aiemmassa työssä (I) olimme osoittaneet, että kromosomissa 9p21 sijaitsee 42 SNP:n mittainen perustajahaplotyyppi, joka lisää sairastumisriskiä kaksikymmentäkertaiseksi. Edellisen työn 405 ALS:ia sairastavan suomalaisen ja 497 verrokin lisäksi käytössä oli näytteitä walesilaisesta ja alankomaalaisesta ALS/FTD-suvusta. Valikoiduista näytteistä tehtiin toisen sukupolven sekvensointi. Mutaation etsintä Sanger-sekvensoinnilla oli aloitettu jo vuoden 2009 keväällä, sillä assosiaatiosignaalit kromosomiin 9 havaittiin jo helmikuussa 2009. Sekvensointi tapahtui aluksi Sanger-menetelmällä; kandidaattialueen läpisekvensoinnissa ei löydetty mahdollisia mutaatioita. Tässä vaiheessa tehtiin päätös, että GWAS-tutkimus julkaistaan erikseen (osatyö I) ja mutaation identifiointi erikseen. Vähitellen siirryttiin uuden sukupolven sekvensointiin, joka oli vielä vuonna 2009–2011 varsin kallista. Tämän takia sekvensointi kohdistettiin kromosomiin 9 rikastamalla kromosomin 9 DNA. Useita potilaita sekvensoitiin, joista suomalaisia oli 2 kpl (ALS-50 ja ALS-75). Toukokuuhun 2011 mennessä oli löytynyt >1000 erilaista varianttia kandidaattialueelta, mutta yksikään niistä ei ollut sen kaltainen, että sopisi tautia aiheuttavaksi mutaatioksi. Inversion ja muiden rakenteellisten mutaatioiden mahdollisuutta kartoitettiin fluoresoivalla *in-situ* hybridisaatio tekniikalla kromosomipreparaateista. Tällä menetelmällä tutkittiin useiden sekvenssien järjestystä kandidaattialueella, mutta niissä ei havaittu poikkeavuuksia.

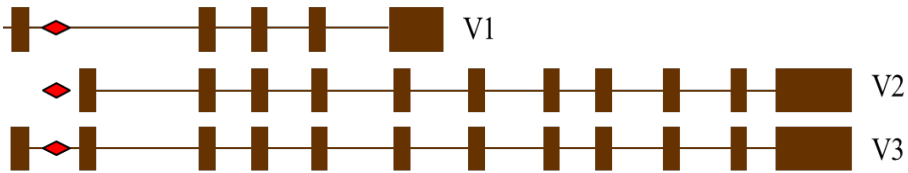
Walesilaisten näytteiden data osoitti 8 uutta varianttia edellä mainitussa 232 kb:n haplotyyppilohkossa. Ne eivät sisällyneet SNP-na tietopankeissa 1000 Genomes ja dbSNP, ja 6 niistä sijoittui 30 emäsparin pituiseen alueen yhteyteen. Tämän sekvenssin tarkempi luku edellytti lopulta käytännössä käsin tapahtunutta läpikäymistä. Sen tuloksena tunnistettiin 6 nukleotidin toistojakso GGGGCC geenin *C9ORF72* ei-koodaavalla alueella. Tässä kohtaa sekvenssiä tuotettiin poikkeavan vähän, mikä viittasi ongelmaan kyseisellä alueella. Yksi potilaista oli onnekaasti homotsygootti mutaation suhteen, mikä johti siihen, että GGGGCC-toistojakson kohdalla oli erittäin huomattava vaje sekvenssistä. Nämä havainnot johtivat ajatukseen, että kyse on GGGGCC-toistojakson monistumasta, jota ei tuon ajan sekvensointimenetelmillä pystytty sekvensoimaan läpi. Tarkennettuna GGGGCC-jaksomonistuma sijaitsee joko promoottorialueella (transkriptivariantti 1) tai intronissa 1 (transkriptivariantit 2 ja 3) (Kuva 8.A. ja Kuva 8.B.).



**Kuva 8.A.**

Heksanukleotidiekspansio HRE sijainti *C9ORF72*-geenissä.

## C9orf72 mRNA



**Kuva 8.B.**

Kolme yleisintä mRNA:ta (variantit V1-V3) ja niiden suhde heksanukleotidiekspansioon.

RP-PCR-menetelmällä voitiin havaita sahanteräkuvioita ALS:ia sairastavien näytteissä osoituksena GGGGCC-toistojaksojen läsnäolosta. Erotustarkkuus oli enintään 60 toistojaksoa. Tämän katsottiin riittävän luokittelemaan patologiset alleelit (>30 toistojaksoa) normaalivariaatiosta, jonka raja oli tuolloin jossain määrin häilyvä (kriteereinä käytettiin <30 toistojaksoa).

RP-PCR pystyi osoittamaan patologisen määrän toistojaksoja eri aineistoissa. Suomalaista 405 ALS:ia sairastavasta 28,1 %:lla ja 478 verrokista 0,4 %:lla todettiin patologinen määrä toistojaksoja ( $p=8,1 \times 10^{-38}$ ; OR 78,0, 95% CI =19,2 – 316,8). Suomalaisilta FALS:ia sairastavilta patologinen määrä toistojaksoja löytyi 46,4 %:lta ( $p=3,7 \times 10^{-37}$ ; OR140,9, 95 % CI 34,0 – 583,9), ja 21,0 % SALS:ia sairastavilta ( $p=1,7 \times 10^{-24}$ ; OR = 56,1, 95 % CI 13,6–230,2). Aiemmassa tutkimuksessa (I) tunnistettu riskihaplotyyppi löytyi 67,3 %:lta niistä suomalaisista ALS:ia sairastavista, joilla oli patologinen määrä toistojaksoja. Haplotyyppi löytyi yhdeltä suomalaiselta verrokilta, jolla oli myös poikkeavaksi tulkittu toistojakso.

FISH-menetelmää (engl. fluorescence *in situ*-hybridization) käytettiin myös arvioimaan poikkeavan toistojakso määrän eli ekspansion karkeaa kokoa. Tässä käytettiin fluoresoivaa merkittyä oligonukleotidia, joka koostui kolmesta GGGGCC-toistojaksosta. Tulokset viittasivat siihen, että ekspansion koko oli vähintään 1,5 kb, mikä vastaa suunnilleen 250 toistojaksoa, joka puolestaan oli minimimäärä, joka FISH-tekniikalla oli mahdollista todeta. Näin pitkiä ekspansioita pidetään yleisesti tautia aiheuttavina(500).

Alustavana arviona *C9ORF72*:n ekspansion (*C9<sup>HRE</sup>*) yleisyydestä tutkimukseen sisällytettiin 268 eurooppalaisperäisen FALS:ia sairastavan henkilön kohortti. RP-PCR:llä *C9<sup>HRE</sup>* löytyi 38,1 %:lta. Tällä tavoin löytyi kolme uutta sukua, joissa *C9<sup>HRE</sup>* periytyi useassa sukupolvessa. Lisäksi tehtiin haku 818 terveen verrokin kohortista, ja 300 anonyymien afrikkalaisen ja aasialaisen henkilön näytepankkiaineistosta (Human Gene Diversity Panel). Kummassakaan aineistossa ei esiintynyt suurempaa toistojaksoa kuin 15 keskiarvon ollessa 3 (0–15).

Lopuksi tehtiin vastaava haku 75 suomalaisen FTD:aa sairastavan henkilön aineistoon. Tässä kohortissa *C9<sup>HRE</sup>*:n esiintymä oli samaa luokkaa kuin suomalaisessa ALS-aineistossa eli 29,3 %. *C9<sup>HRE</sup>* kytkeytyi siten vahvasti FTD:aan ( $p=4,3 \times 10^{-18}$ ; OR = 82,0, 95 % CI 19,1–352,8). Kuudella suomalaisella FTD:aa sairastavalla taudinkuva oli etenevä sujumaton afasia, ja 16 sairasti käytöshäiriöistä FTD:n varianttia (bvFTD). Lisäksi 36,4 %:lla suomalaisista FTD:aa sairastavista oli joko henkilökohtainen tai perheittäin esiintyvä yhteys ALS:iin.

*C9ORF72*-RNA:n neuropatologisessa kartoituksessa suurin lokalisaatio löytyi pikkuaivoista. Tulokset olivat kuitenkin vaihtelevia ja hajonta eri laboratorioiden ja immunovärjästekniikoiden välillä siksi suurta, että pitemmälle vietyjä johtopäätöksiä *C9ORF72*:n jakaumasta ja funktioista ei ollut mahdollista tehdä.

Yhteenvetona tutkimuksesta voidaan todeta, että  $C9^{HRE}$  selittää lähes puolet suomalaisesta FALS:sta, ja yli kolmanneksen eurooppalaisperäisen väestön FALS:sta. Mutaatio oli yli kaksi kertaa *SOD1*-mutaatioita yleisempi FALS:n aiheuttaja, ja yli kolme kertaa yleisempi kuin *TARDBP*, *FUS*, *OPTN* ja *VCP* yhdessä.

Tämä tutkimus ei vastannut siihen, millä mekanismeilla tai mekanismeilla  $C9^{HRE}$  aiheuttaa ALS:ia ja FTD:iaa. Myöskään selvää näyttöä antisipaatiosta ei saatu tässä tutkimuksessa.

*Ennen tätä tutkimusta (II) tiedettiin vertauskuvallisesti ilmaistuna ALS:ia aiheuttavan tekijän asuvan jossakin Helsingin kaupungin kokoisen alueen tietyllä kadulla. Tämä tutkimus vastasi kysymykseen tekijän tarkasta osoitteesta ja siitä, kuka hän on.*

### 9.3 OSATYÖ (III)

*C9orf72*-toistojaksomutaation esiintymä ALS- ja FTD-potilailla: Poikittaistyyppinen vallitsevuustutkimus. (*Lancet Neurol.* 2012)

*Frequency of the C9orf72 hexanucleotide expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study*

Tutkimuksessa arvioitiin aiemmassa tutkimuksessa (II) löytyneen *C9ORF72*-toistojaksomonistuman eli ekspansion ( $C9^{HRE}$ ) esiintymää 4448 ALS:ia sairastavan ja 1425 FTD:aa sairastavan otoksen perusteella 17 maailmanlaajuisesti valitulla alueella.  $C9^{HRE}$ :n osoittamiseen käytettiin RP-PCR-menetelmää.

$C9^{HRE}$  löytyi 7,0 %:lta valkoihoisia SALS:ia sairastavia, jotka olivat kotoisin USA:sta, Euroopasta, ja Australiasta (Taulukko 2.A.). USA:n mustaihoisilta SALS:ia sairastavilta ekspansio löytyi 4,1 %:ssa ja espanjalaisperäisiltä 8,3 %:ssa. Lähi-idästä, Intiasta, Aasiasta, Pohjois-Amerikan natiiviväestöstä ja Tyynen meren alueen natiiviväestöstä mukaan lukien Guam  $C9^{HRE}$ :tä ei löytynyt yhdeltäkään SALS-potilaalta. Yhtenä syynä saattoi olla kohorttien pienuus. Australian valkoihoisesta väestöstä  $C9^{HRE}$  löytyi 5,3 %:lta. Euroopassa korkein esiintymä oli Suomessa, SALS 21,1 % ja sporadinen FTD 18,8 %.

Yhteensä 6,0 % valkoihoisista sporadisista FTD-potilaista kantoi  $C9^{HRE}$ :tä, mutta intialaisista ja aasialaisista ei yksikään.

	Sporadinen ALS		% (95% CI)
	n	Kantajia	
Eurooppa*			
Suomi	289	61	21,1% (16,5-26,3)
Englanti	916	62	6,8% (5,2-8,6)
Saksa	421	22	5,2% (3,3-7,8)
Italia	465	19	4,1% (2,5-6,3)
Sardinia	129	10	7,8% (3,8-13,8)
Eurooppa (yht.)	2223	174	7,8% (6,7-9,0)
USA* (yht.)	1014	56	5,5% (4,2-7,1)
Muu maailma (yht.)	623	14	5,3% (2,9-8,8)
Kaikki yht.	3860	244	6,3% (5,6-7,1)

#### Taulukko 2.A.

$C9^{HRE}$ :n esiintymä alueittain sporadista ALS:ia (SALS) sairastavilla. Taulukko on supistettu versio alkuperäisjulkaisusta III. \* = valkoihoinen väestö.

Eurooppa*			
Suomi	112	52	46.4% (37.0–56.1)
Englanti	98	45	45.9% (35.8–56.3)
Saksa	69	15	21.7% (12.7–33.3)
Italia	90	34	37.8% (27.8–48.6)
Sardinia	19	11	57.9% (33.5–79.7)
Eurooppa (yht.)	389	158	40.6% (35.7–45.7)
USA* (yht.)	163	59	36.2% (28.8–44.1)
Muu maailma (yht.)			
Aasia	20	1	5.0% (0.1–24.9)
Kaikki yht.	588	221	37.6% (33.7–41.6)

### Taulukko 2.B.

*C9<sup>HRE</sup>*:n esiintymä alueittain familiaalista ALS:ia (FALS) sairastavilla. Taulukko on supistettu versio alkuperäisjulkaisusta III. \* = valkoihoinen väestö.

FALS:n osalta *C9<sup>HRE</sup>* esiintyi kaikki alueet yhteenlaskettuina 37,6 %:lla (Taulukko 2.B.). ja familiaalisen FTD:n (F-FTD) osalta 25,1 %:lla. *C9<sup>HRE</sup>*:tä kantavien FALS-potilaiden osuus oli korkein Sardiniaassa 57,9 %, ja sen jälkeen Suomessa 46,4 %. Japanista löytyi yksi FALS, jolla myös oli suomalainen riskihaplotyyppi. Myös Ruotsista löytyi yksi F-FTD ja tunnettu FTD -ryvästymä Lundin seudulla osoittautuikin myöhemmin *C9<sup>HRE</sup>*:n aiheuttamaksi (501). Terveiltä 2585 verrokilta *C9<sup>HRE</sup>* löytyi 5 henkilöltä (0,2 %), heistä 2 oli vanhempia henkilöitä Suomesta ja 3 alle 40-vuotiaita Saksasta.

Haplotyyppianalyysi osoitti, että jokaisella ekspansion kantajalla oli aiemmin osoitettu (I) riskihaplotyyppi ainakin osittaisena. Tämä koski sekä sporadisia että familiaalisia sairastuneita. Tulosten katsottiin viittaavan siihen, että kyseessä olisi perustajamutaatio, jonka iäksi arvioitiin n. 1500 vuotta, mikä vastaisi mediaania 100 sukupolvea olettaen, että sukupolven ikä on 15 vuotta. Toisaalta sukupolvien keskimääräiseksi pituudeksi on ehdotettu myös 20–30 vuotta.

Kaplan-Meier-arviossa päädyttiin siihen, että *C9<sup>HRE</sup>* ei ole penetrantti niillä kantajilla, joiden ikä on alle 35 vuotta, että 58 vuoden iässä penetranssi on 50 % ja 80 vuoden iässä lähes 100 %tässä ALS- ja FTD-diagnoosien perusteella valikoidussa aineistossa. Muita vaikuttavia muuttujia kuin ikä ei löytynyt.

Kliinisiä muuttujia koskevassa arviossa todettiin, että patogeenistä *C9<sup>HRE</sup>*:tä kantava henkilö oli todennäköisimmin nainen ( $p=0,0008$ ), hänellä on positiivinen sukuhistoria ( $p=0,0001$ ) ja että tauti on todennäköisimmin bulbaarialkuinen ( $p=0,0011$ ), kun vertailukohteina olivat ALS:ia sairastavat, joilla ei ollut *C9<sup>HRE</sup>*:tä. FTD:aa sairastavilla oli myös todennäköisemmin positiivinen sukutausta ( $p=0,0001$ ) ja tauti oli todennäköisemmin tyyppiä bvFTD ( $p=0,0001$ ). Sporadisten tapausten suhteellisen suurta määrää pohdittiin myös tässä tutkimuksessa. Mahdollisia selittäviä tekijöitä on useita. Menetelmällisesti tärkeä seikka on se, että tässä tutkimuksessa käytetyt kohortit erosivat jonkin verran toisistaan siinä, miten sporadisen ja familiaalisen ero oli määritelty.

Osa potilaista tuli alueilta, joilla heidän lukumääränsä suhteessa alueen väestöön oli pieni. Suurempi otos näillä alueilla olisi saattanut tuottaa erilaisia tuloksia *C9<sup>HRE</sup>*:n sekä ALS:n ja FTD:n yleisyydestä. Suurempi otoskoko olisi saattanut paljastaa myös useampia haplotyyppisiä. Käytetyt kohortit olivat luonteeltaan retrospektiivisiä, mikä ei välttämättä tarjoa mahdollisuutta virheettömiin päätelmiin penetranssista. Kokonaisuutena yli 5000 potilaan aineistosta tehtyjä johtopäätöksiä voidaan pitää oikealla tavalla suuntaa antavina.

*Ennen tätä tutkimusta (III) tiedettiin vertauskuvallisesti ilmaistuna, kuka tärkeä ALS:ia aiheuttava tekijä on ja se, että hän asuu mm. Suomessa. Tämä tutkimus vastasi kysymykseen, mistä muualla maailmassa hän on löydettävissä.*

#### 9.4 OSATYÖ (IV)

ALS Suomessa. Valtamutaatiot ja kliiniset piirteet C9orf72-toistojaksomutaation kantajilla ja ei-kantajilla. (*Neurology Genet.* 2022)

*ALS in Finland Major Mutations and Clinical Characteristics of Patients With and Without the C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion*

Tutkimuksen aineiston muodostivat 836 MND:tä sairastavan näytteet. Näistä poistettiin niiden näytteet, joiden molemmat vanhemmat eivät olleet etnisiä suomalaisia (n = 15), niiden näytteet, joilla oli todettu SBMA (n = 2), ja niiden näytteet, joilla oli todettu SMAJ (n = 4). Näytteet jaettiin kategorioihin seuraavasti: SALS-A, SALS-NP, FALS-A, FALS-NP. Katgoria A tarkoitti ryhmää, jossa perheittäin esiintyvyys oli määritelty siten, että positiivinen sukuanamneesi ALS:n suhteen tarkoitti tilannetta, jossa ALS:ia sairastavan henkilön yhdellä tai useammalla I tai II-asteen sukulaisella oli todettu ALS. Katgoria NP tarkoitti ryhmää, jossa ALS:ia sairastavan yhdellä tai useammalla I tai II-asteen sukulaisella oli jokin neurologinen tai psykiatrinen sairaus (Taulukko 2.).

Tiivistettynä kategorisoidut ryhmät kattoivat laajasti sellaiset tilat, joita on raportoitu esiintyvän FTLD:n kirjon liitännäisinä. Tiedot kerättiin vastaanoton yhteydessä, tarvittaessa toistetusti. Niitä täydennettiin sairauskertomuksista ja kuolintodistuksista saaduilla tiedoilla. Kyselykaavakkeita tai erikseen koulutettuja haastattelihoita ei käytetty.

