

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA



**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN MEDICINA E
CHIRURGIA**

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

TESI DI LAUREA

**La terapia genica con oligonucleotidi antisenso: una speranza per la
sclerosi laterale amiotrofica**

RELATORE

Chiarissima Prof. Paola Mandich

CANDIDATA

Chiara Turolla

INDICE

1. OBIETTIVO DELLA TESI	2
2. INTRODUZIONE	2
2.1 Diagnosi di malattia del motoneurone	3
2.2 Genetica delle Malattie del motoneurone	5
3. CASI CLINICI	8
3.1 Caso clinico 1	8
3.2 Caso clinico 2	12
3.3 Caso clinico 3	14
4. TERAPIA PER ALS	17
4.1 Terapia convenzionale	17
4.2 Terapia non convenzionale	19
5. CONCLUSIONI	22
6. BIBLIOGRAFIA	23

OBIETTIVO DELLA TESI

Obiettivi della presente tesi sono stati la diagnosi, l'inquadramento clinico e molecolare di pazienti con malattia del motoneurone ad esordio precoce e probabile causa genetica al fine di permettere l'invio di questi pazienti con forme particolarmente aggressive e altresì incurabili a terapie geniche innovative, in base al difetto genetico che le contraddistingue.

Per la presente tesi è stata analizzata la coorte di pazienti con malattia del motoneurone seguita presso la Genetica Medica dell'IRCCS Policlinico San Martino. Tra questi, a scopo esemplificativo, sono stati scelti tre pazienti descritti successivamente in dettaglio.

INTRODUZIONE

La sclerosi laterale amiotrofica (ALS) è una patologia del motoneurone, sia superiore sia inferiore, attualmente incurabile e che conduce a paralisi e morte prematura gli affetti. Nel 95% dei casi è sporadica (sALS), mentre il 5-10% delle forme si caratterizza per una storia familiare determinata dalla presenza di mutazioni geniche (fALS). [1] Tuttavia, anche in alcuni pazienti con ALS apparentemente sporadica sono state trovate specifiche mutazioni geniche riscontrate nelle forme familiari [2,3]. Le forme geneticamente determinate possono avere, nella maggior parte dei casi, un'ereditarietà autosomica dominante, anche se non sempre a penetranza completa, e in alcuni casi recessiva o X-linked. [4] L'esordio avviene solitamente tra i 40 e i 70 anni, più precisamente tra 58 e 63 anni per quanto riguarda le forme sporadiche e più precocemente, tra 47 e 52 anni, per quelle familiari [5,6].

Obiettivo della presente tesi è l'analisi di quelle condizioni rare definite come ALS a esordio precoce (cALS, childhood-ALS), nelle quali la comparsa dei primi sintomi della degenerazione del motoneurone avviene generalmente prima dei 25 anni di età e che riconoscono frequentemente una causa genetica. [7]. Queste forme solitamente tendono ad avere una progressione più lenta e una sopravvivenza maggiore rispetto alle forme tipiche ad esordio tardivo [8], anche se, anche in questo gruppo, è presente un'estrema eterogeneità, da forme a più lenta a forme a più rapida progressione.

L'ALS ad esordio precoce si associa frequentemente a mutazioni dei geni *SOD1*, *Alsin*, *Spatacsin* e, come evidenziato da numerosi gruppi di ricerca, a mutazioni del gene Fused in Sarcoma (*FUS*). Questo gene è prevalentemente mutato in pazienti con esordio giovanile o infantile con un'inusuale rapida progressione e, di conseguenza, una breve durata di malattia (la sopravvivenza spesso non supera l'anno), come nei pazienti oggetto di questa tesi. [9]

Le mutazioni di *FUS* sono state dimostrate sia in pazienti con forme familiari di ALS a esordio precoce, con trasmissione autosomica dominante a penetranza completa, sia in ALS apparentemente sporadiche [10,11]; nella maggior parte dei casi la mutazione del gene *FUS* è una mutazione *de novo*, ovvero presente solo nel paziente e non nei genitori.

