

Comprendre les causes de la Sclérose Latérale Amyotrophique et de la Démence Fronto-Temporale (SLA/DFT)

A - INTRODUCTION

Les microsatellites sont des séquences d'ADN composées de 3 à 6 nucléotides, répétées de multiples fois et qui occupent de 3 à 5% du génome humain. Ces microsatellites varient fortement en taille et en séquence et sont essentielles pour le bon fonctionnement et l'évolution des génomes. **Toutefois, des expansions anormales de ces microsatellites peuvent conduire à plus de 50 maladies génétiques humaines, notamment des pathologies neurodégénératives comme NIID (Maladie à Inclusions Intranucléaires Neuronales) et la SLA/DFT (Sclérose Latérale Amyotrophique et Démence Fronto-Temporale).** Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces pathologies restent encore mal connus. De plus, il n'existe pas de traitement à ces maladies.

B - RESULTATS

La maladie à inclusions intranucléaires neuronales (NIID, « Neuronal Intranuclear Inclusion Disease ») est une maladie neurodégénérative d'origine génétique et dont les manifestations cliniques varient d'un patient à l'autre, avec des signes de démence et de parkinsonisme souvent associés à une neuropathie périphérique, une ataxie cérébelleuse et une faiblesse musculaire, etc. (Sone et al., 2016).

Comme son nom l'indique, cette maladie est caractérisée par la présence d'inclusions intranucléaires éosinophiles positives à l'ubiquitine et à p62 (Sone et al., 2016 ; Gelpi et al., 2017). Ces agrégats protéiques sont présents dans les neurones et les astrocytes du système nerveux central ainsi que dans les fibroblastes, permettant ainsi de confirmer le diagnostic de ce syndrome par biopsie cutanée.

En 2019, la cause génétique de cette maladie a été identifiée comme **une expansion de 50 à 200 répétitions des tri-nucléotides GGC** située dans la région 5'UTR du gène *NOTCH2NLC* (Ishiura et al., 2019 ; Sone et al., 2019). Mon travail de thèse a porté sur les mécanismes de toxicité de cette mutation.

Des expériences de transfection cellulaire m'ont permis de mettre en évidence que, malgré la localisation dans une région 5'UTR prédite comme « non-codante », ces répétitions GGC étaient traduites dans un cadre de lecture unique où chaque triplet GGC est décodé en un acide aminé glycine, créant alors une nouvelle protéine composée d'une suite de résidus glycines, que nous avons appelé uN2CpolyG. L'initiation de la traduction de cette protéine se fait à partir d'un codon ATG situé en amont de ces répétitions GGC.

Afin d'attester de l'existence de cette protéine chez les patients NIID, nous avons développé des anticorps dirigés contre la partie C-terminale de uN2CpolyG. Des immunofluorescences réalisées sur des lames de cerveaux ainsi que sur des biopsies cutanées de patients ont alors révélé la présence de la protéine uN2CpolyG dans les agrégats intranucléaires typiques de cette maladie. Ces résultats éclairent ainsi l'origine des inclusions intranucléaires caractéristiques de cette maladie.

De plus, l'expression de cette nouvelle protéine en culture primaire de neurones d'embryons de souris conduit à la formation d'agrégats intranucléaires et à une mort cellulaire. Enfin, l'expression de la protéine uN2CpolyG chez des souris provoque une hyperactivité, des tremblements, une ataxie, une faiblesse musculaire ainsi qu'une mort prématurée de ces animaux. Au point de vue histopathologique, les cerveaux de ces souris montrent des signes de neurodégénérescence et de neuro-inflammation associés à la présence d'inclusions intranucléaires positives à l'ubiquitine et à p62. Ainsi, la seule expression de la protéine uN2CpolyG est suffisante pour récapituler les caractéristiques pathologiques de la maladie NIID.

En conclusion, mon travail de thèse a permis de comprendre les causes à l'origine de la maladie NIID : la traduction de répétitions de tri-nucléotides GGC en une nouvelle protéine composée de polyGlycine toxique, qui forme des inclusions intranucléaires.