## Neurologiset sairaudet

ALS  
Frontotemporaalinen dementia (FTD)  
Alzheimerin tauti (AD)  
Lewy-kappaletauti (LBD)  
Parkinsonin tauti (PD)  
Huntingtonin tauti (HD)  
Muut dementoivat sairaudet, joiden taustalla ei ole verisuoniperäistä tai traumaattista syytä  
Ryhmäksi koottuna:  
Kortikobasaalinen degeneraatio (CBD)  
Monisysteemiatrofia (MSA)  
Etenevä supranukleaarinen halvaus (PSP)  
Polyneuropatiat (PNP)  
Myasthenia gravis (MG)  
Myasteeniset oireyhtymät  
Stiff-person oireyhtymä  
Luokitukseen ei sisälly:  
Vähäinen kognitiivinen tasonlasku (MCI)  
Vapinat  
Ataksiat  
Kohtaukselliset oireet  
Epilepsiat  
Aivoverenkiertohäiriöt (AVH)  
Vakava aivovamma  
Post-polio -oireyhtymä  
Multippeliskleroosi (MS)  
Migreeni  
Synnynnäiset kehityshäiriöt  
Etäispesäkkeet  
Keskushermoston primaarit kasvaimet  
Anekdotaaliset autismiryhmän häiriöt  
Myöhään alkava dementia (>80v)

## Psykiatriset sairaudet

Skitsofrenia (SCHZ)  
Psykoosit  
Harhaluulot  
Kaksisuuntainen mielialahäiriö  
Merkittävä päihteidenkäyttö/riippuvuus  
Itsemurha  
Ryhmäksi koottuna:  
Ahdistuneisuus\*  
Depressio\*  
Luokitukseen ei sisälly:  
Anekdotaaliset henkiset häiriöt  
Luonnehäiriöt  
Vaativa persoonallisuus (OCD)  
Epäspesifi apatia  
Anekdotaalinen *faux pas*

### Taulukko 2.

FALS-NP-luokitus. Yhdellä tai useammalla I- tai II-asteen verisukulaaisella todetut neurologiset tai psykiatriset sairaudet ja/tai tilat.

\* ahdistuneisuus- ja depressio olivat vaatineet erityistason hoitoa ja ne oli diagnosoitu ennen ALS:iin tai FTD:aan liitettävissä olevia oireita.

Näytteet genotyyppitettiin uudelleen, mikäli näytettä oli saatavilla (796/815). Normaalin ylärajana pidettiin  $\geq 45$  toistojaksoa (387). Seitsemässä näytteessä todettiin ns. intermediate - pituiset alleelit kaksin kappalein (7-45/17-45 toistojaksoa), minkä on todettu muodostavan riskitekijän ALS:lle (502). Näytteistä 772 genotyyppitettiin käyttämällä menetelmää FinnGen ThermoFisher Axiom custom array v2 (sisältäen myös osatyön I näytteitä), mikä mahdollisti *SOD1p.D91A:n* ja *SOD1p.A90V:n* määrittämiset imputoimalla. *SOD1p.D91A*-näytteistä 72 oli

lisäksi määritetty Turun yliopiston genetiikan yksikössä. *SOD1p.A90V*-mutaatio varmennettiin imputaation jälkeen sekvensoimalla.

Kaikista 815 potilaasta 31 % oli *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajia, 9,7 %:lla oli *SOD1*-mutaatio, ja 59 %:lla ALS:n aiheuttava syy oli tuntematon. Jompikumpi kahdesta yleisimmiksi päätellyistä mutaatioista eli *C9<sup>HRE</sup>* tai *SOD1p.D91A* löytyi yhteensä 328 (40 %) näytteestä.

Esiintyvyys perheittäin riippui käytetystä *FALS*:n määritelmästä. Käytettäessä määritelmää *FALS-A 203* (25 %) kaikista potilaista täytti kriteerit *FALS*. Nämä jakautuivat 158 erilliseen perheeseen, joista 91 (58 %) perheen jäsenet olivat *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajia. Perheistä 26 (16 %) koostui *SOD1p.D91A*-mutaation homotsygoottisista kantajista, ja 26 %:lla perheistä ALS:n aiheuttaja tai aiheuttajat eivät olleet tiedossa.

Kun käytettiin laajempaa määritelmää *FALS-NP*, 369 (45 %) kaikista potilaista olivat *FALS*-potilaita. Tällöin *FALS*-perheitä oli 326 erillistä, joista 167 (51 %) perheen jäsenet olivat ekspansion kantajia, 33 (10 %) perheen potilaat *SOD1p.D91A*:n homotsygootteja kantajia, ja tuntemattomasta syystä *FALS*-potilaita olivat 126 (39 %) perheen jäsenet.

Kun tutkittiin ekspansion aiheuttamaa kliinistä kuvaa, analyysiin sisällytettiin vain ryhmän A potilaat. Tästä joukosta poistettiin *SOD1*-mutaation kantajat ( $n=79$ ), koska heidän tautinsa tiedetään tavallista hitaammaksi. Lisäksi ne potilaat, joiden oireisto oli alkanut hengityselinlihasheikentyneenä, poistettiin, koska heillä elinajan tiedettiin joka tapauksessa alentuneeksi suhteessa muihin. Hengityselinlihasheikentyneenä ALS:n taustalta on sittemmin paljastunut yhteys geenivirheeseen *ERBB4*-geenissä(503). Osittain puuttuvan datan vuoksi ryhmästä A poistettiin 17 potilasta. Lopulliseen kliiniseen analyysiin valikoitui siten 707 potilasta.

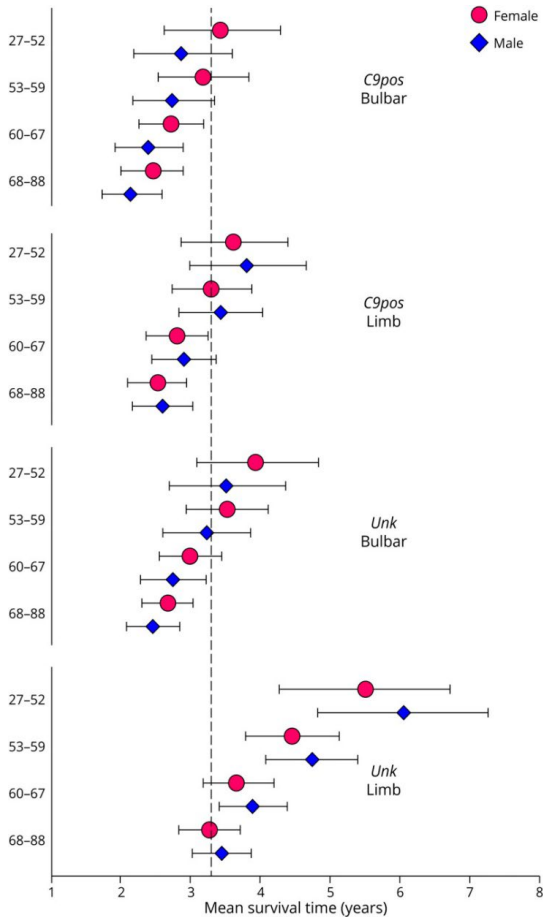
*C9<sup>HRE</sup>*:n kantajien sairastumisiän mediaani oli 58 vuotta ja tuntemattomasta syystä sairastuneiden 61,0 vuotta ( $p=0,0003$ ). Suurin ero sairastumisiän mediaaneissa nähtiin tuntemattomasta syystä sairastuneiden raaja-alkuisten (57 vuotta) ja bulbaarialkuisten (66 vuotta) välillä. *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajilla raaja-alkuisten sairastumisikä oli alempi kuin bulbaarialkuisten ( $p=0,048$ ). Tuntemattomasta syystä sairastuneiden miesten sairastumisikä oli alempi ( $p=0,018$ ) kuin naisten. Elinajan-analyysissä *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajien elinajan mediaani oli 2,0 (0,5 – 13,0) vuotta ja tuntemattomasta syystä sairastuneiden 3,0 (0,5 – 26,0) vuotta ( $p=0,0003$ ). *FALS-A* ja *SALS-A* ryhmien välillä ei ollut merkitseviä väestötieteellisiä eroja. ALS-FTD oli merkitsevästi yleisempi *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajilla (17 %) kuin tuntemattomasta syystä sairastuneilla (4 %), ( $p=2,27 \times 10^{-8}$ ). ALS-FTD oli yleisempi kombinaatio bulbaarialkuisilla verrattuna klassiseen ALS:iin (46 % vs 36 %), mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ( $p=0,13$ ).

Sairastumisikä vaikutti elinajaan enemmän tuntemattomasta syystä sairastuneilla kuin *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajilla. Kokonaisuutena *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajat muodostivat selkeästi homogeenisemmän ryhmän kuin tuntemattomasta syystä sairastuneet. *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajista vain 5 (2 %) eli yli 8 vuotta, ja vain 16 (6 %) sairastui aikaikkunan 40-70 vuotta ulkopuolella.

Logistisen regressioanalyysin (binäärinen) avulla mallinnettiin niitä kliinisiä piirteitä, jotka erottivat *C9<sup>HRE</sup>*:tä kantavat potilaat tuntemattomasta syystä ALS:iin sairastuneista. Menetelmällä saadaan todennäköisyyksiä, jotka voidaan ilmaista kerroinsuhteena (OR, Odds ratio). *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajuuteen löytyi merkittävä yhteys kuulumisella ryhmään *FALS-A*, aikaisempi sairastumisikä ja lyhyempi elossaoloaika. Suurempi (504) vaikutus oli elossaoloajalla (OR 10,7 - 14,4) ja *FALS-A*:lla (OR 8,9) ja keskierto sairastumisiällä (OR 5,3). Oireiden alkukohta ei liittynyt *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajuuteen.

Elosaoloaikaan vaikuttavien muuttujien analyysissä (Kuva 9.) *C9<sup>HRE</sup>*:tä kantavien keskimääräinen elossaoloaika (MST, mean survival time) oli lyhyempi kuin kohortin elossaoloaika riippumatta siitä, oliko tauti bulbaari- vai raaja-alkuinen. Tuntemattomasta syystä johtuvan ALS:n ryhmässä bulbaarialkuisten ennuste oli lähes yhtä huono kuin *C9<sup>HRE</sup>*:n kantajien. Sen sijaan raaja-alkuiset tuntemattomasta syystä ALS:ia sairastavat elivät kauemmin kuin kohortin jäsenet keskimäärin. MST oli bulbaarialkuista tautia sairastavilla

naisilla hieman pitempi kuin miehillä, mutta raaja-alkuisilla tilanne oli päinvastainen. Kaikissa ryhmissä korkea alkamisikä huononsi ennustetta viitaten siihen, että ikääntyminen vaikuttaa taudin progressiovahtiin.



**Kuva 9.**

Keskimääräinen elinaika (641 ALS-potilasta, 66 elossa kesäkuussa 2021). Pystysuora katkoviiva kuvaa kaikkien ryhmien keskiarvoa. C9 =  $C9^{HRE}$ :n kantajat, Unk = ei-kantajat, Limb = raaja-alkuiset, Bulbar = bulbaarialkuiset. Pystyakselilla ikäryhmät.

Eloönjäämisanalyysin Cox-regressiomallinnuksessa koskien koko kliinistä kohorttia todettiin, että ennustetekijöistä  $C9^{HRE}$ :n kantajuus, bulbaarialkuisuus ja korkeampi sairastumisikä kaikki lisäsivät kuoleman riskiä (HR, Hazard ratio, riskitehyssuhde) 1,5–2,0. Intermediate-alleelien analyysissä tutkittiin mahdollisuutta, että ne vaikuttaisivat alkamisajankohtaan tai elossaoloaikaan. Tilastollisesti merkitseviä yhteyksiä ei voitu osoittaa.

Yhteenvedona tutkimuksesta IV voidaan todeta, että geenin  $C9ORF72$  tautia aiheuttavan toistojaksomonistuman  $C9^{HRE}$  esiintymä koko 815 ALS:ia sairastavan kohortissa oli 31 %, 48 %-58 % FALS-perheissä ja 17 %-23 % SALS-potilaista riippuen siitä mitkä olivat käytetyt FALS:n kriteerit. Kaksi yleisintä mutaatiota ( $C9^{HRE}$  ja  $SOD1p.D91A$ ) yhteenlaskettuina löytyivät 40 %:lta potilaita, ja ne muodostavat siten merkittävän rikastuman Suomessa.



Niiden todellinen maanlaajuinen esiintymä ei kuitenkaan ollut pääteltävissä tämän tutkimuksen perusteella, koska tutkimus ei ollut väestöpohjainen. Viimeksi mainittua voidaan pitää tämän tutkimuksen merkittävimpänä puutteena, ja ALS:n todellisen esiintymän arvioiminen vaatiikin jatkotutkimuksia.

ALS:in hoitoon erikoistuneiden yksiköiden potilasmateriaalin pohjalta muodostetut kohortit pitivät sisällään lähettestä johtuvan harhan. Tässä tutkimuksessa saatujen mutaatioiden esiintymää kuvaaviin tuloksiin ei läheteharhan kuitenkaan katsottu ratkaisevasti vaikuttavan, koska kun aineistosta poistettiin HUS sairaanhoitopiirin ulkopuolelta lähetetyt potilaat, nähtiin merkittävä nousu vain *SOD1p.D91A*:n kantajien määrässä. Tämä puolestaan sopii *SOD1p.D91A*:n jo aiemmin osoitettuun ryvästymään Pohjois-Suomessa.

Molempien mutaatioiden kansainvälisesti korkea esiintymä kytkeytyy todennäköisimmin Suomen asutushistoriaan, pieneen perustajaväestöön, Itä- ja Länsi-Suomen väestön geneettiseen eroon ja pullonkaulailmiöihin. Tutkimuksessa arvioitiin myös, että Suomen suhteellisen korkea ikävakioitu ALS-esiintymä johtunee ensisijaisesti *C9ORF72*:n ekspansioista *C9<sup>HRE</sup>* ja toissijaisesti *SOD1p.D91A*-mutaatiosta. Suomessa *C9<sup>HRE</sup>* ja *SOD1p.D91A* yhdessä riittävät selittämään monogeenisen FALS:n lähes 90 %sti.

Tutkimuksessa käytettyjä FALS:n määritelmiä voidaan kritisoida. Tutkimuksen yhteenveto-osassa painotetaan sitä, että täysin hyväksyttyä yleistä ja yhteismitallisesti tutkimuksissa tuloksellisen vertailun mahdollistavaa määritelmää siitä, milloin ALS on katsottava perinnölliseksi tai perheittäin esiintyväksi, ei toistaiseksi ole. Tästäkin huolimatta SALS-tapausten osuus ekspansion kantajista on huomattava viitaten siihen, että suuressa osassa SALS-tapauksia syy on geneettinen, vaikka ilmeistä sukutaustaa ei olisikaan.

*Tämä osatutkimus (IV) vastasi vertauskuvallisesti ilmaistuna kysymykseen, missä määrin uusi ALS:ia aiheuttava tekijä on osaltaan syyllinen ALS-tautiin Suomessa, ja millä lailla hänen aiheuttamansa tauti eroaa muista syistä johtuvasta ALS:sta.*

## 10. JOHTOPÄÄTÖKSET

**Osatyö I:** Aiemmissa ALS:ia koskevissa GWAS-tutkimuksissa on usein kyetty vain välillisesti tunnistamaan uusia tautiin kytkeytyviä geneettisiä tekijöitä. Sellaisen yksittäisen lokuksen osoittaminen, joka olisi osoittautunut merkitseväksi Bonferroni-korjauksen jälkeen ja olisi ollut toistettavissa toisistaan riippumattomissa kohorteissa, ei ollut onnistunut GWAS-tutkimuksella. Syy tähän on ensisijaisesti ALS:n geneettinen ja alleelinen monimuotoisuus. Hyödyntämällä suomalaisen väestön isolaatinomaista luonnetta ja ALS:n suhteellisen suurta esiintymää tutkimuksella I voitiin osoittaa merkitsevä kytkevä kromosomiin 9. Suomalaiselle väestölle tunnusomaista *SOD1*p.D91A-mutaatiota voitiin hyödyntää positiivisena kontrollina, joka osoitti GWAS:n toimivuuden kohortissa. Kromosomin 9 mielenkiintoinen alue voitiin tiivistää 3 geeniä käsittäväksi, ja lisäksi voitiin osoittaa ALS:n riskiä merkitsevästi lisäävä haplotyyppi, josta sittemmin on käytetty myös nimitystä Finnish risk haplotype. Johtopäätös on, että huolella suunnitellulla GWAS-tutkimuksella on mahdollista löytää ALS:ia aiheuttavien mutaatioiden sijaintipaikkoja ihmisen genomissa ja Suomessa on tämän tutkimuksen perusteella kaksi valtamutaatiota, *C9<sup>HRE</sup>* ja *SOD1*p.D91A.

**Osatyö II:** Tutkimus tehtiin syvällisellä toisen sukupolven sekvensointitekniikalla (NGS) ja siinä tunnistettiin tutkimuksessa I löytynyt kromosomissa 9p21 sijaitseva ALS:iin kytkeytyvä tekijä 6 nukleotidin toistojaksomonistumaksi (HRE). Tunnistaminen osoittautui odotuksia työläemmäksi, ja syinä tähän olivat monistuman sijainti geenin *C9ORF72* ei-koodaavalla alueella. Yhteys ALS:iin voitiin varmentaa myös etniseltä taustaltaan muissa kuin suomalaisissa perheissä. Tutkimuksessa saatiin lisänäyttöä sille, että ALS ja FTD ovat saman jatkumona nähtävän sairauden ilmenemisiä, koska sairautta aiheuttava toistojaksomäärä voitiin osoittaa myös FTD-potilailla. Poikkeavan toistojaksoluvun raja-arvoksi arvioitiin yli 30 toistojaksoa. Myös suomalaisen riskihaplotyyppin esiintyminen voitiin varmentaa muissa eurooppalaisperäisissä populaatioissa. Tutkimuksessa määriteltiin toistojaksomonistuman tunnistamisessa sittemmin laajasti käyttöön otettu RP-PCR-tekniikka, ja tuotiin esille tekniikan puutteet. Tutkimuksessa todettiin, että mutatoituneen *C9ORF72*:n toiminta ja ilmeneminen kudoksissa vaatii paljon jatkotutkimuksia. Johtopäätös on, että kehittyvillä sekvensointitutkimuksilla on mahdollista löytää ALS:ia aiheuttavia geneettisiä mutaatioita ihmisen genomista, ja *C9<sup>HRE</sup>* näyttääytyy yleisimpänä tähän mennessä löydetystä ALS:ia ja FTD:tä aiheuttavista mutaatioista.

**Osatyö III:** Tutkimuksessa selvitettiin tutkimuksessa II löytyneen *C9ORF72*-toistojaksomonistuman (*C9<sup>HRE</sup>*) yleisyyttä 17 eri populaatiossa maailmanlaajuisesti. Mukana oli myös muita kuin valkoihoisia. Aineisto käsitti lähes 6000 potilasta, joilla oli ALS tai FTD ja kontrolleja oli yli 2500. Tutkimuksessa todettiin, että valkoihoisessa populaatiossa *C9<sup>HRE</sup>*:n osuus oli sporadisen ALS:n osalta n. 7 % ja sporadisen FTD:n osalta n. 6 %. Familiaalisen ALS:n osalta esiintymä oli n. 40 % ja familiaalisen FTD:n osalta n. 25 % (Suomessa 46 % ja 48 %). Ei-eurooppalaisessa väestössä esiintymä väheni sitä mukaa mitä enemmän siirryttiin Aasian ja Tyynen meren suuntaan Australiaa lukuun ottamatta. Myös mustan väestön ja espanjalaistaustaisen väestön esiintymät olivat eurooppalaistaustaista pienemmät. Myöhemmissä tutkimuksissa on sittemmin osoittautunut, että Aasiassa yleisin ALS:n valtamutaatio on *SOD1*. Kaikilla sairastavilla *C9<sup>HRE</sup>*-positiivisilla oli joko kokonaan tai osittain suomalainen perustajahaplotyyppi, minkä katsottiin sopivan ajatukseen, että mutaatio olisi syntynyt kerran historiassa n. 1500 vuotta sitten. Kertaluonteisen synnyn suhteen esitettiin myös varauksia.