DIAGNOSI DI MALATTIA DEL MOTONEURONE

La diagnosi di ALS si basa sulla presenza di specifiche caratteristiche di malattia, come la presenza di segni di coinvolgimento del motoneurone, sia superiore, sia inferiore, l'andamento rapidamente progressivo e l'esclusione di altre condizioni che possano determinare la sintomatologia.

I primi criteri diagnostici (El Escorial, World Federation of Neurology) sono stati sviluppati ed approvati nel 1994 dal gruppo di ricerca sulle patologie del motoneurone. [12] Questi criteri prevedono quattro categorie diagnostiche: definitiva, probabile, possibile, sospetta; la conferma diagnostica richiede la progressione dei sintomi per almeno 6 mesi e l'esclusione delle patologie che mimano l'ALS. **Tabella 1**

Negli anni 1998- 2000 questi criteri sono stati rivisti con l'inserimento dei criteri neurofisiologici. Si parla quindi di criteri di El Escorial rivisti o criteri di Airlie House [13] **Tabella 2**

Nel 2008 vengono sviluppati i criteri di Hawaji-shima, con la stessa specificità ma più alta sensibilità di El Escorial. [14] **Tabella 3**

Tabella 1. El Escorial diagnostic criteria (1994)

The diagnosis of ALS requires
<p>1) The presence of:</p> <ul style="list-style-type: none"> - evidence of LMN degeneration on clinical, electrophysiological (including EMG features in clinically normal muscles) or neuropathological examination - evidence of UMN degeneration on clinical examination - progression of the motor syndrome within a region or to other regions, as determined by history or examination
<p>2) The absence of:</p> <ul style="list-style-type: none"> - electrophysiological and pathological evidence of other process that might explain the UMN and /or LMN signs - neuroimaging evidence of other disease processes that might explain the observed clinical and electrophysiological signs

Abbreviations: EMG – electromyographic study; LMN – lower motor neuron; UMN – upper motor neuron

Tabella 2. The revised El Escorial diagnostic criteria (2000)

Diagnosis	Involved segments
Definite ALS	UMN and LMN signs in three regions (bulbar, arm, leg).
Probable ALS	UMN and LMN signs in two regions with at least some UMN signs rostral to LMN signs.

Probable ALS – laboratory supported	UMN signs in one or more regions and LMN involvement defined by EMG in at least two regions.
Possible ALS	UMN and LMN signs in one region. UMN signs in two or more regions. UMN and LMN signs in two regions with no UMN signs rostral to LMN signs.

Abbreviations: EMG – electromyographic study; LMN – lower motor neuron; UMN – upper motor neuron

Tabella 3. The Awaji-shima diagnostic criteria (2008)

Diagnosis	Involved segments
Clinically definite ALS	UMN and LMN signs* in bulbar region + ≥ 2 spinal regions; or UMN and LMN signs in 3 spinal regions**
Clinically probable ALS	UMN and LMN signs in ≥ 2 spinal regions and “with some UMN signs necessarily rostral to the LMN signs”
Clinically possible ALS	UMN and LMN signs in 1 spinal region; or UMN signs in ≥ 2 spinal regions; or LMN signs are found rostral to UMN signs, ONLY AFTER the appropriate neuroimaging and laboratory tests are performed to exclude other possible differential diagnosis that may mimic ALS

* Clinical or electrophysiological signs; ** Spinal regions: upper limbs/lower limbs/thoracic/bulbar
Abbreviations: LMN – lower motor neuron; UMN – upper motor neuron

Nella pratica clinica ciascun specialista utilizza abbastanza indifferentemente i criteri di El Escorial rivisti o i criteri di Hawaji-shima. Ad oggi le malattie del motoneurone hanno ancora discreto ritardo diagnostico per diversi motivi tra i quali la necessità di valutare la progressione della sintomatologia e la difficoltà di comunicazione di una diagnosi di malattia incurabile.