Cette étude a été publiée dans :

Boivin M, Deng J, Pfister V, Grandgirard E, Oulad-Abdelghani M, Morlet B, Ruffenach F, Negroni L, Koebel P, Jacob H, Riet F, Dijkstra AA, McFadden K, Clayton WA, Hong D, Miyahara H, Iwasaki Y, Sone J, Wang Z, Charlet-Berguerand N. *Translation of GGC repeat expansions into a toxic polyglycine protein in NIID defines a novel class of human genetic disorders: the polyG diseases*. **Neuron**. 2021 Jun 2;109(11):1825-1835.e5

C - PROJET

C-1. Background scientifique

Avec une personne touchée sur 50 000, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), également appelée maladie de Charcot, est la troisième maladie neurodégénérative la plus commune après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. La SLA est caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurones supérieurs dans le cortex moteur, et inférieurs au niveau du tronc cérébral et de la colonne vertébrale. Cette neurodégénérescence engendre une atrophie et une faiblesse musculaire qui mène la majorité des patients à la paralysie, puis à la mort par déficience respiratoire en moyenne 3 à 5 ans après le diagnostic (*Logroscino et al., 2010*).

La démence fronto-temporale (DFT) est la troisième cause de démence la plus commune après la maladie d'Alzheimer et la démence à corps de Lewy. La DFT est caractérisée par une dégénérescence des neurones des cortex frontaux et temporaux conduisant à des difficultés du langage et/ou des changements dans le comportement, la personnalité et le contrôle émotionnel comme des altérations de la conduite en société, une désinhibition, une apathie affective, etc. (*Khan & de Jesus, 2021*).

Il est important de noter que la SLA et la DFT peuvent exister sous des formes dites « pures », mais aussi appartenir à un même continuum. En effet, au niveau clinique, environ 15% des patients atteints de SLA présentent aussi une DFT et, de même, parmi les patients atteints de DFT, 40% des sujets présentent aussi des déficits moteurs dont 15% sont compatibles avec une SLA (*Ringholz et al., 2005*). De plus, l'observation de nombreuses similitudes entre la SLA et la DFT, tant au niveau histopathologique que génétique, a confirmé l'existence d'un continuum entre ces deux maladies (pour revue : *Ringholz & Greene, 2006 ; Ling et al., 2013*).

Bien que la majorité des cas de SLA et de DFT soient sporadiques, environ 10% des patients présentent une forme familiale de SLA et 30% une forme familiale de DFT, généralement avec une transmission autosomale dominante et on dénombre à ce jour une vingtaine de gènes associés à ces maladies, dont une mutation dans le gène *C9ORF72*, sujet de ce projet.

En effet, il a été identifié en 2011 que la cause génétique principale à la fois de SLA et de DFT est une expansion de répétitions d'hexa-nucléotides GGGGCC dans le premier intron du gène *C9ORF72* (*DeJesus-Hernandez et al., 2011 ; Renton et al., 2011*). Cette expansion de répétitions est retrouvée dans 20 à 50% des cas de SLA et DFT familiaux et, en moindre proportion, de 5 à 10%, chez les cas sporadiques (*Majounie et al., 2012*). Dans la population générale, le nombre de répétitions de microsatellites GGGGCC est compris entre 2 et 70 alors que chez les patients atteints de SLA et/ou de DFT, cette expansion peut s'étendre à plusieurs centaines de répétitions GGGGCC.

Ces répétitions conduisent à des modifications épigénétiques du promoteur du gène *C9ORF72* conduisant à une diminution d'expression de la protéine *C9ORF72* codée par ce gène. La perte d'expression de *C9ORF72* chez le poisson-zèbre conduit à une altération de leur mobilité et à une perte de motoneurones (*Ciura et al., 2013*). Ces résultats suggèrent qu'une diminution d'expression de *C9ORF72* puisse contribuer à la SLA/DFT. Néanmoins, la fonction de cette protéine *C9ORF72* est mal comprise.

De plus, ces répétitions GGGGCC sont traduites en protéines composées de DiPeptides Répétés (protéines DPR) toxiques. Ces protéines DPR sont composées de répétitions de polyGlycine-Alanine (polyGA), polyGlycine-Proline (polyGP) et/ou polyGlycine-Arginine (polyGR) (*Ash et al., 2013 ; Gendron et al., 2013 ; Mori et al., 2013a ; Zu et al., 2013*). La présence de ces protéines DPR est confirmée grâce au développement d'anticorps dirigés contre celles-ci et l'observation de ces protéines DPR sous forme d'inclusions cytoplasmiques dans les neurones des patients SLA/DFT (*Gendron et al., 2013 ; Mackenzie et*

al., 2013 ; Mori et al., 2013b ; Zu et al., 2013). Ces résultats ne sont pas sans rappeler la traduction des répétitions GGC dans la maladie NIID ; toutefois, le mécanisme de traduction de ces répétitions GGGGCC dans la SLA/DFT était indéterminé.