Tutkimuksessa arvioitiin lisäksi toistojaksomutaation ikävakiointua penetranssia, ja sen todettiin olevan ei-penetrantti alle 35-vuotiailla, olevan 50 % penetrantti 58 ikävuoteen mennessä ja lähes 100 % penetrantti 80 ikävuoteen mennessä.

Johtopäätös on, että ihmisen genomista löytyvien ALS:ia ja FTD:tä aiheuttavan  $C9^{HRE}$  maantieteellinen esiintymä vaihtelee suuresti.

**Osatyö IV:** Tutkimuksessa kuvattiin 815 suomalaisen ALS-tautia sairastavan otoksen pohjalta ALS:n esiintymää Suomessa. Siinä todettiin, että sporadista muotoa sairastaa 55 % - 75 % potilaista, riippuen siitä miten SALS/FALS määritellään. Familiaalista muotoa sairastavia on 45 % - 25 % määritelmästä riippuen. Sama jako koskee tilannetta mutaatiokohtaisesti.  $C9ORF72$  -toistojaksomutaation  $C9^{HRE}$  kantajia oli 31 % koko 815 potilaan kohortista. Yhdessä mutaatiot  $C9^{HRE}$  ja  $SOD1p.D91A$  löytyivät 40 %:lta ALS:ia sairastavista. Tutkimuksesta todettiin myös, että luvut ovat suuntaa antavia, ja tarkemmat on mahdollista saada vain väestöpohjaisesta tutkimuksesta.

Tutkimuksessa FALS määriteltiin kahdella tavalla. Ensimmäinen oli perinteisempi, ja siinä potilas määriteltiin kategoriaan FALS, mikäli suvussa oli kaksi tai useampia ALS-tapauksia. Toinen kategoria määriteltiin laajemmin siten, että ALS-potilaan suvun yksi tai useampi henkilö, jolla oli jokin tietty neuropsykiatrinen sairaus, laajensi luokitteluun potilaan FALS-kategoriaan kuuluvaksi. Neuropsykiatristen sairauksien kirjo oli koostettu sellaisista sairauksista tai tiloista, joita tiedettiin esiintyvän FTD:n yhteydessä. Tällä laajennuksella pyrittiin tavoittamaan ALS-FTD kompleksin kliininen laajuus. Ongelmaksi nähtiin niiden FALS-potilaiden osuus, joita ei tällä laajennuksella tavoitettu.

$C9^{HRE}$ :n kliinistä kuvaa arvioitiin 707 kantajan kohortin pohjalta vertaamalla sitä niihin ALS:ia sairastaviin, joilla ei ollut  $C9^{HRE}$ :tä eikä  $SOD1$ -mutaatiota. Heidän osaltaan todettiin, että  $C9^{HRE}$ :n kantajat sairastuivat 3 vuotta nuorempina kuin ei-kantajat. Lisäksi heidän sairautensa kesto oli 1 vuoden lyhyempi kuin ei-kantajilla.

Ennen tätä tutkimusta maakohtaisesti tutkituissa kohorteissa korkeimmat  $C9^{HRE}$ :n esiintymät FALS-potilailla olivat Belgiassa ja Kreikassa (50 %), sen jälkeen Suomessa (46,6 %), kun taas  $SOD1$ -mutaatioiden vastaavat luvut (FALS) olivat korkeimmat Koreassa (54,7 %), Venäjällä (50%) ja Suomessa (42,9 %)(505). Näitä tuloksia on kuitenkin arvioitava sen valossa, että FALS:n määritelmät ovat olleet hyvinkin kirjavat, ja että Suomen osuutta nostaa  $SOD1p.D91A$ -potilaiden suuri osuus.

Osatyön IV johtopäätökset ovat, että  $C9^{HRE}$  löytyy merkittävältä määrältä suomalaisia sporadisia ALS-potilaita.  $C9^{HRE}$  selittää yhdessä  $SOD1p.D91A$ -mutaation kanssa valtaosan suomalaisesta FALS:sta. FALS:n määritelmä on  $C9^{HRE}$ :n kohdalla kuitenkin perinteistä epävarmempi. Löytö myös painottaa geneettisen selvittelyn painoarvoa kliinisiä lääketutkimuksia suunniteltaessa. Sporadisten tapausten suuri määrä tuo myös elementtejä sellaisen tutkimuksen kenttään, joka tähtää  $C9^{HRE}$ :n synty- ja vaikutusmekanismien selvittämiseen.

## 11. YHTEENVETO

ALS on sairaus, tai oikeammin oireyhtymä, josta on tehty noin 32 000 julkaistua tutkimusta. Sen perimmäinen syy on edelleen tuntematon, koska tunnettujen geenivirheiden tarkkoja vaikutusmekanismeja ei vielä ymmärretä. Pohjimmiltaan hermoston rappeumasairauksissa on nykyisin vallalla olevan käsityksen mukaan kyse hermosoluille tärkeiden proteiinien virheellisestä laskostumisesta. Muitakin syitä voi olla. Osalla näistä ongelmista näyttäisi olevan yhteisiä, nimenomaisesta geenivirheestä riippumattomia tapahtumaketjuja. Geenivirheet eivät todennäköisesti ole yksin syytä näihin ongelmiin, eikä edes perinnölliseksi ajatellun ALS:n määritelmä ole selkeä. On erittäin todennäköistä, että ALS:n taustalla on ympäristön, perimän ja sattuman monimutkainen yhteisvaikutus. Tieto perimän osuudesta on kuitenkin kasvanut viimeisen kolmenkymmenen vuoden aikana, etupäässä tekniikan kehityksen ja kansainvälisen yhteistyön myötä.

Tämä yhteenvedon osatöiden tulokset perustuvat ja ajoittuvat tutkimuksen historiassa kytkentäanalyyseihin ja toisen polven sekvensointitekniikoiden taitekohtaan. Ne ovat monen positiivisen osatekijän summa, ja sattumallakin on ollut osuutensa. Myös jopa vuosissa laskettavia taka-askelaita on osatöitä työstettäessä ollut. Tutkimus alkoi sairastuneiden verinäytteiden keräämisellä, ilman varsinaista *a priori* -ajatusta tai ylempää tullutta ohjausta. Aavistus perinnöllisestä elementistä vahvistui ensimmäisen ALS:iin kytkeytyvän mutaation löytymisen myötä. Tutkimuksen tekijällä ei myöskään ollut sen henkilökohtaisempaa tulokulmaa asiaan kuin tuntemattoman ihmeltely ja vaisto siitä, että tällaiseen pitäisi Suomessakin tarttua.

Tämän yhteenvedon osatyöt kertovat sen, että yksi erittäin merkittävä selittävä tekijä ALS:lle on löydetty, ja sen aiheuttama taudinkuva tunnetaan. Lisäksi saatiin tietoa sen yleisyydestä Suomessa ja maailmalla.

Selvitettävää on jäljellä paljon. On tutkittava miten *C9ORF72* ja sen tuote toimivat. On myös tarpeen määrittää, kuinka monta toistojaksoa – ja mitä muuta - tarvitaan, jotta noidankehä käynnistyy. Hoitotutkimuksia antisense-oligonukleotideilla on jo käynnistynyt sekä SOD1-että *C9ORF72*-ALS:n osalta, ja nämä tautimuodot onkin jatkossa syytä tunnistaa kaikissa kliinisissä lääketutkimuksissa. Laajemmin rappeumasairauksia koskeva kysymys on, missä kohtaa proteiinien laskostumisen laadunvalvonta pettää. Yksittäinen ihmisen kohdalla mysteeri on toistaiseksi sekin, miksi jotkut sairastuvat ALS:iin, toiset FTD:hen ja kolmannet kumpaankin. Jäljellä olevassa hyvässä on se, että lopulta tutkimus tuottaa näihin tauteihin hoidon.

## 12. KIITOKSET

Haluan osoittaa syvimät kiitokseni professoreille Jorma Palo ja Markku Kaste, jotka mahdollistivat tutkimuksen eteenpäin viemisen Helsingin yliopistollisen keskussairaalan Neurologian klinikassa. Erityisesti heidän asennetaan kuvaa hyväksyntä tilanteessa, jossa tämän yhteenvedon aihe ja aineisto eivät olleet heidän itsensä asettamia. Henkilökohtaisten asenteiden lisäksi tärkeätä on ollut kyky nähdä pitemmälle ja jakaa usko siihen, että myös ALS:n tutkiminen voi kannattaa.

Esitän kiitokseni myös Jorma Palon ja Markku Kasteen työtovereille ja seuraajille, erityisesti professori Markus Färkkilälle, dosentti, toimialajohtaja Nina Forsille ja dosentti, linjajohtaja Tiina Sairaselle. Ajankohtaisesti kiitän myös Neurokeskuksen poliklinikan ylilääkäriä, dosentti Sari Atulaa vaativan työyhteisön kokonaisuuden hallinnasta samalla tieteentekoa unohtamatta.

Kaikkein suurimmassa kiitollisuuden velassa olen ohjaajalleni professori Pentti J. Tienarille, joka tunnisti tämän tutkimuksen näyteaineiston mahdollisuudet. Professori Tienari on renessanssi-ihmisenä omannut kaikki ne kannustavat ominaisuudet, jotka ovat tarpeen erityisesti silloin, kun tutkimus ei tavoita sitä optimaalista virtaustilaa, jonka vallassa ollessaan se on tuloksellista. Syvälliset, mutta aina myös rakentavan huumorin sävyttämät keskustelut professori Tienarin kanssa ovat usean vuoden ajan olleet tätä työtä eteenpäin kantava voima. Olen kiitollinen myös mahdollisuudesta jatkaa yhteistyötämme.

Tämän yhteenvedon tulosten julkaisukuntoon saattamisesta olen kiitollinen myös dosentti Jyrki Launekselle, jonka ainutlaatuinen, tinkimättömän puristinenkin suhtautumistapa tieteentekoon on ollut henkilökemiallinen kaitsijaproteiini erilaisten rönsyilyjen kuriin saattamiselle ja ehto ennen kaikkea käsittämättömiin hienosäädön sfääreihin yltäneelle tutkimuksen matemaattisten metodien tulokselliselle hallinnalle. Toivon yhteistyömme jatkuvan.

Koska omakohtaiset yritykset kansainvälisen yhteistyön avaamiseksi kliiniselle suomalaiselle ALS-tutkimukselle eivät aina tuottaneet tulosta, on aivan olennainen kiitos annettava MD., Ph.D., MMSc. Bryan J. Traynorille NIH:sta eli Yhdysvaltain terveysvirastosta. Ilman Bryanin perinpohjaista tietoutta ALS:sta ja tutkimuksen metodeista ja käytännöistä ei tätä työtä olisi saatu aikaiseksi. Erityisesti tämä koskee osatöitä I ja II, joiden vaatimat menetelmät, bioinformatiikka, ja laajempi kansainvälinen yhteistyö rakentuivat nimenomaan Bryanin aiheenhallinnan ja rauhallisen persoonallisuuden myötä.

Aivan ratkaisevassa osassa on kaikkien osatöiden kannalta ollut laboratoriohoitaja Lilja Jansson Translationaalisen immunologian tutkimusohjelmasta (aiemmin 2011-2018 Molekyylineurologian tutkimusohjelma) Helsingin Biomedicum I:stä. Mikään ennalta asetettu toimenkuva ei voi tehdä oikeutta sille äärettömän suurelle työmäärälle, jonka Lilja on tehnyt järjestäessään ja analysoidessaan sanoin kuvaamattomalla tavalla epäjärjestyksessä ollutta näyteaineistoa, joka ei ollut edes mahtua aiempiin tutkimusyksiköihin. Tätä työtä ei olisi kukaan voinut tehdä ilman korvaamatonta kiinnostusta omaan tekemiseen ja intuitiivista tajuja tekemisen arvosta. Mainittakoon lisäksi, että taitavana laboratoriotyöntekijänä (liikanimeltään ”Goldfinger”) Lilja pystytti C9ORF72 HRE:n määritysmenetelmän Biomedicum I:n laboratorioon.

Kiitän myös tämän yhteenvedon esitarkastajia dosentti Mikko Kärppää ja dosentti Jussi Sipilää heidän asiantuntevista, oivaltavista ja rakentavista kommentistaan.

Tämän yhteenvedon osatöiden takana on joukko ihmisiä, jotka antoivat niiden aloittamiselle ja eteenpäin viemiselle panoksensa ilman että kukaan tai mikään järjestelmä olisi heitä siihen velvoittanut. Tämä tarkoittaa myös sitä, että he ovat uskoneet asiaan ja tekijään, ja tehneet osuutensa täysin ilman palkkiota tai muutakaan henkilökohtaista hyötyä.

Heihin kuuluvat Haagan Neurologisen kuntoutuskeskuksen ylilääkäri, LKT Mikael Ojala, joka ymmärsi, että tieteenteolle on syytä antaa mahdollisuus, vaikka välittömiä tuotantotaloudellisia hyötyjä ei olisikaan odotettavissa. Samoin toimi myös ylilääkäri, tutkimusprofessori Kiti Müller Työterveyslaitoksella. Heille on ilo antaa myöhäisetkin kiitokset.

Haagassa kaikkein kantavin voima oli maailman luultavasti paras näytteenottaja, Asta Hirvonen. Ilman hänen rauhallista ja potilaat esimerkillisellä tavalla huomioonottavaa toimintaansa mitään merkittävää määrää ALS-tutkimusnäytteitä ei olisi koskaan saatu kerättyä edes alkuun. Häntä on kiittäminen paitsi allekirjoittaneen myös jokaisen vuodesta 1992 eteenpäin kaikissa osatöissä mukana olleiden.

HUS Neurokeskuksen ALS-poliklinikan sairaanhoitaja Sari Järvisalo on myös henkilö, jonka omakohtainen asenne mahdollistanut sen olennaisimman, mitä tarvitaan nyt tehdyn kokonaisuuden loppuunsaattamisen: kyky tulla toimeen ALS:ia sairastavien kanssa, tarvittaessa hetkellisesti itseään säästämättä. Kyse on kyvystä, joka on vain tiettyyn pisteeseen asti opeteltavissa. Sarille olen niin ikään äärettömän kiitollinen. Sama koskee useita hänen kollegoitaan.

Pitkin kolmekymmenvuotista taivalta minulla on ollut ilo kohdata suuri joukko ihmisiä, jotka ovat antaneet panoksensa tähän työhön. Lista ei ole täydellinen, mutta kiitoksen ansaitsevat vähintäänkin seuraavat henkilöt: Terhi Peuralinna, Liisa Myllykangas, Anders Paetau, Raimo Sulkava, Karri Kaivola, Niina Urho, Jennika Hemminki, Hanne Tiainen, Sarimaarit Antila-Aalto, Marjaana Luisto, Terttu Erilä, Juho Nuutinen, Matti Jokelainen, Anna Kiviharju, Taina Nieminen, Leena Saikko, Mari Auranen, Tapani Salmi, Jussi Toppila, Raimo Ramstad, Mikko Kallela, Perttu Lindsberg, Laura Hokkanen, Olli Häppölä, Mervi Löfberg, Mika Saarela, Päivi Leimuvaara, Sirpa Esa, Pirjo Hagman, Satu Kivelä, Jaana Kassinen, Sanna Aromaa, Jaana Sauralehto-Vataja, Sabina Nurmela-Vartiainen ja HUS Neurologian poliklinikan sihteerit ja muu henkilökunta.

Kiitän myös professori Peter M. Andersenia Uumajan yliopistosta laajan ALS-tuntemuksen jakamisesta ja suomalaisen tutkijan vaikeuksien ymmärtämisestä.

Kiitän myös ystäviäni jaksamisesta ja sellaisten kanavien auki pitämisestä, jotka eivät kuljeta yksin ALS:ia. Erityisen kiitoksen tämän yhteenvedon taustavoimina ansaitsevat Seppo Salli ja Thomas Romantschuk.

Suurimmat kiitokset ja anteeksipyynnöt esitän perheelleni, erityisesti vaimolleni Merjalle, joka on väsymättömästi jaksanut tukea minua kaikkien vuosien läpi, jopa alussa, jolloin asiaan eivät minua tärkeämmät tahot kaikki uskoneet. Sama koskee poikiamme Aarnia ja Eeroa.

Kaikkein kiitollisin olen vanhemmilleni Eero ja Sirkka Laaksovirralle (o.s. Tuomola). Ilman heidän luottamustaan ja huolenpitoaan tämä työ ei olisi päässyt edes alkuun. Kiitollinen olen myös tuesta, jota olen saanut sisaruksiltani.

Kontaktit potilaisiin ovat olleet edellytys tämän tutkimuksen toteuttamiselle. Tässä ovat olleet tärkeitä Lihastautiliiton työntekijät ja ennen kaikkea Uudenmaan Lihatautiyhdistys ry:n toimihenkilöt, erityisesti Liisa Rautanen ja kumppanit.

Edellisen kaltainen kiitokset ansaitseva yhteistyökumppani on ollut myös ALStuttu eli ALS-tutkimuksen tuki ry, ja siinä erityisesti Heikki Holmström.

Lopulta kiitän kaikkia tapaamiani ALS:iin sairastuneita, joita en voi luetella tässä – heitä on yli 2000. Joukossa on ollut ja on lukuisia erittäin myönteisessä hengessä muistiin jääneitä suuria persoonallisuuksia.

Tämän tutkimustyön taloudellisesta tukemisesta kiitän Sigrid Juseliuksen säätiötä, Helsingin yliopistollista keskussairaala, Suomen Kulttuurirahastoa, Paulon säätiötä, Suomen Aivosäätiötä, Suomen Lääketieteen säätiötä, Suomalaista Lääkäriseura Duodecimia, ALS-tutkimuksen tuki ry:tä, Lihastautiliitto ry:tä ja Suomen Akatemiaa. Tutkimusta ovat tukeneet myös ulkomaiset rahoittajat kuten Microsoft Research Foundation, jonka rahoituksen turvin toteutettiin osatyö I. Merck Inc. USA rahoitti 315 suomalaisen ALS-potilaan ja 300 verrokin koko perimän sekvensoinnin vuosina 2013–2014. Osatyön II DNA-sekvensoinnin rahoituksessa keskeinen rahoittaja oli Intramural Research Programs of the NIH, National Institute on Aging, USA.