GENETICA DELLE MALATTIE DEL MOTONEURONE

L'analisi dei principali geni coinvolti nella patologia è propedeutica alla trattazione, nella presente tesi, delle nuove prospettive terapeutiche con terapia genica, sia per quanto riguarda le forme giovanili sia quelle a esordio tardivo.

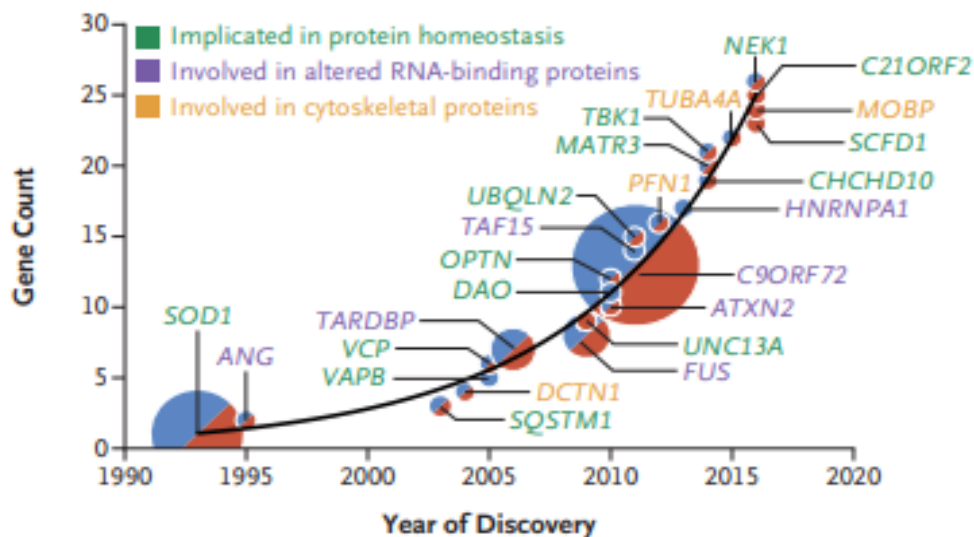


Figure 3. ALS Gene Discovery since 1990.

The cumulative numbers of known ALS genes have increased rapidly. The size of each circle reflects the proportion of all familial ALS cases associated with that gene (e.g., 20% for SOD1 and 45% for C9ORF72). Blue circles indicate genes associated only with familial ALS, red circles indicate genes associated only with sporadic ALS, and circles that are half blue and half red indicate genes associated with both familial and sporadic ALS. Each of these genes has been found to be mutated in more than one ALS-affected family or in multiple, unrelated cases of sporadic ALS.

[15]

La maggior parte delle mutazioni che sono state identificate nelle forme familiari di ALS portano alla patologia con un meccanismo di guadagno di funzione, per cui la proteina prodotta dimostra un aumento delle sue normali funzioni e/o una funzione tossica; spesso queste forme presentano un'ereditarietà autosomica dominante [16]. Il primo gene descritto come causa di ALS è il gene che

codifica per la superossido dismutasi 1 (*SOD1*) che determina la patologia mediante un meccanismo di guadagno di funzione, come è stato dimostrato da studi su modelli animali *SOD1*. L'ALS associata a mutazioni di *SOD1* si caratterizza per la formazione di aggregati proteici con funzione tossica [17] e ha ereditarietà autosomica dominante con penetranza incompleta.