C-2. Résultats préliminaires

Grâce à mon expertise sur la maladie NIID et la traduction des répétitions GGC (Boivin et al., 2021), j'ai utilisé une approche similaire pour étudier la traduction des répétitions GGGGCC dans la SLA/DFT. Ainsi, des expériences de transfection cellulaire suivie par des analyses de spectrométrie de masse ont montré que les répétitions GGGGCC étaient principalement traduites en protéines DPR polyGA, polyGP et polyGR via l'utilisation de codons d'initiation de la traduction sous-optimaux situés en amont de ces répétitions. Par conséquent, ces protéines DPR s'expriment faiblement et sont donc peu toxiques. Cependant, nous avons découvert que la protéine C9ORF72 est impliquée dans le mécanisme d'autophagie, et notamment dans la dégradation de ces protéines DPR. La diminution d'expression de la protéine C9ORF72 chez les patients atteints de SLA/DFT entraîne alors une diminution de la dégradation des protéines DPR, et donc leur accumulation et leur toxicité, du moins en modèle cellulaire.

En conclusion, ce travail a permis de mieux comprendre comment les répétitions GGGGCC étaient traduites en protéines DPR, mais a aussi permis d'identifier un nouveau modèle de toxicité synergique dans la SLA/DFT, où la diminution d'expression de la protéine C9ORF72 permet l'accumulation et la toxicité de ces protéines DPR.

Une partie de ce travail a été publié dans :

Boivin M, Pfister V, Gaucherot A, Ruffenach F, Negroni L, Sellier C, Charlet-Berguerand N. *Reduced autophagy upon C9ORF72 loss synergizes with dipeptide repeat protein toxicity in G4C2 repeat expansion disorders*. **EMBO J.** 2020 Feb 17;39(4):e100574

C-3. Projet et utilisation du financement Thérèse & René Planiol

Nos résultats ont été obtenus en modèle cellulaire et nécessitent d'être confirmés en modèle animal. Pour cela, j'ai développé de nouveaux outils moléculaires, et notamment des virus AAV/PHP.eB recombinants permettant d'infecter le système nerveux central (SNC) des souris et ainsi exprimer les protéines DPR polyGA, polyGP et polyGR sous leur codon d'initiation naturel. Comme preuve de faisabilité de cette approche, j'ai déjà développé ce type de virus pour exprimer la protéine polyGlycine dans le SNC de souris et ainsi étudier la maladie NIID (Boivin et al., 2021).

Afin de confirmer notre modèle de synergie entre perte d'expression de la protéine C9ORF72 et l'accumulation et la toxicité des protéines DPR, nous avons injecté des souris contrôles ou knockout pour le gène C9ORF72 avec ces AAV/PHP.eB exprimant les diverses protéines DPR.

Concernant les souris injectées avec les virus exprimant la protéine DPR polyGA, j'ai observé le développement d'altérations locomotrices chez les souris C9ORF72 KO à partir de 9 mois post-injection d'AAV. Cependant, je n'ai pas observé de telles altérations dans les souris contrôles. Ces résultats confirment, en modèle animal, une synergie de toxicité entre la perte d'expression de la protéine C9ORF72 et l'expression de la protéine DPR polyGA.

En parallèle et de manière intéressante, l'expression de la protéine DPR polyGP s'est révélée très toxique, que ce soit dans des souris contrôles ou C9ORF72 KO, avec une mort des animaux 3 à 6 mois post-injection des AAV. Ces résultats sont inattendus car cette protéine polyGP n'a pas été décrite dans la littérature comme étant particulièrement toxique (Choi et al., 2019 ; Lopez-Gonzalez et al., 2019 ; LaClair et al., 2020). Néanmoins, il est à noter que les études précédentes ont été réalisées avec une protéine polyGP artificielle et tronquée. En effet, nous avons montré que l'initiation de la traduction de cette protéine DPR avait lieu à un codon d'initiation sous optimal situé en amont des répétitions, conduisant ainsi à la production d'une séquence N-terminale d'une soixantaine d'acides aminés débutant à ce codon d'initiation. Il est important de noter que cette séquence n'a pas été décrite précédemment. L'analyse de cette séquence N-terminale révèle la présence de nombreux acides aminés chargés positivement, notamment des résidus arginines,