## 13. LÄHDEVIITTEET - REFERENCES

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931–45.
2. Varilo T. Suomalaisen väestön geneettinen rakenne. In: *Lääketieteellinen genetiikka* (Toim Kristiina Aittomäki, Jukka Moilanen, Markus Perola). 1st ed. Helsinki 2016. Duodecim; p. 326–45.
3. Salmela E, Lappalainen T, Fransson I, Andersen PM, Dahlman-Wright K, Fiebig A, et al. Genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms uncovers population structure in Northern Europe. *PloS One*. 2008;3(10):e3519.
4. Norio R. Suomi-neidon geenit. Tautiperinnön takana juurillemme johtamassa. 2000. Keuruu: Kustannusosakeyhtiö Otava. 320 p.
5. Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology*. 2007 Mar 27;68(13):1002–7.
6. Murros K, Fogelholm R. Amyotrophic lateral sclerosis in Middle-Finland: an epidemiological study. *Acta Neurol Scand*. 1983 Jan;67(1):41–7.
7. Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*. 1961 Dec 30;192:1227–32.
8. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953 Apr 25;171(4356):737–8.
9. Campbell MC, Tishkoff SA. African genetic diversity: implications for human demographic history, modern human origins, and complex disease mapping. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:403–33.
10. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980 May;32(3):314–31.
11. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. 1983 Nov 17;306(5940):234–8.
12. Paakkola T, Keskinen S, Pohjola P, Toivonen M, Ridanpää M, Hietala M, et al. Laajojen geenitutkimusten sivu- ja sattumalöydökset. *Duodecim* 2022;138(23):2111-7.
13. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*. 1997 Mar;15(3):293–7.
14. Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J*. 2001;1(2):152–6.



15. Depienne C, Mandel JL. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet.* 2021 May 6;108(5):764–85.
16. Paulson H. Chapter 9 - Repeat expansion diseases. In: Geschwind DH, Paulson HL, Klein C, editors. *Handb Clin Neurol.* 2018;147:105-123.
17. Sidore C, Busonero F, Maschio A, Porcu E, Naitza S, Zoledziewska M, et al. Genome sequencing elucidates Sardinian genetic architecture and augments association analyses for lipid and blood inflammatory markers. *Nat Genet.* 2015 Nov;47(11):1272–81.
18. Lasky-Su J. Chapter 19 -Statistical Techniques for Genetic Analysis. In: *Clinical and Translational Science Principles of Human Research.* 2017. Second Edition. Harvard Medical School, Boston, MA, United States: Academic Press; p. 347–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802101-9.00019-3>
19. Abascal F, Harvey LMR, Mitchell E, Lawson ARJ, Lensing SV, Ellis P, et al. Somatic mutation landscapes at single-molecule resolution. *Nature.* 2021 May;593(7859):405–10.
20. Cagan A, Baez-Ortega A, Brzozowska N, Abascal F, Coorens THH, Sanders MA, et al. Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals. *Nature.* 2022 Apr;604(7906):517–24.
21. Kondrashov AS. Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. *Hum Mutat.* 2003 Jan;21(1):12–27.
22. Blokzijl F, de Ligt J, Jager M, Sasselli V, Roerink S, Sasaki N, et al. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature.* 2016 Oct 13;538(7624):260–4.
23. Guo X, Dai X, Zhou T, Wang H, Ni J, Xue J, et al. Mosaic loss of human Y chromosome: what, how and why. *Hum Genet.* 2020 Apr;139(4):421–46.
24. Otto PA, Horimoto ARVR. Penetrance rate estimation in autosomal dominant conditions. *Genet Mol Biol.* 2012 Jul;35(3):583–8.
25. Al-Chalabi A, Lewis CM. Modelling the effects of penetrance and family size on rates of sporadic and familial disease. *Hum Hered.* 2011;71(4):281–8.
26. Dharmadasa T, Scaber J, Edmond E, Marsden R, Thompson A, Talbot K, et al. Genetic testing in motor neurone disease. *Pract Neurol.* 2022 Apr;22(2):107–16.
27. Järvelä I, Schleutker J, Haataja L, Santavuori P, Puhakka L, Manninen T, et al. Infantile form of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1) maps to the short arm of chromosome 1. *Genomics.* 1991 Jan;9(1):170–3.
28. Polvi A, Linturi H, Varilo T, Anttonen AK, Byrne M, Fokkema IFAC, et al. The Finnish disease heritage database (FinDis) update—a database for the genes mutated in the Finnish disease heritage brought to the next-generation sequencing era. *Hum Mutat.* 2013 Nov;34(11):1458–66.
29. Perheentupa J. Suomalainen tautiperintö kliinikon ja tutkijan kannalta. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim.* 1972;88(1):1–3.

30. Norio R, Nevanlinna HR, Perheentupa J. Hereditary diseases in Finland; rare flora in rare soul. *Ann Clin Res.* 1973 Jun;5(3):109–41.
31. Mantere T, Pylkäs K. Uudet long-read -teknologiat - kohti tarkennettua genomitietoa perinnöllisistä sairauksista ja syöivistä. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim.* 2022(10):921–8.
32. Grzybowski A, Kaufman MH. Sir Charles Bell (1774-1842): contributions to neuro-ophthalmology. *Acta Ophthalm Scand.* 2007 Vol 85, Issue 8/p.897-901.
33. Aran, FA. Recherches sur une maladie non encore décrite du système musculaire (atrophie musculaire progressive). *Arch Gén Méd.* 1850(24):5–35, 172–214.
34. Drouin E, Drouin AS, Péréon Y. Cruveilhier versus Charcot. *Lancet Neurol.* 2016 Apr;15(4):362.
35. Radcliffe, CB, Lockhart Clarke, J. An important case of paralysis and muscular atrophy with disease of the nervous centres. *Britt & Foreign Medico-Chirurgical Rev.* 1862(30):215–25.
36. Veltema AN. The case of the saltimbanque Prosper Lecomte. A contribution to the study of the history of progressive muscular atrophy (Aran-Duchenne) and amyotrophic lateral sclerosis (Charcot). *Clin Neurol Neurosurg.* 1975;78(3):204–9.
37. Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antéro-laterale. *Arch Physiol.* 1869;2:354–67, 744–60.
38. Charcot, J-M. De la sclérose latérale amyotrophique. *Prog Med.* 1874;(23):23:2453-555–7, 24:341-2; 29:
39. Charcot, J-M. Lectures on the diseases of the nervous system. Delivered at La Salpetriere. In London; (Sydenham Society; vol. 1881).
40. Erb, WH. Uber einen wenig bekannten spinalen syptom-complex. *Berl Klin Wochenschr.* 1875;(12):379–9.
41. Gowers WR, editor. *Manual of Diseases of the Nervous System.* 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia: Plakiston; 1899. 531 p.
42. Brain WR. *Diseases of the Nervous System.* London: Oxford University Press; 1933.
43. Rowland LP. Diverse forms of motor neuron diseases. *Adv Neurol.* 1982;36:1–13.
44. Pedro MKF, De Souza TFS. “Stat Rosa Pristina Nomine, Nomina Nuda Tenemus”: The Many Syndromes, Diseases, and Anatomic Structures Bearing Jean-Martin Charcot’s Name. *Eur Neurol.* 2020;83(5):550-553.
45. Jokelainen M. Amyotrophic lateral sclerosis in Finland II. Clinical characteristics. *Acta Neurol Scand.* 1977;56:194–204.
46. Wikström J, Paetau A, Palo J, Sulkava R, Haltia M. Classic amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Arch Neurol.* 1982 Nov;39(11):681–3.

47. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chiò A, Rix-Brooks B, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol*. 2016 Oct;15(11):1182–94.
48. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial ‘Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis’ workshop contributors. *J Neurol Sci*. 1994 Jul;124 Suppl:96–107.
49. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol*. 2000 Aug;57(8):1171–6.
50. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL, Diseases WF of NRG on MN. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Mot Neuron Disord Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis*. 2000 Dec;1(5):293–9.
51. Carvalho M de, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. The Awaji criteria for diagnosis of ALS. *Muscle Nerve*. 2011 Sep;44(3):456–7; author reply 457.
52. Vucic S, Ferguson TA, Cummings C, Hotchkin MT, Genge A, Glanzman R, et al. Gold Coast diagnostic criteria: Implications for ALS diagnosis and clinical trial enrollment. *Muscle Nerve*. 2021 Nov;64(5):532-537.
53. Chiò A, Mazzini L, D’Alfonso S, Corrado L, Canosa A, Moglia C, et al. The multistep hypothesis of ALS revisited: The role of genetic mutations. *Neurology*. 2018 Aug 14;91(7):e635–42.
54. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Mol Basel Switz*. 2019 Apr 22;24(8):E1583.
55. Pereira GRC, Vieira B de AA, De Mesquita JF. Comprehensive in silico analysis and molecular dynamics of the superoxide dismutase 1 (SOD1) variants related to amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2021;16(2):e0247841.
56. Guo C, Ma YY. Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Front Neural Circuits*. 2021;15:711564.
57. Donnelly CJ, Zhang PW, Pham JT, Heusler AR, Mistry NA, Vidensky S, et al. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron*. 2013 Oct 16;80(2):415–28.
58. Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Ahtoniemi T, Jaronen M, Arens E, Åkerman K, et al. Deleterious Role of Superoxide Dismutase in the Mitochondrial Intermembrane Space. *J Biol Chem*. 2008 Mar 28;283(13):8446-52.
59. Smith EF, Shaw PJ, De Vos KJ. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2019 Sep 25;710:132933.

60. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chaussonot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain J Neurol.* 2014 Aug;137(Pt 8):2329–45.
61. Penttilä S, Jokela M, Bouquin H, Saukkonen AM, Toivanen J, Udd B. Late onset spinal motor neuronopathy is caused by mutation in CHCHD10. *Ann Neurol.* 2015 Jan;77(1):163–72.
62. Querin G, Biferi MG, Pradat PF. Biomarkers for C9orf7-ALS in Symptomatic and Pre-symptomatic Patients: State-of-the-art in the New Era of Clinical Trials. *J Neuromuscul Dis.* 2022;9(1):25–37.
63. de Boer EMJ, van Rheenen W, Goedee HS, Kamsteeg EJ, Brilstra EH, Veldink JH, et al. Genotype-phenotype correlations of KIF5A stalk domain variants. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2021 Nov;22(7–8):561–70.
64. Gouel F, Rolland AS, Devedjian JC, Burnouf T, Devos D. Past and Future of Neurotrophic Growth Factors Therapies in ALS: From Single Neurotrophic Growth Factor to Stem Cells and Human Platelet Lysates. *Front Neurol.* 2019;10:835.
65. Eyileten C, Sharif L, Wicik Z, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Soplinska A, et al. The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* 2021 Jan;58(1):329–47.
66. Parkin Kullmann JA, Pamphlett R. Does the index-to-ring finger length ratio (2D:4D) differ in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? Results from an international online case-control study. *BMJ Open.* 2017 Aug 7;7(8):e016924.
67. Baradaran-Heravi Y, Van Broeckhoven C, van der Zee J. Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum. *Neurobiol Dis.* 2020 Feb;134:104639.
68. Geser F, Lee VMY, Trojanowski JQ. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: a spectrum of TDP-43 proteinopathies. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol.* 2010 Apr;30(2):103–12.
69. Versluys L, Ervilha Pereira P, Schuermans N, De Paepe B, De Bleeker JL, Bogaert E, et al. Expanding the TDP-43 Proteinopathy Pathway From Neurons to Muscle: Physiological and Pathophysiological Functions. *Front Neurosci.* 2022;16:815765.
70. Domínguez-Vivero C, Wu L, Lee S, Manoochchri M, Cines S, Brickman AM, et al. Structural Brain Changes in Pre-Clinical FTD MAPT Mutation Carriers. *J Alzheimers Dis JAD.* 2020;75(2):595–606.
71. Rhinn H, Tatton N, McCaughey S, Kurnellas M, Rosenthal A. Progranulin as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2022 Jan 15;S0165-6147(21)00232-7.
72. Dong W, Ma Y, Guan F, Zhang X, Chen W, Zhang L, et al. Ablation of C9orf72 together with excitotoxicity induces ALS in rats. *FEBS J.* 2021 Mar;288(5):1712–23.

73. Masrori P, Beckers J, Gossye H, Van Damme P. The role of inflammation in neurodegeneration: novel insights into the role of the immune system in C9orf72 HRE-mediated ALS/FTD. *Mol Neurodegener.* 2022 Mar 18;17(1):22.
74. Kiaei M, Kipiani K, Petri S, Choi DK, Chen J, Calingasan NY, et al. Integrative role of cPLA with COX-2 and the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2005 Apr;93(2):403–11.
75. Cudkovic ME, Shefner JM, Schoenfeld DA, Zhang H, Andreasson KI, Rothstein JD, et al. Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2006 Jul;60(1):22–31.
76. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc.* 2015 Mar;30(3):350–8.
77. Nicholson K, Bjornevik K, Abu-Ali G, Chan J, Cortese M, Dedi B, et al. The human gut microbiota in people with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2021 May;22(3–4):186–94.
78. Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, et al. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol.* 2007 Dec;6(12):1045–53.
79. Hamidou B, Couratier P, Besançon C, Nicol M, Preux PM, Marin B. Epidemiological evidence that physical activity is not a risk factor for ALS. *Eur J Epidemiol.* 2014 Jul;29(7):459–75.
80. Zhang G, Zhang L, Tang L, Xia K, Huang T, Fan D. Physical activity and amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study. *Neurobiol Aging.* 2021 Sep;105:374.e1-374.e4.
81. Mappin-Kasirer B, Pan H, Lewington S, Kizza J, Gray R, Clarke R, et al. Tobacco smoking and the risk of Parkinson disease: A 65-year follow-up of 30,000 male British doctors. *Neurology.* 2020 May 19;94(20):e2132–8.
82. Armon C. Smoking is a cause of amyotrophic lateral sclerosis. High low-density lipoprotein cholesterol levels? Unsure. *Ann Neurol.* 2019 Apr;85(4):465–9.
83. Opie-Martin S, Wootton RE, Budu-Aggrey A, Shatunov A, Jones AR, Iacoangeli A, et al. Relationship between smoking and ALS: Mendelian randomisation interrogation of causality. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020 Dec;91(12):1312–5.
84. Westeneng HJ, van Veenhuijzen K, van der Spek RA, Peters S, Visser AE, van Rheenen W, et al. Associations between lifestyle and amyotrophic lateral sclerosis stratified by C9orf72 genotype: a longitudinal, population-based, case-control study. *Lancet Neurol.* 2021 May;20(5):373–84.
85. Julian TH, Boddy S, Islam M, Kurz J, Whittaker KJ, Moll T, et al. A review of Mendelian randomization in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol.* 2021 Nov 16;awab420.
86. Armon C. Smoking is a cause of ALS. High LDL-cholesterol levels? Unsure. *Ann Neurol.* 2019 Mar 18;

87. Hyppönen E. Epidemiologisen tutkimuksen uudet menetelmät. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. 2007;123(4):379–80.
88. Sekula P, Del Greco M F, Pattaro C, Köttgen A. Mendelian Randomization as an Approach to Assess Causality Using Observational Data. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2016 Nov;27(11):3253–65.
89. Julian TH, Glasgow N, Barry ADF, Moll T, Harvey C, Klimentidis YC, et al. Physical exercise is a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: Convergent evidence from Mendelian randomisation, transcriptomics and risk genotypes. *EBioMedicine*. 2021 Jun;68:103397.
90. Newell ME, Adhikari S, Halden RU. Systematic and state-of-the science review of the role of environmental factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) or Lou Gehrig’s Disease. *Sci Total Environ*. 2022 Apr 15;817:152504.
91. Spencer PS, Palmer VS, Kisby GE. Western Pacific ALS-PDC: Evidence implicating cycad genotoxins. *J Neurol Sci*. 2020 Dec 15;419:117185.
92. Quinn AW, Phillips CR, Violi JP, Steele JR, Johnson MS, Westerhausen MT, et al.  $\beta$ -Methylamino-L-alanine-induced protein aggregation in vitro and protection by L-serine. *Amino Acids*. 2021 Sep;53(9):1351–9.
93. Marin B, Couratier P, Preux PM, Logroscino G. Can mortality data be used to estimate amyotrophic lateral sclerosis incidence? *Neuroepidemiology*. 2011;36(1):29–38.
94. Kurland LT. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. III. A genetic interpretation of incidence and geographic distribution. *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1957 Aug 21;32(17):449–62.
95. Plato CC, Garruto RM, Galasko D, Craig UK, Plato M, Gamst A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years. *Am J Epidemiol*. 2003 Jan 15;157(2):149–57.
96. Hirano A, Kurland LT, Krooth RS, Lessell S. Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. I. Clinical features. *Brain J Neurol*. 1961 Dec;84:642–61.
97. Gajdusek DC, Salazar AM. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonian syndromes in high incidence among the Auyu and Jakai people of West New Guinea. *Neurology*. 1982 Feb;32(2):107–26.
98. Okumiya K, Wada T, Fujisawa M, Ishine M, Garcia Del Saz E, Hirata Y, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism in Papua, Indonesia: 2001-2012 survey results. *BMJ Open*. 2014 Apr 16;4(4):e004353.
99. Giménez-Roldán S, Steele JC, Palmer VS, Spencer PS. Lytico-bodig in Guam: Historical links between diet and illness during and after Spanish colonization. *J Hist Neurosci*. 2021 Dec;30(4):335–74.
100. Dombroski BA, Galasko DR, Mata IF, Zabetian CP, Craig UK, Garruto RM, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat expansion and Guam amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonism-dementia complex. *JAMA Neurol*. 2013 Jun;70(6):742–5.

101. Chancellor AM, Warlow CP. Adult onset motor neuron disease: worldwide mortality, incidence and distribution since 1950. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992;55:1106–15.
102. Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology*. 2007 Mar 27;68(13):1002–7.
103. Murros K, Fogelholm R. Amyotrophic lateral sclerosis in Middle-Finland: an epidemiological study. *Acta Neurol Scand*. 1983;67:41–7.
104. Jokelainen M. Amyotrophic lateral sclerosis in Finland I: An epidemiologic study. *Acta Neurol Scand*. 1977;56:185–93.
105. Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):118–30.
106. Tagami M, Kimura F, Nakajima H, Ishida S, Fujiwara S, Doi Y, et al. Tracheostomy and invasive ventilation in Japanese ALS patients: decision-making and survival analysis: 1990-2010. *J Neurol Sci*. 2014 Sep 15;344(1–2):158–64.
107. Majounie E, Renton AE, Mok K, Doppler EGP, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012;11(4):323–30.
108. Chio A, Borghero G, Pugliatti M, Ticca A, Calvo A, Moglia C, et al. Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch Neurol*. 2011 May;68(5):594–8.
109. Laaksovirta H, Peuralinna T, Schymick JC, Scholz SW, Lai SL, Myllykangas L, et al. Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):978–85.
110. Marin B, Boumediene F, Logroscino G, Couratier P, Babron MC, Leutenegger AL, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2017 Feb 1;46(1):57–74.
111. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJW, et al. The Prevalence of Huntington’s Disease. *Neuroepidemiology*. 2016;46(2):144–53.
112. Ylönen S, Sipilä JOT, Hietala M, Majamaa K. HTT haplogroups in Finnish patients with Huntington disease. *Neurol Genet*. 2019 Jun;5(3):e334.
113. Chiò A, Magnani C, Schiffer D. Gompertzian analysis of amyotrophic lateral sclerosis mortality in Italy, 1957-1987; application to birth cohorts. *Neuroepidemiology*. 1995;14(6):269–77.
114. Marin B, Logroscino G, Boumediene F, Labrunie A, Couratier P, Babron MC, et al. Clinical and demographic factors and outcome of amyotrophic lateral sclerosis in relation to population ancestral origin. *Eur J Epidemiol*. 2016 Mar;31(3):229–45.