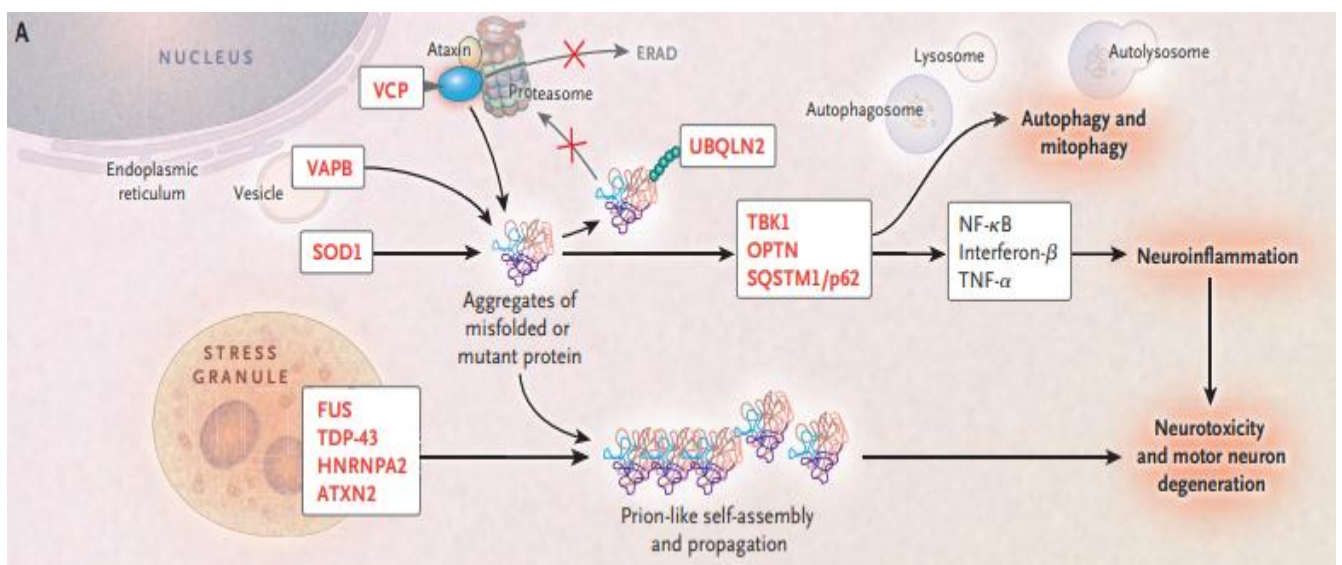
Altri geni associati ad ALS con un meccanismo di guadagno di funzione sono *TARDBP* (TAR DNA-binding protein 43) che codifica per TDP-43, *FUS* e *HNRNPA1* (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1).