qui sont connus pour leur toxicité pour les neurones. **Nous souhaitons donc développer et injecter de nouveaux virus AAV/PHP.eB exprimant soit uniquement cette séquence N-terminale riche en résidus arginines, soit une protéine uniquement composée de polyGP et délétée de sa séquence N-terminale naturelle** (et donc identique à celle publiée comme peu toxique, cf. *Choi et al., 2019 ; Lopez-Gonzalez et al., 2019 ; LaClair et al., 2020*). L'analyse du phénotype comportemental et locomoteur de ces souris permettra ainsi de mettre en évidence quelle partie de la protéine DPR polyGP est toxique (sa séquence N-terminale, sa séquence répétée de polyGP ou une éventuelle synergie entre ces deux parties). Il s'agit d'une question importante car déterminer l'origine de la toxicité des protéines DPR permettra de mieux définir quel motif protéique pourrait servir de cible thérapeutique.

Enfin, nous aimerions aussi confirmer l'existence de cette séquence N-terminale chez les patients atteints de SLA/DFT et, pour cela, je souhaiterions développer, grâce au prix Thérèse & René Planiol, des anticorps spécifiques de cette région de ~60 acides aminés riches en arginines. Ces nouveaux anticorps seraient précieux pour mieux comprendre l'expression et la distribution des protéines DPR toxiques chez les patients SLA/DFT, ou même être utilisés pour quantifier les protéines DPR comme biomarqueurs. Il est à noter que nous sommes en contact avec des pathologistes experts dans ces maladies afin de m'aider dans ces futures analyses (Prof Manuela Neumann, Tübingen ; Prof Danielle Seilhan, Pitié-Salpêtrière).

En conclusion, l'obtention du prix Thérèse & René Planiol me permettrait de développer de nouveaux outils moléculaires, notamment des AAV et des anticorps, qui nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des protéines DPR, et donc les causes de la neurodégénérescence et la mort neuronale dans la sclérose latérale amyotrophique et la démence fronto-temporale, et ceci afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques pour ces maladies dévastatrices.

D - BIBLIOGRAPHIE

Ash PE, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, DeJesus-Hernandez M, van Blitterswijk MM, Jansen-West K, Paul JW 3rd, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Petrucelli L. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron*. 2013 Feb 20;77(4):639-46. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.004. Epub 2013 Feb 12. PMID: 23415312; PMCID: PMC3593233.

Choi SY, Lopez-Gonzalez R, Krishnan G, Phillips HL, Li AN, Seeley WW, Yao WD, Almeida S, Gao FB. C9ORF72-ALS/FTD-associated poly(GR) binds Atp5a1 and compromises mitochondrial function in vivo. *Nat Neurosci*. 2019 Jun;22(6):851-862. doi: 10.1038/s41593-019-0397-0. Epub 2019 May 13. PMID: 31086314; PMCID: PMC6800116.

Ciura S, Lattante S, Le Ber I, Latouche M, Tostivint H, Brice A, Kabashi E. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2013 Aug;74(2):180-7. doi: 10.1002/ana.23946. PMID: 23720273.

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.

Gelpi E, Botta-Orfila T, Bodi L, Marti S, Kovacs G, Grau-Rivera O, Lozano M, Sánchez-Valle R, Muñoz E, Valldeoriola F, Pagonabarraga J, Tartaglia GG, Milà M. Neuronal intranuclear (hyaline) inclusion disease and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: a morphological and molecular dilemma. *Brain*. 2017 Aug 1;140(8):e51. doi: 10.1093/brain/awx156. PMID: 28899011.

Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, Jansen-West K, Ash PE, Caulfield T, Daugherty L, Dunmore JH, Castanedes-Casey M, Chew J, Cosio DM, van Blitterswijk M, Lee WC, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Petrucelli L. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol*. 2013 Dec;126(6):829-44. doi: 10.1007/s00401-013-1192-8. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24129584; PMCID: PMC3830741.

Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, Almansour MA, Kikuchi JK, Taira M, Mitsui J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Mano T, Iwata A, Harigaya Y, Matsukawa MK, Matsukawa T, Tanaka M, Shirota Y, Ohtomo R, Kowa H, Date H, Mitsue A, Hatsuta H, Morimoto S, Murayama S, Shiio Y, Saito Y, Mitsutake A, Kawai M, Sasaki T, Sugiyama Y, Hamada M, Ohtomo G, Terao Y, Nakazato Y, Takeda A, Sakiyama Y, Umeda-Kameyama Y, Shinmi J, Ogata K, Kohno Y, Lim SY, Tan AH, Shimizu J, Goto J, Nishino I, Toda T, Morishita S, Tsuji S. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet*. 2019 Aug;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31332380.