115. Phukan J, Elamin M, Bede P, Jordan N, Gallagher L, Byrne S, et al. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Jan;83(1):102–8.
116. Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, et al. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2020 Apr;267(4):944–53.
117. Murros K, Fogelholm R. Amyotrophic lateral sclerosis in Middle-Finland: an epidemiological study. *Acta Neurol Scand*. 1983 Jan;67(1):41–7.
118. Maasilta P, Jokelainen M, Löytönen M, Sabel CE, Gattrell AC. Mortality from amyotrophic lateral sclerosis in Finland, 1986-1995. *Acta Neurol Scand*. 2001 Oct;104(4):232–5.
119. Dorst J, Chen L, Rosenbohm A, Dreyhaupt J, Hübers A, Schuster J, et al. Prognostic factors in ALS: a comparison between Germany and China. *J Neurol*. 2019 Jun;266(6):1516–25.
120. Beghi E, Logroscino G, Chiò A, Hardiman O, Mitchell D, Swingler R, et al. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1762(11–12):1150–7.
121. Marin B, Fontana A, Arcuti S, Copetti M, Boumédiène F, Couratier P, et al. Age-specific ALS incidence: a dose-response meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2018 Jul;33(7):621–34.
122. Mehta P, Kaye W, Raymond J, Wu R, Larson T, Punjani R, et al. Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis — United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018 Feb 23;67(7):216-218.
123. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' A, Couratier P, Mitchell JD, et al. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2008 Jan;79(1):6-11.
124. Dandaba M, Couratier P, Labrunie A, Nicol M, Hamidou B, Raymondeau M, et al. Characteristics and Prognosis of Oldest Old Subjects with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2017;49(1-2):64-73.
125. Forbes RB, Colville S, Swingler RJ, Scottish ALS/MND Register. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS/MND) in people aged 80 or over. *Age Ageing*. 2004 Mar;33(2):131-4.
126. Byrne S, Jordan I, Elamin M, Hardiman O. Age at onset of amyotrophic lateral sclerosis is proportional to life expectancy. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2013 Dec;14(7–8):604–7.
127. McGrogan A, Madle GC, Seaman HE, de Vries CS. The epidemiology of Guillain-Barré syndrome worldwide. A systematic literature review. *Neuroepidemiology*. 2009;32(2):150–63.
128. Medina A, Mahjoub Y, Shaver L, Pringsheim T. Prevalence and Incidence of Huntington's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*. 2022 Dec;37(12):2327–35.



129. Vasta R, Moglia C, Manera U, Canosa A, Grassano M, Palumbo F, et al. What is amyotrophic lateral sclerosis prevalence? *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2021 Jun 21;1–6.
130. O’Toole O, Traynor BJ, Brennan P, Sheehan C, Frost E, Corr B, et al. Epidemiology and clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in Ireland between 1995 and 2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008 Jan;79(1):30–2.
131. Boman K, Meurman T. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1967;43:489–98.
132. Nuutila A, Wikström B. Epidemiologisia havaintoja eräiden neurologisten sairauksien aiheuttamasta työkyvyttömyydestä =: Epidemiological aspects of disability caused by certain neurological diseases. Helsinki; 1971. 2 p. (Helsingin yliopistollisen keskussairaalan psykiatrian klinikan julkaisusarja).
133. Jokelainen M, Palo J, Wikström J. The distribution of amyotrophic lateral sclerosis in Finland. *J Neurol Sci.* 1975;25:473–9.
134. Jokelainen M. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Finland. A study based on the death certificates of 421 patients. *J Neurol Sci.* 1976;29:55–63.
135. Jokelainen M. Amyotrophic Lateral Sclerosis in Finland. Epidemiological and Clinical Studies [Thesis]. Helsinki. University of Helsinki; 1978.
136. Penttilä S, Jokela M, Huovinen S, Saukkonen AM, Toivanen J, Lindberg C, et al. Late-onset spinal motor neuronopathy - a common form of dominant SMA. *Neuromuscul Disord NMD.* 2014 Mar;24(3):259–68.
137. Jokelainen M, Wikstrom J, Palo J. Effect of birthplace on the development of amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. A study among Finnish war evacuees. *Acta Neurol Scand.* 1979;60(5):283–8.
138. Jokelainen M, Palo J. Amyotrophic lateral sclerosis in Finland: Birthplaces of patients, parents and grandparents. *Acta Neurol Scand.* 1980;62:176–9.
139. Myllylä VV, Toivakka E, Ala-Hurula V, Hokkanen E, Emeryk-Szajewska B. Juvenile amyotrophic lateral sclerosis. A report of two cases in a single family. *Acta Neurol Scand.* 1979;60(3):170–7.
140. Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Tarvainen I, Haltia T, et al. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):61–6.
141. Jokelainen M, Palo J, Lokki J. Monozygous twins discordant for amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol.* 1978;17:296–9.
142. Joensen P. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the Faroe Islands. *Acta Neurol Scand.* 2012 Jul;126(1):62–6.
143. Johansen M, Svenstrup K, Mortensen O, Andorsdottir G, Steig BA, Joensen P, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in the Faroe Islands - a genealogical study. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2020 Sep 4;1–5.

144. Neilson S, Gunnarsson LG, Robinson I. Rising mortality from motor neurone disease in Sweden 1961-1990: the relative role of increased population life expectancy and environmental factors. *Acta Neurol Scand.* 1994 Sep;90(3):150–9.
145. Sabel CE, Gattrell AC, Löytönen M, Maasilta P, Jokelainen M. Modelling exposure opportunities: estimating relative risk for motor neurone disease in Finland. *Soc Sci Med* 1982. 2000 Apr;50(7–8):1121–37.
146. Sabel CE, Boyle PJ, Löytönen M, Gattrell AC, Jokelainen M, Flowerdew R, et al. Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis in Finland at place of birth and place of death. *Am J Epidemiol.* 2003 May 15;157(10):898–905.
147. Rostalski H, Korhonen V, Kuulasmaa T, Solje E, Krüger J, Gen F, et al. A Novel Genetic Marker for the C9orf72 Repeat Expansion in the Finnish Population. *J Alzheimers Dis JAD.* 2021;83(3):1325–32.
148. Logroscino G, Piccininni M. Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. *Neuroepidemiology.* 2019;52(1–2):93–103.
149. The Scottish Motor Neuron Disease Register: a prospective study of adult onset motor neuron disease in Scotland. Methodology, demography and clinical features of incident cases in 1989. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992 Jul;55(7):536–41.
150. Mitchell JD, Gibson HN, Gattrell A. Amyotrophic lateral sclerosis in Lancashire and South Cumbria, England, 1976-1986. A geographical study. *Arch Neurol.* 1990 Aug;47(8):875–80.
151. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997. A population-based study. *Neurology.* 1999;52:504–9.
152. Piemonte and Valle d'Aosta Register for Amyotrophic Lateral Sclerosis (PARALS). Incidence of ALS in Italy: Evidence for a uniform frequency in Western countries. *Neurology.* 2001 Jan 23;56(2):239-44.
153. Beghi E, Millul A, Micheli A, Vitelli E, Logroscino G, for the SLALOM Group. Incidence of ALS in Lombardy, Italy. *Neurology.* 2007 Jan 9;68(2):141-5.
154. Logroscino G, Beghi E, Zoccolella S, Palagano R, Fraddosio A, Simone IL, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in southern Italy: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Aug;76(8):1094-8.
155. Longinetti E, Regodón Wallin A, Samuelsson K, Press R, Zachau A, Ronnevi LO, et al. The Swedish motor neuron disease quality registry. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2018 Nov;19(7-8):528-537.
156. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 Apr;81(4):385-90.
157. Preux PM, Druet-Cabanac M, Couratier P, Debrock C, Truong T, Marcharia W, et al. Estimation of the amyotrophic lateral sclerosis incidence by capture-recapture method in the Limousin region of France. *J Clin Epidemiol.* 2000 Oct;53(10):1025–9.

158. Logroscino G, Marin B, Piccininni M, Arcuti S, Chio A, Hardiman O, et al. Referral bias in ALS epidemiological studies. *PLoS One*. 2018 Apr 16;13(4):e0195821.
159. Álvarez N, Díez L, Avellaneda C, Serra M, Rubio MÁ. Relevance of the pyramidal syndrome in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Barc Spain*. 2018 Feb;33(1):8–12.
160. Jericó I, Elizalde-Beiras I, Pagola I, Torné L, Galbete A, Delfrade-Osinaga J, et al. Clinical features and incidence trends of amyotrophic lateral sclerosis in Navarre, Spain, 2007-2018: a population-based study. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2021 Aug;22(5–6):401–9.
161. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial ‘Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis’ workshop contributors. *J Neurol Sci*. 1994 Jul;124 Suppl:96–107.
162. Chiò A, Hammond ER, Mora G, Bonito V, Filippini G. Development and evaluation of a clinical staging system for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Jan;86(1):38–44.
163. Roche JC, Rojas-García R, Scott KM, Scotton W, Ellis CE, Burman R, et al. A proposed staging system for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol*. 2012 Mar;135(Pt 3):847–52.
164. Chiò A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G, PARALS study group. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Jul;82(7):740–6.
165. Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis*. 2009 Dec;10(5–6):310–23.
166. Yunusova Y, Plowman EK, Green JR, Barnett C, Bede P. Clinical Measures of Bulbar Dysfunction in ALS. *Front Neurol*. 2019;10:106.
167. Gautier G, Verschueren A, Monnier A, Attarian S, Salort-Campana E, Pouget J. ALS with respiratory onset: clinical features and effects of non-invasive ventilation on the prognosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis*. 2010 Aug;11(4):379–82.
168. Al Khleifat A, Iacoangeli A, van Vugt JJFA, Bowles H, Moisse M, Zwamborn RAJ, et al. Structural variation analysis of 6,500 whole genome sequences in amyotrophic lateral sclerosis. *NPJ Genomic Med*. 2022 Jan 28;7(1):8.
169. Pinto WBVR, Debona R, Nunes PP, Assis ACD, Lopes CG, Bortholin T, et al. Atypical Motor Neuron Disease variants: Still a diagnostic challenge in Neurology. *Rev Neurol (Paris)*. 2019 Apr;175(4):221–32.
170. Beeldman E, Raaphorst J, Klein Twennaar M, Govaarts R, Pijnenburg YAL, de Haan RJ, et al. The cognitive profile of behavioural variant FTD and its similarities with ALS: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Sep;89(9):995–1002.

171. Xu L, He B, Zhang Y, Chen L, Fan D, Zhan S, et al. Prognostic models for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *J Neurol*. 2021 Sep;268(9):3361–70.
172. Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson MH, Ganesalingam J, et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology*. 2009 Mar 24;72(12):1087–94.
173. Faghri F, Brunn F, Dadu A, PARALS consortium, ERRALS consortium, Zucchi E, et al. Identifying and predicting amyotrophic lateral sclerosis clinical subgroups: a population-based machine-learning study. *Lancet Digit Health*. 2022 May;4(5):e359–69.
174. Almeida V, de Carvalho M, Scotto M, Pinto S, Pinto A, Ohana B, et al. Primary lateral sclerosis: predicting functional outcome. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2013 Mar;14(2):141–5.
175. Penttila S, Jokela M, Huovinen S, Saukkonen AM, Toivanen J, Lindberg C, et al. Late-onset spinal motor neuronopathy - a common form of dominant SMA. *Neuromuscul Disord NMD*. 2014 Mar;24(3):259–68.
176. Jokela ME, Udd B. Diagnostic Clinical, Electrodiagnostic and Muscle Pathology Features of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *J Mol Neurosci MN*. 2016 Mar;58(3):330–4.
177. Lund A, Udd B, Juvonen V, Andersen PM, Cederquist K, Davis M, et al. Multiple founder effects in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA, Kennedy disease) around the world. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2001 Jun;9(6):431–6.
178. Gromicho M, Pinto S, Gisca E, Pronto-Laborinho AC, Andersen PM, Carvalho M de. Frequency of C9orf72 hexanucleotide repeat expansion and SOD1 mutations in Portuguese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2018 Oct;70:325.e7-325.e15.
179. Zhang H, Chen L, Tian J, Fan D. Disease duration of progression is helpful in identifying isolated bulbar palsy of amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurol*. 2021 Oct 22;21(1):405.
180. Schreiber H, Gaigalat T, Wiedemuth-Catrinescu U, Graf M, Uttner I, Mucbe R, et al. Cognitive function in bulbar- and spinal-onset amyotrophic lateral sclerosis. A longitudinal study in 52 patients. *J Neurol*. 2005 Jul;252(7):772–81.
181. Lenglet T, Mirault J, Veyrat-Masson M, Funkiewiez A, Amador MDM, Bruneteau G, et al. Cursive Eye-Writing With Smooth-Pursuit Eye-Movement Is Possible in Subjects With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci*. 2019;13:538.
182. Lee J, Hong K, Shim H, Yoon Y, Kang S, Kim J, et al. Utilization of an alternative Communication Device using the Anal Sphincter (CDAS). *Conf Proc Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Conf*. 2005;2005:6817–20.
183. Swinnen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2014 Nov;10(11):661–70.
184. Goldstein LH, Abrahams S. Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. *Lancet Neurol*. 2013 Apr;12(4):368–80.

185. Chiò A, Moglia C, Canosa A, Manera U, Vasta R, Brunetti M, et al. Cognitive impairment across ALS clinical stages in a population-based cohort. *Neurology*. 2019 Sep 3;93(10):e984–94.
186. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain J Neurol*. 2011 Sep;134(Pt 9):2456–77.
187. Kertesz A, Ang LC, Jesso S, MacKinley J, Baker M, Brown P, et al. Psychosis and hallucinations in frontotemporal dementia with the C9ORF72 mutation: a detailed clinical cohort. *Cogn Behav Neurol Off J Soc Behav Cogn Neurol*. 2013 Sep;26(3):146–54.
188. Remes AM. Frontotemporaalinen degeneraatio - diagnostinen ja hoidollinen haaste. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*. 2010;126(18):2189–95.
189. Luukkainen L, Bloigu R, Moilanen V, Remes AM. Epidemiology of Frontotemporal Lobar Degeneration in Northern Finland. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra*. 2015 Dec;5(3):435–41.
190. Hogan DB, Jetté N, Fiest KM, Roberts JI, Pearson D, Smith EE, et al. The Prevalence and Incidence of Frontotemporal Dementia: a Systematic Review. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol*. 2016 Apr;43 Suppl 1:S96–109.
191. Logroscino G, Piccininni M, Graff C, Hardiman O, Ludolph AC, Moreno F, et al. Incidence of Syndromes Associated With Frontotemporal Lobar Degeneration in 9 European Countries. *JAMA Neurol*. 2023 Jan 30;e225128.
192. Deuschländer AB, Ross OA, Dickson DW, Wszolek ZK. Atypical parkinsonian syndromes: a general neurologist’s perspective. *Eur J Neurol*. 2018 Jan;25(1):41–58.
193. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain J Neurol*. 2011 Sep;134(Pt 9):2456–77.
194. Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, Mclaughlin P, Snowden J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2017 Jan 5;1–22.
195. Vinceti G, Olney N, Mandelli ML, Spina S, Hubbard HI, Santos-Santos MA, et al. Primary progressive aphasia and the FTD-MND spectrum disorders: clinical, pathological, and neuroimaging correlates. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2019 May;20(3–4):146–58.
196. Costello E, Lonergan K, Madden C, O’Sullivan M, Mays I, Heverin M, et al. Equivalency and practice effects of alternative versions of the Edinburgh Cognitive and Behavioral ALS Screen (ECAS). *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2020 Feb;21(1–2):86–91.
197. Lomen-Hoerth C, Murphy J, Langmore S, Kramer JH, Olney RK, Miller B. Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1094–7.
198. Raaphorst J, Beeldman E, Schmand B, Berkhout J, Linssen WHJP, van den Berg LH, et al. The ALS-FTD-Q: a new screening tool for behavioral disturbances in ALS. *Neurology*. 2012 Sep 25;79(13):1377–83.

199. Caga J, Hsieh S, Highton-Williamson E, Zoing MC, Ramsey E, Devenney E, et al. Apathy and its impact on patient outcome in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2018 Jan;265(1):187–93.
200. Lillo P, Garcin B, Hornberger M, Bak TH, Hodges JR. Neurobehavioral features in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. 2010 Jul;67(7):826–30.
201. Murphy JM, Henry RG, Langmore S, Kramer JH, Miller BL, Lomen-Hoerth C. Continuum of frontal lobe impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. 2007 Apr;64(4):530–4.
202. Yoshida M. Amyotrophic lateral sclerosis with dementia: the clinicopathological spectrum. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. 2004 Mar;24(1):87–102.
203. Ahmed RM, Devenney EM, Strikwerda-Brown C, Hodges JR, Piguet O, Kiernan MC. Phenotypic variability in ALS-FTD and effect on survival. *Neurology*. 2020 May 12;94(19):e2005–13.
204. Elamin M, Phukan J, Bede P, Jordan N, Byrne S, Pender N, et al. Executive dysfunction is a negative prognostic indicator in patients with ALS without dementia. *Neurology*. 2011 Apr 5;76(14):1263–9.
205. Snowden JS, Rollinson S, Thompson JC, Harris JM, Stopford CL, Richardson AMT, et al. Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations. *Brain J Neurol*. 2012 Mar;135(Pt 3):693–708.
206. Sabatelli M, Marangi G, Conte A, Tasca G, Zollino M, Lattante S. New ALS-Related Genes Expand the Spectrum Paradigm of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2016 Mar;26(2):266–75.
207. Wicks P, Abrahams S, Papps B, Al-Chalabi A, Shaw CE, Leigh PN, et al. SOD1 and cognitive dysfunction in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2009 Feb;256(2):234–41.
208. Beswick E, Forbes D, Hassan Z, Wong C, Newton J, Carson A, et al. A systematic review of non-motor symptom evaluation in clinical trials for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2022 Jan;269(1):411–26.
209. Cortés-Vicente E, Pradas J, Marín-Lahoz J, De Luna N, Clarimón J, Turon-Sans J, et al. Early diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: pros and cons of current clinical diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2017 Aug;18(5–6):333–40.
210. Yeh WZ, Dyck PJ, van den Berg LH, Kiernan MC, Taylor BV. Multifocal motor neuropathy: controversies and priorities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Feb;91(2):140–8.
211. Keddie S, Eftimov F, van den Berg LH, Brassington R, de Haan RJ, van Schaik IN. Immunoglobulin for multifocal motor neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022 Jan 11;1(1):CD004429.
212. Lenglet T, Camdessanché JP. Amyotrophic lateral sclerosis or not: Keys for the diagnosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2017 May;173(5):280–7.