Khan I, De Jesus O. Frontotemporal Lobe Dementia. 2022 Jun 27. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 32644712.

- LaClair KD, Zhou Q, Michaelsen M, Wefers B, Brill MS, Janjic A, Rathkolb B, Farny D, Cygan M, de Angelis MH, Wurst W, Neumann M, Enard W, Misgeld T, Arzberger T, Edbauer D. Congenic expression of poly-GA but not poly-PR in mice triggers selective neuron loss and interferon responses found in C9orf72 ALS. *Acta Neuropathol.* 2020 Aug;140(2):121-142. doi: 10.1007/s00401-020-02176-0. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32562018; PMCID: PMC7360660.
- Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron.* 2013 Aug 7;79(3):416-38. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.033. PMID: 23931993; PMCID: PMC4411085.
- Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E; EURALS. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010 Apr;81(4):385-90. doi: 10.1136/jnnp.2009.183525. Epub 2009 Aug 25. PMID: 19710046; PMCID: PMC2850819.
- Lopez-Gonzalez R, Yang D, Pribadi M, Kim TS, Krishnan G, Choi SY, Lee S, Coppola G, Gao FB. Partial inhibition of the overactivated Ku80-dependent DNA repair pathway rescues neurodegeneration in C9ORF72-ALS/FTD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 May 7;116(19):9628-9633. doi: 10.1073/pnas.1901313116. Epub 2019 Apr 24. PMID: 31019093; PMCID: PMC6511021.
- Mackenzie IR, Arzberger T, Kremmer E, Troost D, Lorenz S, Mori K, Weng SM, Haass C, Kretzschmar HA, Edbauer D, Neumann M. Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol.* 2013 Dec;126(6):859-79. doi: 10.1007/s00401-013-1181-y. Epub 2013 Oct 6. PMID: 24096617.
- Majounie E, Renton AE, Mok K, Doppler EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pampillet 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. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70043-1. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22406228; PMCID: PMC3322422.
- Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretzschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLD/ALS. *Science.* 2013a Mar 15;339(6125):1335-8. doi: 10.1126/science.1232927. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23393093.
- Mori K, Arzberger T, Grässer FA, Gijssels I, May S, Rentzsch K, Weng SM, Schludi MH, van der Zee J, Cruts M, Van Broeckhoven C, Kremmer E, Kretzschmar HA, Haass C, Edbauer D. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol.* 2013b Dec;126(6):881-93. doi: 10.1007/s00401-013-1189-3. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24132570.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez 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, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M; ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogava 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. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.010. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21944779; PMCID: PMC3200438.
- Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology.* 2005 Aug 23;65(4):586-90. doi: 10.1212/01.wnl.0000172911.39167.b6. PMID: 16116120.
- Ringholz GM, Greene SR. The relationship between amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006 Sep;6(5):387-92. doi: 10.1007/s11910-996-0019-6. PMID: 16928348.
- Sone J, Mori K, Inagaki T, Katsumata R, Takagi S, Yokoi S, Araki K, Kato T, Nakamura T, Koike H, Takashima H, Hashiguchi A, Kohno Y, Kurashige T, Kuriyama M, Takiyama Y, Tsuchiya M, Kitagawa N, Kawamoto M, Yoshimura H, Suto Y, Nakayasu H, Uehara N, Sugiyama H, Takahashi M, Kokubun N, Konno T, Katsuno M, Tanaka F, Iwasaki Y, Yoshida M, Sobue G. Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. *Brain.* 2016 Dec;139(Pt 12):3170-3186. doi: 10.1093/brain/aww249. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27797808; PMCID: PMC5382941.
- Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, Mizuguchi T, Hamanaka K, Mori K, Koike H, Hashiguchi A, Takashima H, Sugiyama H, Kohno Y, Takiyama Y, Maeda K, Doi H, Koyano S, Takeuchi H, Kawamoto M, Kohara N, Ando T, Ieda T, Kita Y, Kokubun N, Tsuboi Y, Katoh K, Kino Y, Katsuno M, Iwasaki Y, Yoshida M, Tanaka F, Suzuki IK, Frith MC, Matsumoto N, Sobue G. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019 Aug;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31332381.
- Zu T, Liu Y, Bañez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, Miller TM, Harms MB, Falchook AE, Subramony SH, Ostrow LW, Rothstein JD, Troncoso JC, Ranum LP. 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):E4968-77. doi: 10.1073/pnas.1315438110. Epub 2013 Nov 18. PMID: 24248382; PMCID: PMC3870665.