213. Barp A, Ada Sansone V, Lunetta C. Challenges in diagnosis of motor neuron disease: A case series of ALS mimic syndromes. *Rev Neurol (Paris)*. 2021 Jun;177(6):699–706.
214. Tao QQ, Wei Q, Wu ZY. Sensory nerve disturbance in amyotrophic lateral sclerosis. *Life Sci*. 2018 Jun 15;203:242–5.
215. Filippakis A, Jara J, Ventura N, Scala S, Scopa C, Ruthazer R, et al. A prospective study of benign fasciculation syndrome and anxiety. *Muscle Nerve*. 2018 Dec;58(6):852–4.
216. Blackman G, Cherfi Y, Morrin H, Ellis CM, Bashford J, Ruths F, et al. The Association Between Benign Fasciculations and Health Anxiety: A Report of Two Cases and a Systematic Review of the Literature. *Psychosomatics*. 2019 Oct;60(5):499–507.
217. Turner MR, Talbot K. Mimics and chameleons in motor neurone disease. *Pract Neurol*. 2013 Jun;13(3):153–64.
218. Zoccollella S, Mastronardi A, Scarafino A, Iliceto G, D'Errico E, Fraddosio A, et al. Motor-evoked potentials in amyotrophic lateral sclerosis: potential implications in detecting subclinical UMN involvement in lower motor neuron phenotype. *J Neurol*. 2020 Dec;267(12):3689–95.
219. Brown WF, Ebers GC, Hudson AJ, Pringle CE, Veitch J. Motor-evoked responses in primary lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 1992 May;15(5):626–9.
220. Kuipers-Upmeyer J, de Jager AE, Hew JM, Snoek JW, van Weerden TW. Primary lateral sclerosis: clinical, neurophysiological, and magnetic resonance findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 Nov;71(5):615–20.
221. Torrieri MC, Monticelli M, Vasta R, Cofano F, Ajello M, Canosa A, et al. Comorbidity of Cervical Spondylogenic Myelopathy and Amyotrophic Lateral Sclerosis: When Electromyography Makes the Difference in Diagnosis. *Eur Neurol*. 2020;83(6):626–9.
222. Pinto S, Swash M, de Carvalho M. Does surgery accelerate progression of amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Jun;85(6):643–6.
223. Rajagopalan V, Pioro EP. Unbiased MRI Analyses Identify Micropathologic Differences Between Upper Motor Neuron-Predominant ALS Phenotypes. *Front Neurosci*. 2019;13:704.
224. Blain CRV, Brunton S, Williams VC, Leemans A, Turner MR, Andersen PM, et al. Differential corticospinal tract degeneration in homozygous 'D90A' SOD-1 ALS and sporadic ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Aug;82(8):843–9.
225. Bede P, Bokde ALW, Byrne S, Elamin M, McLaughlin RL, Kenna K, et al. Multiparametric MRI study of ALS stratified for the C9orf72 genotype. *Neurology*. 2013 Jul 23;81(4):361–9.
226. Walhout R, Schmidt R, Westeneng HJ, Verstraete E, Seelen M, van Rheenen W, et al. Brain morphologic changes in asymptomatic C9orf72 repeat expansion carriers. *Neurology*. 2015 Nov 17;85(20):1780–8.
227. Spinelli EG, Ghirelli A, Basaia S, Cividini C, Riva N, Canu E, et al. Structural MRI Signatures in Genetic Presentations of the Frontotemporal Dementia/Motor Neuron Disease Spectrum. *Neurology*. 2021 Oct 19;97(16):e1594–607.

228. Whitwell JL, Weigand SD, Boeve BF, Senjem ML, Gunter JL, DeJesus-Hernandez M, et al. Neuroimaging signatures of frontotemporal dementia genetics: C9ORF72, tau, progranulin and sporadics. *Brain J Neurol.* 2012 Mar;135(Pt 3):794–806.
229. Rohrer JD, Nicholas JM, Cash DM, van Swieten J, Dopper E, Jiskoot L, et al. Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) study: a cross-sectional analysis. *Lancet Neurol.* 2015 Mar;14(3):253–62.
230. Walhout R, Schmidt R, Westeneng HJ, Verstraete E, Seelen M, van Rheenen W, et al. Brain morphologic changes in asymptomatic C9orf72 repeat expansion carriers. *Neurology.* 2015 Nov 17;85(20):1780–8.
231. Pappa JM, Jiskoot LC, Panman JL, Dopper EG, den Heijer T, Donker Kaat L, et al. Cognition and gray and white matter characteristics of presymptomatic C9orf72 repeat expansion. *Neurology.* 2017 Sep 19;89(12):1256–64.
232. Heikkinen S, Cajanus A, Katisko K, Hartikainen P, Vanninen R, Haapasalo A, et al. Brainstem atrophy is linked to extrapyramidal symptoms in frontotemporal dementia. *J Neurol.* 2022 Aug;269(8):4488–4497.
233. Ducharme S, Bajestan S, Dickerson BC, Voon V. Psychiatric Presentations of C9orf72 Mutation: What Are the Diagnostic Implications for Clinicians? *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2017;29(3):195–205.
234. Bergeron D, Beauregard JM, Guimond J, Fortin MP, Houde M, Poulin S, et al. Clinical Impact of a Second FDG-PET in Atypical/Unclear Dementia Syndromes. *J Alzheimers Dis JAD.* 2016;49(3):695–705.
235. Mougios V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. *Br J Sports Med.* 2007 Oct;41(10):674–8.
236. Ceccanti M, Pozzilli V, Cambieri C, Libonati L, Onesti E, Frasca V, et al. Creatine Kinase and Progression Rate in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells.* 2020 May 8;9(5):1174.
237. Zhao X, Yang F, Wang H, Cui F, Li M, Sun B, et al. The increase in CSF total protein and immunoglobulins in Chinese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: A retrospective study. *J Neurol Sci.* 2020 Jul 15;414:116840.
238. Krause K, Wulf M, Sommer P, Barkovits K, Vorgerd M, Marcus K, et al. CSF Diagnostics: A Potentially Valuable Tool in Neurodegenerative and Inflammatory Disorders Involving Motor Neurons: A Review. *Diagn Basel Switz.* 2021 Aug 24;11(9):1522.
239. Thompson AG, Gray E, Charles PD, Hu MTM, Talbot K, Fischer R, et al. Network Analysis of the CSF Proteome Characterizes Convergent Pathways of Cellular Dysfunction in ALS. *Front Neurosci.* 2021;15:642324.
240. Barschke P, Oeckl P, Steinacker P, Al Shweiki MR, Weishaupt JH, Landwehrmeyer GB, et al. Different CSF protein profiles in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia with C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020 May;91(5):503–11.



241. Gertsman I, Wu J, McAlonis-Downes M, Ghassemian M, Ling K, Rigo F, et al. An endogenous peptide marker differentiates SOD1 stability and facilitates pharmacodynamic monitoring in SOD1 amyotrophic lateral sclerosis. *JCI Insight*. 2019 May 16;4(10):122768.
242. Miller T, Cudkowicz M, Shaw PJ, Andersen PM, Atassi N, Bucelli RC, et al. Phase 1-2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med*. 2020 Jul 9;383(2):109–19.
243. Vucic S, Rutkove SB. Neurophysiological biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2018 Oct;31(5):640–7.
244. Shefner JM, Rutkove SB, Caress JB, Benatar M, David WS, Cartwright MS, et al. Reducing sample size requirements for future ALS clinical trials with a dedicated electrical impedance myography system. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2018 Nov;19(7–8):555–61.
245. Querin G, Biferi MG, Pradat PF. Biomarkers for C9orf7-ALS in Symptomatic and Pre-symptomatic Patients: State-of-the-art in the New Era of Clinical Trials. *J Neuromuscul Dis*. 2022;9(1):25-37.
246. Saracino D, Dorgham K, Camuzat A, Rinaldi D, Rametti-Lacroux A, Houot M, et al. Plasma NfL levels and longitudinal change rates in C9orf72 and GRN-associated diseases: from tailored references to clinical applications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021 Dec;92(12):1278–88.
247. Sandelius Å, Zetterberg H, Blennow K, Adiutori R, Malaspina A, Laura M, et al. Plasma neurofilament light chain concentration in the inherited peripheral neuropathies. *Neurology*. 2018 Feb 6;90(6):e518–24.
248. Brodovitch A, Boucraut J, Delmont E, Parlanti A, Grapperon AM, Attarian S, et al. Combination of serum and CSF neurofilament-light and neuroinflammatory biomarkers to evaluate ALS. *Sci Rep*. 2021 Jan 12;11(1):703.
249. Falzone YM, Domi T, Agosta F, Pozzi L, Schito P, Fazio R, et al. Serum phosphorylated neurofilament heavy-chain levels reflect phenotypic heterogeneity and are an independent predictor of survival in motor neuron disease. *J Neurol*. 2020 Aug;267(8):2272–80.
250. Gendron TF, C9ORF72 Neurofilament Study Group, Daugherty LM, Heckman MG, Diehl NN, Wu J, et al. Phosphorylated neurofilament heavy chain: A biomarker of survival for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2017 Jul;82(1):139–46.
251. Behzadi A, Pujol-Calderón F, Tjust AE, Wuolikainen A, Höglund K, Forsberg K, et al. Neurofilaments can differentiate ALS subgroups and ALS from common diagnostic mimics. *Sci Rep*. 2021 Nov 11;11(1):22128.
252. Heller C, Foiani MS, Moore K, Convery R, Bocchetta M, Neason M, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein is raised in progranulin-associated frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Mar;91(3):263–70.
253. Benatar M, Zhang L, Wang L, Granit V, Statland J, Barohn R, et al. Validation of serum neurofilaments as prognostic and potential pharmacodynamic biomarkers for ALS. *Neurology*. 2020 Jul 7;95(1):e59–69.

254. Navarrete-Opazo A, Garrison S, Waite M. Molecular Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy: A Systematic Review. *Neurol Clin Pract.* 2021 Aug;11(4):e524–36.
255. Wurster CD, Steinacker P, Günther R, Koch JC, Lingor P, Uzelac Z, et al. Neurofilament light chain in serum of adolescent and adult SMA patients under treatment with nusinersen. *J Neurol.* 2020 Jan;267(1):36–44.
256. Rich KA, Fox A, Yalvac M, Heintzman S, Tellez M, Bartlett A, et al. Neurofilament Levels in CSF and Serum in an Adult SMA Cohort Treated with Nusinersen. *J Neuromuscul Dis.* 2022;9(1):111–9.
257. Meeter LHH, Gendron TF, Sias AC, Jiskoot LC, Russo SP, Donker Kaat L, et al. Poly(GP), neurofilament and grey matter deficits in C9orf72 expansion carriers. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018 May;5(5):583–97.
258. Järvillehto J, Harjuhaahto S, Palu E, Auranen M, Kvist J, Zetterberg H, et al. Serum Creatine, Not Neurofilament Light, Is Elevated in CHCHD10-Linked Spinal Muscular Atrophy. *Front Neurol.* 2022 Feb 17;13:793937.
259. Hendricks R, Baker D, Brumm J, Davancaze T, Harp C, Herman A, et al. Establishment of neurofilament light chain Simoa assay in cerebrospinal fluid and blood. *Bioanalysis.* 2019 Aug;11(15):1405–18.
260. Katisko K, Cajanus A, Huber N, Jääskeläinen O, Kokkola T, Kärkkäinen V, et al. GFAP as a biomarker in frontotemporal dementia and primary psychiatric disorders: diagnostic and prognostic performance. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2021 Dec;92(12):1305–12.
261. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III). *J Neurol Sci.* 1999 Oct 31;169(1–2):13–21.
262. Suhonen NM, Hallikainen I, Hänninen T, Jokelainen J, Krüger J, Hall A, et al. The Modified Frontal Behavioral Inventory (FBI-mod) for Patients with Frontotemporal Lobar Degeneration, Alzheimer’s Disease, and Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis JAD.* 2017;56(4):1241–51.
263. Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin.* 2015 Nov;33(4):855–76.
264. Jo M, Lee S, Jeon YM, Kim S, Kwon Y, Kim HJ. The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: integrating insights from clinical and experimental studies. *Exp Mol Med.* 2020 Oct;52(10):1652–62.
265. Teyssou E, Takeda T, Lebon V, Boillée S, Doukouré B, Bataillon G, et al. Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. *Acta Neuropathol (Berl).* 2013 Apr;125(4):511–22.
266. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2006 Oct 6;314(5796):130–3.

267. de Boer EMJ, Orié VK, Williams T, Baker MR, De Oliveira HM, Polvikoski T, et al. TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Nov 11;jnnp-2020-322983.
268. Mackenzie IRA, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, et al. A harmonized classification system for FTL-D-TDP pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011 Jul;122(1):111–3.
269. Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretzschmar HA, Mackenzie IRA. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain J Neurol*. 2009 Nov;132(Pt 11):2922–31.
270. Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):995–1007.
271. Agnello L, Colletti T, Lo Sasso B, Vidali M, Spataro R, Gambino CM, et al. Tau protein as a diagnostic and prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. 2021 Jun;28(6):1868–75.
272. Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*. 2007 May;61(5):427–34.
273. Forsberg K, Graffmo K, Pakkenberg B, Weber M, Nielsen M, Marklund S, et al. Misfolded SOD1 inclusions in patients with mutations in C9orf72 and other ALS/FTD-associated genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Aug;90(8):861–9.
274. Wechsler IS, Davison C. AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS WITH MENTAL SYMPTOMS. *Arch Neuropsych*. 1932;27(4):859–880.
275. Geser F, Martinez-Lage M, Robinson J, Uryu K, Neumann M, Brandmeir NJ, et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch Neurol*. 2009 Feb;66(2):180–9.
276. Zhang L, Chen Y, Liu M, Wang Y, Peng G. TDP-43 and Limbic-Predominant Age-Related TDP-43 Encephalopathy. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:376.
277. Nelson PT, Dickson DW, Trojanowski JQ, Jack CR, Boyle PA, Arfanakis K, et al. Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE): consensus working group report. *Brain J Neurol*. 2019 Jun 1;142(6):1503–27.
278. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:25.
279. Mackenzie IRA, Neumann M. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J Neurochem*. 2016 Aug;138 Suppl 1:54–70.
280. McAlary L, Yerbury JJ, Cashman NR. The prion-like nature of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2020;175:261–96.

281. Wong C, Stavrou M, Elliott E, Gregory JM, Leigh N, Pinto AA, et al. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and perspective. *Brain Commun.* 2021;3(4):fcab242.
282. Dorst J, Genge A. Clinical studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2022 Oct 1;35(5):686–92.
283. Ng L, Khan F, Young CA, Galea M. Symptomatic treatments for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jan 10;1:CD011776.
284. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 1994 Mar 3;330(9):585–91.
285. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet Lond Engl.* 1996 May 25;347(9013):1425–31.
286. Sala G, Arosio A, Conti E, Beretta S, Lunetta C, Riva N, et al. Riluzole Selective Antioxidant Effects in Cell Models Expressing Amyotrophic Lateral Sclerosis Endophenotypes. *Clin Psychopharmacol Neurosci Off Sci J Korean Coll Neuropsychopharmacol.* 2019 Aug 31;17(3):438–42.
287. Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med Res Rev.* 2019 Mar;39(2):733–48.
288. Norris FH. Ceftriaxone in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 1994 May;51(5):447.
289. Traynor BJ, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology.* 2006 Jul 11;67(1):20–7.
290. de Carvalho M, Pinto S, Costa J, Evangelista T, Ohana B, Pinto A. A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis.* 2010 Oct;11(5):456–60.
291. Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Mar 14;(3):CD001447.
292. Andrews JA, Jackson CE, Heiman-Patterson TD, Bettica P, Brooks BR, Pioro EP. Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2020 Jun 23;1–10.
293. Fang T, Khleifat AA, Meurgey JH, Jones A, Leigh PN, Bensimon G, et al. Stage at which riluzole treatment prolongs survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a retrospective analysis of data from a dose-ranging study. *The Lancet Neurology.* 2018 May;17(5):416–22.
294. Sojka P, Andersen PM, Forsgren L. Effects of riluzole on symptom progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Lond Engl.* 1997 Jan 18;349(9046):176–7.
295. Chiò A, Mazzini L, Mora G. Disease-modifying therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology.* 2020 May 1;167:107986.

296. Chen JJ. Overview of current and emerging therapies for amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Manag Care*. 2020 Aug;26(9 Suppl):S191–7.
297. Lunetta C, Moglia C, Lizio A, Caponnetto C, Dubbioso R, Giannini F, et al. The Italian multicenter experience with edaravone in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2020 Nov;267(11):3258–67.
298. Addressing the Role of Edaravone in the Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Gaps in Care and Access: Expert Panel Recommendations. 2021 Aug 3 [cited 2022 Feb 19]; Available from: <https://www.ajmc.com/view/addressing-the-role-of-edaravone-in-the-management-of-amyotrophic-lateral-sclerosis-and-gaps-in-care-and-access-expert-panel-recommendations>
299. Al-Chalabi A, Andersen PM, Chandran S, Chio A, Corcia P, Couratier P, et al. July 2017 ENCALS statement on edaravone. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2017 Nov;18(7–8):471–4.
300. Writing Group, Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2017 Jul;16(7):505–12.
301. Sun Y, Bedlack R, Armon C, Beauchamp M, Bertorini T, Bowser R, et al. ALSUntangled #64: butyrates. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2022, Vol23, Issue 7-8.
302. Khalaf K, Tornese P, Cocco A, Albanese A. Tauroursodeoxycholic acid: a potential therapeutic tool in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener*. 2022 Jun 4;11(1):33.
303. Paganoni S, Macklin EA, Hendrix S, Berry JD, Elliott MA, Maiser S, et al. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2020 Sep 3;383(10):919–30.
304. Paganoni S, Hendrix S, Dickson SP, Knowlton N, Macklin EA, Berry JD, et al. Long-term survival of participants in the CENTAUR trial of sodium phenylbutyrate-aurursodiol in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2021 Jan;63(1):31–9.
305. Paganoni S, Hendrix S, Dickson SP, Knowlton N, Berry JD, Elliott MA, et al. Effect of sodium phenylbutyrate/aurursodiol on tracheostomy/ventilation-free survival and hospitalisation in amyotrophic lateral sclerosis: long-term results from the CENTAUR trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022 May 16;93(8):871–5.
306. Paganoni S, Watkins C, Cawson M, Hendrix S, Dickson SP, Knowlton N, et al. Survival analyses from the CENTAUR trial in amyotrophic lateral sclerosis: Evaluating the impact of treatment crossover on outcomes. *Muscle Nerve*. 2022 Aug;66(2):136–41.
307. Chiriboga CA. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Rev Neurother*. 2017 Oct;17(10):955–62.
308. Singh RN, Ottesen EW, Singh NN. The First Orally Deliverable Small Molecule for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Neurosci Insights*. 2020;15:2633105520973985.
309. Amado DA, Davidson BL. Gene therapy for ALS: A review. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2021 Dec 1;29(12):3345–58.

310. Laaksovirta H, Ylikallio E, Auranen A, Isohanni P. Motoneuronitautien lääkehoito - uutuuksia näköpiirissä. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*. 2021(137(19)):1997–2003.
311. Miller TM, Cudkowicz ME, Genge A, Shaw PJ, Sobue G, Bucelli RC, et al. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med*. 2022 Sep 22;387(12):1099–110.
312. van Eijk RPA, Jones AR, Sproviero W, Shatunov A, Shaw PJ, Leigh PN, et al. Meta-analysis of pharmacogenetic interactions in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Neurology*. 2017 Oct 31;89(18):1915–22.
313. Cudkowicz M, Genge A, Maragakis N, Petri S, van den Berg L, Aho VV, et al. Safety and efficacy of oral levosimendan in people with amyotrophic lateral sclerosis (the REFALS study): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2021 Oct;20(10):821–31.
314. Ryan M, Heverin M, McLaughlin RL, Hardiman O. Lifetime Risk and Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2019 Nov 1;76(11):1367–74.
315. Beck J, Poulter M, Hensman D, Rohrer JD, Mahoney CJ, Adamson G, et al. Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am J Hum Genet*. 2013 Mar 7;92(3):345–53.
316. Byrne S, Bede P, Elamin M, Kenna K, Lynch C, McLaughlin R, et al. Proposed criteria for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis*. 2011 May;12(3):157–9.
317. Hanby MF, Scott KM, Scotton W, Wijesekera L, Mole T, Ellis CE, et al. The risk to relatives of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain J Neurol*. 2011 Dec;134(Pt 12):3454–7.
318. Westeneng HJ, van Veenhuijzen K, van der Spek RA, Peters S, Visser AE, van Rheenen W, et al. Associations between lifestyle and amyotrophic lateral sclerosis stratified by C9orf72 genotype: a longitudinal, population-based, case-control study. *Lancet Neurol*. 2021 May;20(5):373–84.
319. Ignatius J. Childhood Spinal Muscular Atrophy in Finland [Thesis]. Tampere. University of Tampere.1992.
320. McCann EP, Henden L, Fifita JA, Zhang KY, Grima N, Bauer DC, et al. Evidence for polygenic and oligogenic basis of Australian sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet*. 2020 May 14;jmedgenet-2020-106866.
321. van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EAM, Dooijes D, van Rheenen W, Medic J, et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2012 Sep 1;21(17):3776–84.
322. Kuuluvainen L, Kaivola K, Mönkäre S, Laaksovirta H, Jokela M, Udd B, et al. Oligogenic basis of sporadic ALS: The example of SOD1 p.Ala90Val mutation. *Neurol Genet*. 2019;5(3).

323. Hübers A, Just W, Rosenbohm A, Müller K, Marroquin N, Goebel I, et al. De novo FUS mutations are the most frequent genetic cause in early-onset German ALS patients. *Neurobiol Aging*. 2015 Nov;36(11):3117.e1-3117.e6.
324. Müller K, Oh KW, Nordin A, Panthi S, Kim SH, Nordin F, et al. De novo mutations in SOD1 are a cause of ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022 Feb;93(2):201–6.
325. Johnson JO, Chia R, Miller DE, Li R, Kumaran R, Abramzon Y, et al. Association of Variants in the SPTLC1 Gene With Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2021 Oct 1;78(10):1236–48.
326. Byrne S, Elamin M, Bede P, Hardiman O. Absence of consensus in diagnostic criteria for familial neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Apr;83(4):365–7.
327. Vajda A, McLaughlin RL, Heverin M, Thorpe O, Abrahams S, Al-Chalabi A, et al. Genetic testing in ALS: A survey of current practices. *Neurology*. 2017 Mar 7;88(10):991–9.
328. Graham AJ, Macdonald AM, Hawkes CH. British motor neuron disease twin study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997 Jun;62(6):562–9.
329. Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, et al. An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Dec;81(12):1324–6.
330. Wingo TS, Cutler DJ, Yarab N, Kelly CM, Glass JD. The heritability of amyotrophic lateral sclerosis in a clinically ascertained United States research registry. *PLoS One*. 2011;6(11):e27985.
331. van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, McLaughlin RL, Diekstra FP, Pulit SL, et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2016 Sep;48(9):1043–8.
332. McLaughlin RL, Schijven D, van Rheenen W, van Eijk KR, O'Brien M, Kahn RS, et al. Genetic correlation between amyotrophic lateral sclerosis and schizophrenia. *Nat Commun*. 2017 Mar 21;8:14774.
333. McLaughlin RL, Vajda A, Hardiman O. Heritability of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Insights From Disparate Numbers. *JAMA Neurol*. 2015 Aug;72(8):857–8.
334. Cooper-Knock J. Implications of confirmed de novo pathogenic SOD1 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022 Feb;93(2):118.
335. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Jan 5;
336. Mentula HK, Tuovinen L, Penttilä S, Suominen T, Udd B, Palmio J. TARDBP mutations are not a frequent cause of ALS in Finnish patients. *Acta Myol Myopathies Cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol*. 2012 Oct;31(2):134–8.

337. Kaivorinne AL, Moilanen V, Kervinen M, Renton AE, Traynor BJ, Majamaa K, et al. Novel TARDBP sequence variant and C9ORF72 repeat expansion in a family with frontotemporal dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2014 Jun;28(2):190–3.
338. Luukkainen L, Helisalml S, Kytövuori L, Ahmasalo R, Solje E, Haapasalo A, et al. Mutation Analysis of the Genes Linked to Early Onset Alzheimer’s Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. *J Alzheimers Dis JAD*. 2019;69(3):775–82.
339. Brown CA, Lally C, Kupelian V, Flanders WD. Estimated Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *Neuroepidemiology*. 2021;55(5):342-353.
340. He J, Tang L, Benyamin B, Shah S, Hemani G, Liu R, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in Chinese sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2015 Sep;36(9):2660.e1-8.
341. Smith BN, Newhouse S, Shatunov A, Vance C, Topp S, Johnson L, et al. The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2013 Jan;21(1):102–8.
342. Mok K, Traynor BJ, Schymick J, Tienari PJ, Laaksovirta H, Peuralinna T, et al. Chromosome 9 ALS and FTD locus is probably derived from a single founder. *Neurobiol Aging*. 2012 Jan;33(1):209.e3-8.
343. Munafò MR, Tilling K, Taylor AE, Evans DM, Davey Smith G. Collider scope: when selection bias can substantially influence observed associations. *Int J Epidemiol*. 2018 Feb 1;47(1):226–35.
344. van Rheenen W, van der Spek RAA, Bakker MK, van Vugt JJFA, Hop PJ, Zwamborn RAJ, et al. Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. *Nat Genet*. 2021 Dec;53(12):1636-1648.
345. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*. 2015 Mar 27;347(6229):1436–41.
346. Diekstra FP, Van Deerlin VM, van Swieten JC, Al-Chalabi A, Ludolph AC, Weishaupt JH, et al. C9orf72 and UNC13A are shared risk loci for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a genome-wide meta-analysis. *Ann Neurol*. 2014 Jul;76(1):120–33.
347. Bennett SA, Tanaz R, Cobos SN, Torrente MP. Epigenetics in amyotrophic lateral sclerosis: a role for histone post-translational modifications in neurodegenerative disease. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2019 Feb;204:19–30.
348. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*. 2010 Dec 9;68(5):857–64.
349. Peggion C, Scalcon V, Massimino ML, Nies K, Lopreiato R, Rigobello MP, et al. SOD1 in ALS: Taking Stock in Pathogenic Mechanisms and the Role of Glial and Muscle Cells. *Antioxid Basel Switz*. 2022 Mar 23;11(4):614.



350. Bonifacino T, Zerbo RA, Balbi M, Torazza C, Frumento G, Fedele E, et al. Nearly 30 Years of Animal Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Overview and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 12;22(22):12236.
351. Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T. The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol Genet Genomics MGG*. 2013 Jun;288(5–6):207–29.
352. Awano T, Johnson GS, Wade CM, Katz ML, Johnson GC, Taylor JF, et al. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2794–9.
353. Winger FA, Zeng R, Johnson GS, Katz ML, Johnson GC, Bush WW, et al. Degenerative myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a novel SOD1 missense mutation. *J Vet Intern Med*. 2011 Oct;25(5):1166–70.
354. Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*. 2021 Jan 15;697:108701.
355. Zeineddine R, Pundavela JF, Corcoran L, Stewart EM, Do-Ha D, Bax M, et al. SOD1 protein aggregates stimulate macropinocytosis in neurons to facilitate their propagation. *Mol Neurodegener*. 2015 Oct 31;10:57.
356. Ayers JI, Diamond J, Sari A, Fromholt S, Galaleldeen A, Ostrow LW, et al. Distinct conformers of transmissible misfolded SOD1 distinguish human SOD1-FALS from other forms of familial and sporadic ALS. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2016 Dec;132(6):827–40.
357. Ozdinler PH, Benn S, Yamamoto TH, Güzel M, Brown RH, Macklis JD. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1<sup>G<sup>93</sup>A</sup> transgenic ALS mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011 Mar 16;31(11):4166–77.
358. Rosen DR. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993 Jul 22;364(6435):362.
359. Saeed M, Yang Y, Deng HX, Hung WY, Siddique N, Dellefave L, et al. Age and founder effect of SOD1 A4V mutation causing ALS. *Neurology*. 2009 May 12;72(19):1634–9.
360. Farrugia Wismayer M, Farrugia Wismayer A, Pace A, Vassallo N, Cauchi RJ. SOD1 D91A variant in the southernmost tip of Europe: a heterozygous ALS patient resident on the island of Gozo. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2021 Oct 7;
361. Parton MJ, Broom W, Andersen PM, Al-Chalabi A, Nigel Leigh P, Powell JF, et al. D90A-SOD1 mediated amyotrophic lateral sclerosis: a single founder for all cases with evidence for a Cis-acting disease modifier in the recessive haplotype. *Hum Mutat*. 2002 Dec;20(6):473.
362. Broom WJ, Johnson DV, Garber M, Andersen PM, Lennon N, Landers J, et al. DNA sequence analysis of the conserved region around the SOD1 gene locus in recessively inherited ALS. *Neurosci Lett*. 2009 Sep 29;463(1):64–9.

363. Feneberg E, Turner MR, Ansorge O, Talbot K. Amyotrophic lateral sclerosis with a heterozygous D91A SOD1 variant and classical ALS-TDP neuropathology. *Neurology*. 2020 Sep 29;95(13):595–6.
364. Andersen PM, Forsgren L, Binzer M, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, et al. 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 J Neurol*. 1996 Aug;119 ( Pt 4):1153–72.
365. Katz JS, Katzberg HD, Woolley SC, Marklund SL, Andersen PM. Combined fulminant frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis associated with an I113T SOD1 mutation. *Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis*. 2012 Oct;13(6):567–9.
366. Kuuluvainen L, Kaivola K, Mönkäre S, Laaksovirta H, Jokela M, Udd B, et al. Oligogenic basis of sporadic ALS: The example of SOD1 p.Ala90Val mutation. *NeurologyGenetics*. 2019 Apr 23;5(3):e335.
367. Takei Y, Ouchi K, Koshihara H, Hineno A, Nakamura A, Ohara S.  $\alpha$ -Synuclein coaggregation in familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 gene mutation. *Hum Pathol*. 2013 Jun;44(6):1171–6.
368. Turner MR, Osei-Lah AD, Hammers A, Al-Chalabi A, Shaw CE, Andersen PM, et al. Abnormal cortical excitability in sporadic but not homozygous D90A SOD1 ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Sep;76(9):1279–85.
369. Andersen PM, Nilsson P, Keränen ML, Forsgren L, Hägglund J, Karlsborg M, et al. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain J Neurol*. 1997 Oct;120 ( Pt 10):1723–37.
370. Müller K, Oh KW, Nordin A, Panthi S, Kim SH, Nordin F, et al. De novo mutations in SOD1 are a cause of ALS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022 Feb;93(2):201–6.
371. Vucic S, Nicholson GA, Chio A, Kiernan MC. Apparent anticipation in SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2013 Sep;14(5–6):452–6.
372. Khan M, Olivier J. Regression to the mean for the bivariate binomial distribution. *Stat Med*. 2019 Jun 15;38(13):2391–412.
373. Smeyers J, Banchi EG, Latouche M. C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:661447.
374. Burberry A, Suzuki N, Wang JY, Moccia R, Mordes DA, Stewart MH, et al. Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Sci Transl Med*. 2016 Jul 13;8(347):347ra93.
375. Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, et al. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA*. 2000 Oct 4;284(13):1664–9.

376. Boxer AL, Mackenzie IR, Boeve BF, Baker M, Seeley WW, Crook R, et al. Clinical, neuroimaging and neuropathological features of a new chromosome 9p-linked FTD-ALS family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Feb;82(2):196–203.
377. Pearson JP, Williams NM, Majounie E, Waite A, Stott J, Newsway V, et al. Familial frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis and a shared haplotype on chromosome 9p. *J Neurol*. 2011 Apr;258(4):647–55.
378. Morita M, Al-Chalabi A, Andersen PM, Hosler B, Sapp P, Englund E, et al. A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology*. 2006 Mar 28;66(6):839–44.
379. Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain J Neurol*. 2006 Apr;129(Pt 4):868–76.
380. van Es MA, Veldink JH, Saris CGJ, Blauw HM, van Vught PWJ, Birve A, et al. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1083–7.
381. Shatunov A, Mok K, Newhouse S, Weale ME, Smith B, Vance C, et al. Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*. 2010 Oct;9(10):986–94.
382. Van Deerlin VM, Sleiman PMA, Martinez-Lage M, Chen-Plotkin A, Wang LS, Graff-Radford NR, et al. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):234–9.
383. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):257–68.
384. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245–56.
385. Reus LM, Jansen IE, Mol MO, van Ruissen F, van Rooij J, van Schoor NM, et al. Genome-wide association study of frontotemporal dementia identifies a C9ORF72 haplotype with a median of 12-G4C2 repeats that predisposes to pathological repeat expansions. *Transl Psychiatry*. 2021 Sep 2;11(1):451.
386. Kaivola K, Kiviharju A, Jansson L, Rantalainen V, Eriksson JG, Strandberg TE, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat length in older population: normal variation and effects on cognition. *Neurobiol Aging*. 2019 Dec;84:242.e7-242.e12.
387. Kaivola K, Salmi SJ, Jansson L, Launes J, Hokkanen L, Niemi AK, et al. Carriership of two copies of C9orf72 hexanucleotide repeat intermediate-length alleles is a risk factor for ALS in the Finnish population. *Acta Neuropathol Commun*. 2020 Nov 9;8(1):187.
388. Fratta P, Polke JM, Newcombe J, Mizielinska S, Lashley T, Poulter M, et al. Screening a UK amyotrophic lateral sclerosis cohort provides evidence of multiple origins of the C9orf72 expansion. *Neurobiol Aging*. 2015 Jan;36(1):546.e1-7.

389. Liu X, He J, Gao FB, Gitler AD, Fan D. The epidemiology and genetics of Amyotrophic lateral sclerosis in China. *Brain Res.* 2018 Aug 15;1693(Pt A):121–6.
390. Chen YP, Yu SH, Wei QQ, Cao B, Gu XJ, Chen XP, et al. Role of genetics in amyotrophic lateral sclerosis: a large cohort study in Chinese mainland population. *J Med Genet.* 2021 Sep 20;jmedgenet-2021-107965.
391. Liu L, Cui B, Chu M, Cui Y, Jing D, Li D, et al. The Frequency of Genetic Mutations Associated With Behavioral Variant Frontotemporal Dementia in Chinese Han Patients. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:699836.
392. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, et al. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol.* 2012 Sep;69(9):1154–8.
393. Renton AE, Chio A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17(1):17–23.
394. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EGP, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 2012 Apr;11(4):323–30.
395. Pliner HA, Mann DM, Traynor BJ. Searching for Grendel: origin and global spread of the C9ORF72 repeat expansion. *Acta Neuropathol (Berl).* 2014 Mar;127(3):391–6.
396. Tsai CP, Soong BW, Tu PH, Lin KP, Fuh JL, Tsai PC, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 causes familial and sporadic ALS in Taiwan. *Neurobiol Aging.* 2012 Sep;33(9):2232.e11-2232.e18.
397. He J, Tang L, Benyamin B, Shah S, Hemani G, Liu R, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in Chinese sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2015 Sep;36(9):2660.e1-8.
398. Shamim U, Ambawat S, Singh J, Thomas A, Pradeep-Chandra-Reddy C, Suroliya V, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in Indian patients with ALS: a common founder and its geographical predilection. *Neurobiol Aging.* 2020 Apr;88:156.e1-156.e9.
399. Chiang HH, Forsell C, Lindström AK, Lilius L, Thonberg H, Nennesmo I, et al. No common founder for C9orf72 expansion mutation in Sweden. *J Hum Genet.* 2017 Feb;62(2):321–4.
400. Logroscino G, Piccininni M. Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. *Neuroepidemiology.* 2019;52(1–2):93–103.
401. Leckie JN, Joel MM, Martens K, King A, King M, Korngut LW, et al. Highly Elevated Prevalence of Spinobulbar Muscular Atrophy in Indigenous Communities in Canada Due to a Founder Effect. *Neurol Genet.* 2021 Aug;7(4):e607.
402. Paunio T, Sunada Y, Kiuru S, Makishita H, Ikeda S, Weissenbach J, et al. Haplotype analysis in gelsolin-related amyloidosis reveals independent origin of identical mutation (G654A) of gelsolin in Finland and Japan. *Hum Mutat.* 1995;6(1):60–5.

403. Lee JM, Kim KH, Shin A, Chao MJ, Abu Elneel K, Gillis T, et al. Sequence-Level Analysis of the Major European Huntington Disease Haplotype. *Am J Hum Genet.* 2015 Sep 3;97(3):435–44.
404. Mitas M, Yu A, Dill J, Kamp TJ, Chambers EJ, Haworth IS. Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat: (CTG)<sub>15</sub>. *Nucleic Acids Res.* 1995 Mar 25;23(6):1050–9.
405. Ranganathan R, Haque S, Coley K, Shephard S, Cooper-Knock J, Kirby J. Multifaceted Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia. *Front Neurosci.* 2020;14:684.
406. Pang W, Hu F. Cellular and physiological functions of C9ORF72 and implications for ALS/FTD. *J Neurochem.* 2021 May;157(3):334–50.
407. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011 Oct 20;72(2):257–68.
408. Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, et al. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2013 Aug;74(2):180–7.
409. Shi Y, Lin S, Staats KA, Li Y, Chang WH, Hung ST, et al. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nat Med.* 2018 Mar;24(3):313–25.
410. van Blitterswijk M, DeJesus-Hernandez M, Niemantsverdriet E, Murray ME, Heckman MG, Diehl NN, et al. Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9ORF72 repeat expansions (Xpansize-72): a cross-sectional cohort study. *Lancet Neurol.* 2013 Oct;12(10):978–88.
411. Xi Z, Rainero I, Rubino E, Pinessi L, Bruni AC, Maletta RG, et al. Hypermethylation of the CpG-island near the C9orf72 G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>-repeat expansion in FTLD patients. *Hum Mol Genet.* 2014 Nov 1;23(21):5630–7.
412. Sudria-Lopez E, Koppers M, de Wit M, van der Meer C, Westeneng HJ, Zundel CAC, et al. Full ablation of C9orf72 in mice causes immune system-related pathology and neoplastic events but no motor neuron defects. *Acta Neuropathol (Berl).* 2016 Jul;132(1):145–7.
413. Atanasio A, Decman V, White D, Ramos M, Ikiz B, Lee HC, et al. C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci Rep.* 2016 Mar 16;6:23204.
414. Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li HR, et al. Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Nov 19;110(47):E4530-4539.
415. Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Hugueta A, Stone MD, et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 4;108(1):260-5.

416. Cave JW, Willis DE. G-quadruplex regulation of neural gene expression. *FEBS J.* 2021 Apr 27;
417. Zu T, Liu Y, Bañez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, et al. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 17;110(51):E4968-4977.
418. Gendron TF, Petrucelli L. Disease Mechanisms of C9ORF72 Repeat Expansions. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Apr 2;8(4):a024224.
419. Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, et al. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science.* 2013 Mar 15;339(6125):1335–8.
420. Ash PEA, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, DeJesus-Hernandez M, et al. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron.* 2013 Feb 20;77(4):639–46.
421. Schmitz A, Pinheiro Marques J, Oertig I, Maharjan N, Saxena S. Emerging Perspectives on Dipeptide Repeat Proteins in C9ORF72 ALS/FTD. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:637548.
422. Schludi MH, May S, Grässer FA, Rentzsch K, Kremmer E, Küpper C, et al. Distribution of dipeptide repeat proteins in cellular models and C9orf72 mutation cases suggests link to transcriptional silencing. *Acta Neuropathol (Berl).* 2015 Oct;130(4):537–55.
423. Hautbergue GM, Castelli LM, Ferraiuolo L, Sanchez-Martinez A, Cooper-Knock J, Higginbottom A, et al. SRSF1-dependent nuclear export inhibition of C9ORF72 repeat transcripts prevents neurodegeneration and associated motor deficits. *Nat Commun.* 2017 Jul 5;8:16063.
424. Mann DMA, Rollinson S, Robinson A, Bennion Callister J, Thompson JC, Snowden JS, et al. Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun.* 2013 Oct 14;1:68.
425. Cook CN, Wu Y, Odeh HM, Gendron TF, Jansen-West K, Del Rosso G, et al. C9orf72 poly(GR) aggregation induces TDP-43 proteinopathy. *Sci Transl Med.* 2020 Sep 2;12(559):eabb3774.
426. Zhu Q, Jiang J, Gendron TF, McAlonis-Downes M, Jiang L, Taylor A, et al. Reduced C9ORF72 function exacerbates gain of toxicity from ALS/FTD-causing repeat expansion in C9orf72. *Nat Neurosci.* 2020 May;23(5):615–24.
427. Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H. Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol.* 2019 Feb;266(2):533–44.
428. Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, Jansen-West K, Ash PEA, Caulfield T, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol (Berl).* 2013 Dec;126(6):829–44.

429. Mann DMA, Rollinson S, Robinson A, Bennion Callister J, Thompson JC, Snowden JS, et al. Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun.* 2013 Oct 14;1:68.
430. Cooper-Knock J, Hewitt C, Highley JR, Brockington A, Milano A, Man S, et al. Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain J Neurol.* 2012 Mar;135(Pt 3):751–64.
431. Schipper LJ, Raaphorst J, Aronica E, Baas F, de Haan R, de Visser M, et al. Prevalence of brain and spinal cord inclusions, including dipeptide repeat proteins, in patients with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: a systematic neuropathological review. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016 Oct;42(6):547–60.
432. Banez-Coronel M, Ranum LPW. Repeat-associated non-AUG (RAN) translation: insights from pathology. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2019 Jul;99(7):929–42.
433. Rostalski H, Leskelä S, Huber N, Katisko K, Cajanus A, Solje E, et al. Astrocytes and Microglia as Potential Contributors to the Pathogenesis of C9orf72 Repeat Expansion-Associated FTLD and ALS. *Front Neurosci.* 2019;13:486.
434. Lualdi M, Shafique A, Pedrini E, Pieroni L, Greco V, Castagnola M, et al. C9ORF72 Repeat Expansion Affects the Proteome of Primary Skin Fibroblasts in ALS. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 27;22(19):10385.
435. Ben-Dor I, Pacut C, Nevo Y, Feldman EL, Reubinoff BE. Characterization of C9orf72 haplotypes to evaluate the effects of normal and pathological variations on its expression and splicing. *PLoS Genet.* 2021 Mar;17(3):e1009445.
436. Fournier C, Barbier M, Camuzat A, Anquetil V, Lattante S, Clot F, et al. Relations between C9orf72 expansion size in blood, age at onset, age at collection and transmission across generations in patients and presymptomatic carriers. *Neurobiol Aging.* 2019 Feb;74:234.e1-234.e8.
437. Gijselinck I, Van Mossevelde S, van der Zee J, Sieben A, Engelborghs S, De Bleeker J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry.* 2016 Aug;21(8):1112–24.
438. Jackson JL, Finch NA, Baker MC, Kachergus JM, DeJesus-Hernandez M, Pereira K, et al. Elevated methylation levels, reduced expression levels, and frequent contractions in a clinical cohort of C9orf72 expansion carriers. *Mol Neurodegener.* 2020 Jan 30;15(1):7.
439. Gijselinck I, Cruts M, Van Broeckhoven C. The Genetics of C9orf72 Expansions. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018 Apr 2;8(4):a026757.
440. DeJesus-Hernandez M, Aleff RA, Jackson JL, Finch NA, Baker MC, Gendron TF, et al. Long-read targeted sequencing uncovers clinicopathological associations for C9orf72-linked diseases. *Brain J Neurol.* 2021 May 7;144(4):1082–8.
441. Ng ASL, Tan EK. Intermediate C9orf72 alleles in neurological disorders: does size really matter? *J Med Genet.* 2017 Sep;54(9):591–7.

442. Fredi M, Cavazzana I, Biasiotto G, Filosto M, Padovani A, Monti E, et al. C9orf72 Intermediate Alleles in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis, Systemic Lupus Erythematosus, and Rheumatoid Arthritis. *Neuromolecular Med.* 2019 Jun;21(2):150–9.
443. Zanella I, Zacchi E, Piva S, Filosto M. C9orf72 Intermediate Repeats Confer Genetic Risk for Severe COVID-19 Pneumonia Independently of Age. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 29;22(13):6991.
444. Iacoangeli A, Al Khleifat A, Jones AR, Sproviero W, Shatunov A, Opie-Martin S, et al. C9orf72 intermediate expansions of 24-30 repeats are associated with ALS. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Jul 17;7(1):115.
445. Murphy NA, Arthur KC, Tienari PJ, Houlden H, Chiò A, Traynor BJ. Age-related penetrance of the C9orf72 repeat expansion. *Sci Rep.* 2017 May 18;7(1):2116.
446. Gianferrari G, Martinelli I, Zucchi E, Simonini C, Fini N, Vinceti M, et al. Epidemiological, Clinical and Genetic Features of ALS in the Last Decade: A Prospective Population-Based Study in the Emilia Romagna Region in Italy. *Biomedicines.* 2022 Apr;10(4):819.
447. Van Mossevelde S, van der Zee J, Gijssels I, Sleegers K, De Bleeker J, Sieben A, et al. Clinical Evidence of Disease Anticipation in Families Segregating a C9orf72 Repeat Expansion. *JAMA Neurol.* 2017 Apr 1;74(4):445–52.
448. Esselin F, Mouzat K, Polge A, Juntas-Morales R, Pageot N, De la Cruz E, et al. Clinical Phenotype and Inheritance in Patients With C9ORF72 Hexanucleotide Repeat Expansion: Results From a Large French Cohort. *Front Neurosci.* 2020;14:316.
449. Curtis AF, Masellis M, Hsiung GYR, Moinuddin R, Zhang K, Au B, et al. Sex differences in the prevalence of genetic mutations in FTD and ALS: A meta-analysis. *Neurology.* 2017 Oct 10;89(15):1633–42.
450. Dolzhenko E, van Vugt JJFA, Shaw RJ, Bekritsky MA, van Blitterswijk M, Narzisi G, et al. Detection of long repeat expansions from PCR-free whole-genome sequence data. *Genome Res.* 2017 Nov;27(11):1895–903.
451. Suh E, Grando K, Van Deerlin VM. Validation of a Long-Read PCR Assay for Sensitive Detection and Sizing of C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansions. *J Mol Diagn JMD.* 2018 Nov;20(6):871–82.
452. Akimoto C, Volk AE, van Blitterswijk M, Van den Broeck M, Leblond CS, Lumbroso S, et al. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet.* 2014 Jun;51(6):419–24.
453. Ebbert MTW, Farrugia SL, Sens JP, Jansen-West K, Gendron TF, Prudencio M, et al. Long-read sequencing across the C9orf72 ‘GGGGCC’ repeat expansion: implications for clinical use and genetic discovery efforts in human disease. *Mol Neurodegener.* 2018 Aug 21;13(1):46.
454. Mackenzie IRA, Neumann M. Fused in Sarcoma Neuropathology in Neurodegenerative Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Dec 1;7(12):a024299.



455. Aktan-Collan K, Mecklin JP, de la Chapelle A, Peltomäki P, Uutela A, Kääriäinen H. Evaluation of a counselling protocol for predictive genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 2000 Feb;37(2):108–13.
456. Chiang H-H, Andersen PM, Tysnes O-B, Gredal O, Christensen PB, Graff C. Novel TARDBP mutations in Nordic ALS patients. *J Hum Genet.* 2012 May;57(5):316-9.
457. Yu CH, Davidson S, Harapas CR, Hilton JB, Mlodzianoski MJ, Laohamonthonkul P, et al. TDP-43 Triggers Mitochondrial DNA Release via mPTP to Activate cGAS/STING in ALS. *Cell.* 2020 Oct 29;183(3):636-649.e18.
458. Klim JR, Williams LA, Limone F, Guerra San Juan I, Davis-Dusenbery BN, Mordes DA, et al. ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STMN2, a mediator of motor neuron growth and repair. *Nat Neurosci.* 2019 Feb;22(2):167–79.
459. Picher-Martel V, Brunet F, Dupré N, Chrestian N. The Occurrence of FUS Mutations in Pediatric Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case Report and Review of the Literature. *J Child Neurol.* 2020 Jul;35(8):556–62.
460. Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J, et al. FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 Jun;81(6):639–45.
461. Chen L. FUS mutation is probably the most common pathogenic gene for JALS, especially sporadic JALS. *Rev Neurol (Paris).* 2021 Apr;177(4):333–40.
462. Kim YE, Oh KW, Kwon MJ, Choi WJ, Oh S il, Ki CS, et al. De novo FUS mutations in 2 Korean patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2015 Mar;36(3):1604.e17-19.
463. Cui R, Tuo M, Li P, Zhou C. Association between TBK1 mutations and risk of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum: a meta-analysis. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol.* 2018 May;39(5):811–20.
464. Fifita JA, Williams KL, Sundaramoorthy V, Mccann EP, Nicholson GA, Atkin JD, et al. A novel amyotrophic lateral sclerosis mutation in OPTN induces ER stress and Golgi fragmentation in vitro. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2017 Feb;18(1–2):126–33.
465. Ingre C, Pinto S, Birve A, Press R, Danielsson O, de Carvalho M, et al. No association between VAPB mutations and familial or sporadic ALS in Sweden, Portugal and Iceland. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener.* 2013 Dec;14(7–8):620–7.
466. Borgese N, Iacomino N, Colombo SF, Navone F. The Link between VAPB Loss of Function and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells.* 2021 Jul 23;10(8):1865.
467. Felbecker A, Camu W, Valdmanis PN, Sperfeld AD, Waibel S, Steinbach P, et al. Four familial ALS pedigrees discordant for two SOD1 mutations: are all SOD1 mutations pathogenic? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 May;81(5):572–7.
468. Koppers M, van Blitterswijk MM, Vlam L, Rowicka PA, van Vught PWJ, Groen EJM, et al. VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2012 Apr;33(4):837.e7-13.

469. de Bot ST, Schelhaas HJ, Kamsteeg EJ, van de Warrenburg BPC. Hereditary spastic paraplegia caused by a mutation in the VCP gene. *Brain J Neurol*. 2012 Dec;135(Pt 12):e223; author reply e224.
470. Palmio J, Sandell S, Suominen T, Penttilä S, Raheem O, Hackman P, et al. Distinct distal myopathy phenotype caused by VCP gene mutation in a Finnish family. *Neuromuscul Disord NMD*. 2011 Aug;21(8):551–5.
471. Prehn JHM, Jirstrom E. Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson's disease and neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sin*. 2020 Apr;41(4):442–6.
472. Richard P, Feng S, Tsai YL, Li W, Rinchetti P, Muhith U, et al. SETX (senataxin), the helicase mutated in AOA2 and ALS4, functions in autophagy regulation. *Autophagy*. 2021 Aug;17(8):1889–906.
473. Sprute R, Jergas H, Ölmez A, Alawbathani S, Karasoy H, Dafsari HS, et al. Genotype-phenotype correlation in seven motor neuron disease families with novel ALS2 mutations. *Am J Med Genet A*. 2021 Feb;185(2):344–54.
474. Yao L, He X, Cui B, Zhao F, Zhou C. NEK1 mutations and the risk of amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a meta-analysis. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. 2021 Apr;42(4):1277–85.
475. Lin BC, Higgins NR, Phung TH, Monteiro MJ. UBQLN proteins in health and disease with a focus on UBQLN2 in ALS/FTD. *FEBS J*. 2021 Jul 17;
476. Luukkainen L, Helisalml S, Kytövuori L, Ahmasalo R, Solje E, Haapasalo A, et al. Mutation Analysis of the Genes Linked to Early Onset Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration. *J Alzheimers Dis JAD*. 2019;69(3):775–82.
477. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010 Aug 26;466(7310):1069–75.
478. Lee T, Li YR, Ingre C, Weber M, Grehl T, Gredal O, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum Mol Genet*. 2011 May 1;20(9):1697–700.
479. Laffita-Mesa JM, Rodríguez Pupo JM, Moreno Sera R, Vázquez Mojena Y, Kourí V, Laguna-Salvia L, et al. De novo mutations in ataxin-2 gene and ALS risk. *PloS One*. 2013;8(8):e70560.
480. Kaakkola S, Rinne R. Ataksiat ja niiden erotusdiagnostiikka. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*. 1997;113(18):1773-82.
481. Nicolas A, Kenna KP, Renton AE, Ticozzi N, Faghri F, Chia R, et al. Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron*. 2018 Mar 21;97(6):1268-1283.e6.
482. Baron DM, Fenton AR, Saez-Atienzar S, Giampetruzzi A, Sreeram A, Shankaracharya null, et al. ALS-associated KIF5A mutations abolish autoinhibition resulting in a toxic gain of function. *Cell Rep*. 2022 Apr 5;39(1):110598.

483. Tan HHG, Westeneng HJ, van der Burgh HK, van Es MA, Bakker LA, van Veenhuijzen K, et al. The Distinct Traits of the UNC13A Polymorphism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 2020 Oct;88(4):796–806.
484. Brown AL, Wilkins OG, Keuss MJ, Hill SE, Zanovello M, Lee WC, et al. TDP-43 loss and ALS-risk SNPs drive mis-splicing and depletion of UNC13A. *Nature*. 2022 Mar;603(7899):131–7.
485. Ma XR, Prudencio M, Koike Y, Vatsavayai SC, Kim G, Harbinski F, et al. TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD-ALS gene UNC13A. *Nature*. 2022 Mar;603(7899):124–30.
486. van Eijk RPA, Jones AR, Sproviero W, Shatunov A, Shaw PJ, Leigh PN, et al. Meta-analysis of pharmacogenetic interactions in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Neurology*. 2017 Oct 31;89(18):1915–22.
487. Pasanen P, Myllykangas L, Pöyhönen M, Kiuru-Enari S, Tienari PJ, Laaksovirta H, et al. Intrafamilial clinical variability in individuals carrying the CHCHD10 mutation Gly66Val. *Acta Neurol Scand*. 2016 May;133(5):361–6.
488. Jokela ME, Jääskeläinen SK, Sandell S, Palmio J, Penttilä S, Saukkonen A, et al. Spontaneous activity in electromyography may differentiate certain benign lower motor neuron disease forms from amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2015 Aug 15;355(1–2):143–6.
489. Uusimaa J, Kettunen J, Varilo T, Järvelä I, Kallijärvi J, Kääriäinen H, et al. The Finnish genetic heritage in 2022 - from diagnosis to translational research. *Dis Model Mech*. 2022 Oct 1;15(10):dmm049490.
490. Cavey JR, Ralston SH, Hocking LJ, Sheppard PW, Ciani B, Searle MS, et al. Loss of ubiquitin-binding associated with Paget's disease of bone p62 (SQSTM1) mutations. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2005 Apr;20(4):619–24.
491. Rohrer JD, Guerreiro R, Vandrovcova J, Uphill J, Reiman D, Beck J, et al. The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*. 2009 Nov 3;73(18):1451–6.
492. Krüger J, Kaivorinne AL, Udd B, Majamaa K, Remes AM. Low prevalence of progranulin mutations in Finnish patients with frontotemporal lobar degeneration. *Eur J Neurol*. 2009 Jan;16(1):27–30.
493. Kaivorinne AL, Krüger J, Udd B, Majamaa K, Remes AM. Mutations in CHMP2B are not a cause of frontotemporal lobar degeneration in Finnish patients. *Eur J Neurol*. 2010 Nov;17(11):1393–5.
494. Kaivorinne AL, Krüger J, Kuivaniemi K, Tuominen H, Moilanen V, Majamaa K, et al. Role of MAPT mutations and haplotype in frontotemporal lobar degeneration in Northern Finland. *BMC Neurol*. 2008 Dec 17;8:48.
495. Younes K, Miller BL. Frontotemporal Dementia: Neuropathology, Genetics, Neuroimaging, and Treatments. *Psychiatr Clin North Am*. 2020 Jun;43(2):331–44.
496. Jiang Y, Jiao B, Xiao X, Shen L. Genetics of frontotemporal dementia in China. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. 2021 Aug;22(5–6):321–35.

497. Greaves CV, Rohrer JD. An update on genetic frontotemporal dementia. *J Neurol*. 2019 Aug;266(8):2075–86.
498. Van Deerlin VM, Sleiman PMA, Martinez-Lage M, Chen-Plotkin A, Wang LS, Graff-Radford NR, et al. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):234–9.
499. Walter SD. Calculation of attributable risks from epidemiological data. *Int J Epidemiol*. 1978 Jun;7(2):175–82.
500. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet*. 2011 Jul 15;89(1):121–30.
501. Englund E, Gustafson L, Passant U, Majounie E, Renton AE, Traynor BJ, et al. Familial Lund frontotemporal dementia caused by C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Neurobiol Aging*. 2012 Aug;33(8):1850.e13-6.
502. Kaivola K, Salmi SJ, Jansson L, Launes J, Hokkanen L, Niemi AK, et al. Carriership of two copies of C9orf72 hexanucleotide repeat intermediate-length alleles is a risk factor for ALS in the Finnish population. *Acta Neuropathol Commun*. 2020 Nov 9;8(1):187.
503. Al Khleifat A, Iacoangeli A, van Vugt JJFA, Bowles H, Moisse M, Zwamborn RAJ, et al. Structural variation analysis of 6,500 whole genome sequences in amyotrophic lateral sclerosis. *NPJ Genomic Med*. 2022 Jan 28;7(1):8.
504. Harhay MO, Porcher R, Cantu E, Crowther MJ, Christie JD, Thabut G, et al. An Alternative Approach for the Analysis of Time-to-Event and Survival Outcomes in Pulmonary Medicine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Sep 1;198(5):684–7.
505. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Jul;88(7):540–9.
506. Kaivorinne AL. Frontotemporal lobar degeneration in Finland. Molecular genetics and clinical aspects. [Thesis] Oulu. University of Oulu. 2012.