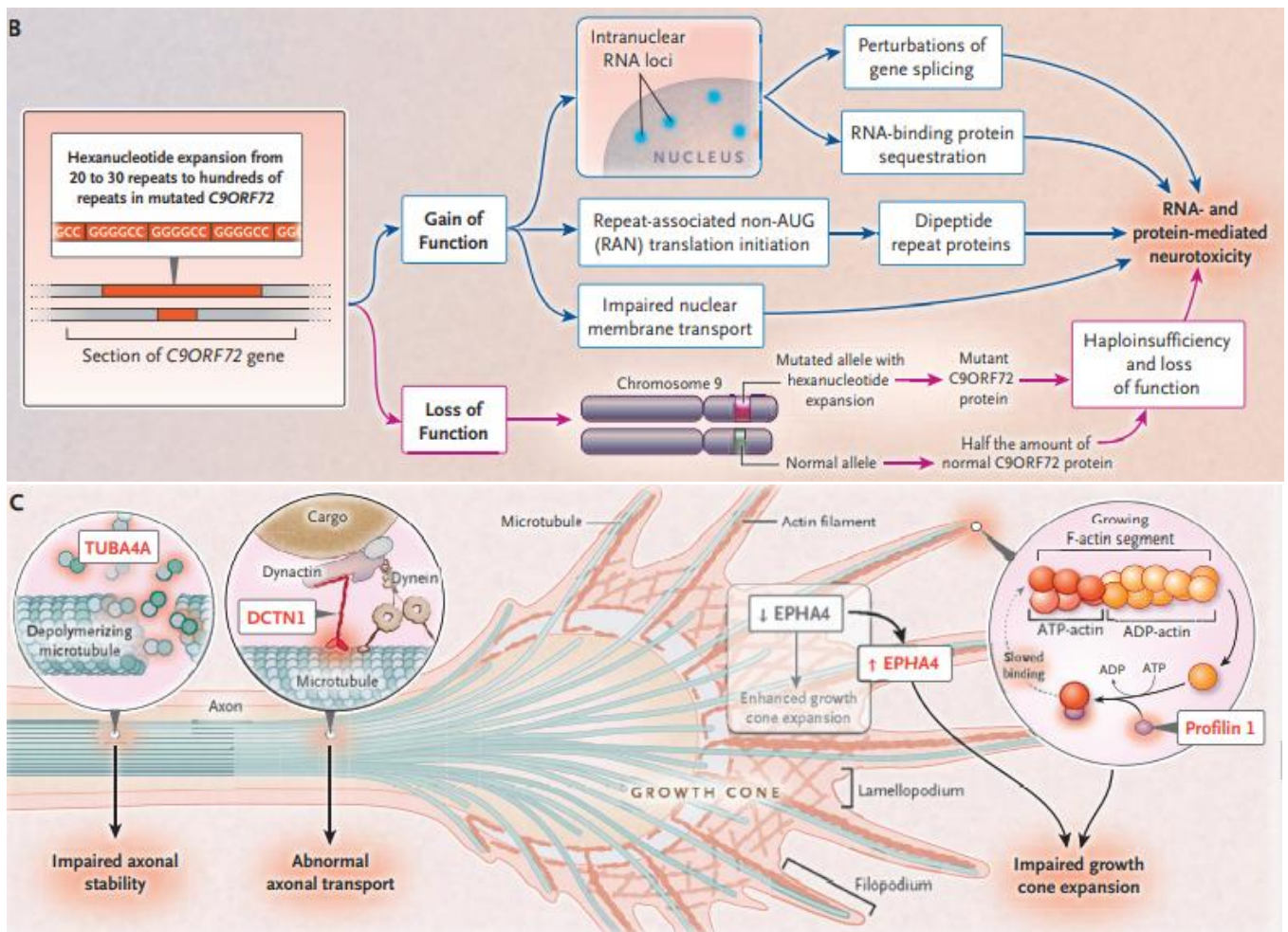
Tutti questi sono geni codificanti per RNA-binding-protein e la loro mutazione determina una serie di eventi cellulari che coinvolgono il metabolismo dell'RNA, la mancata eliminazione di proteine non correttamente formate e la formazione di aggregati proteici tossici.[16]

La più comune causa genetica di ALS nelle popolazioni caucasiche è la mutazione del gene *C9orf72* [18,19] che consiste in una ripetizione di un'espansione esonucleotidica in una porzione del gene non codificante e che esita nella trascrizione di un RNA contenente la regione espansa. Questa mutazione è origine di diversi meccanismi patogenetici tra i quali la traduzione di proteine aberranti con funzione tossica; anche in questo caso, quindi, alla base della ALS abbiamo un meccanismo di guadagno di funzione. [20]

Al contrario, le mutazioni che causano una perdita di funzione, nella maggior parte dei casi con ereditarietà autosomica recessiva, portano ad una proteina parzialmente o totalmente non funzionante. Tra le mutazioni patogenetiche per ALS con perdita di funzione sono state identificate quelle di *OPTN* (optineurin) e *TBK1* (serine/threonine-protein kinase TBK1).

Tuttavia, le mutazioni considerate prevalentemente avere un meccanismo di guadagno di funzione, come quelle in *SOD1* e *C9orf72*, sono state dimostrate avere anche meccanismi di perdita di funzione [21,22] che possono contribuire all'esordio, alla progressione e/o alla gravità della malattia. Quindi per trovare una terapia efficace per i pazienti affetti da ALS è probabilmente necessario avere un approccio terapeutico multi-targeted, agendo sia sui meccanismi di guadagno sia su quelli di perdita di funzione. [23]





[15]

Tra le mutazioni sopra citate, nella presente tesi saranno considerate mutazioni a livello del gene *Fused* in sarcoma (*FUS*), responsabile di forme gravi ad esordio precoce e caratterizzate da eterogeneità clinica. Le mutazioni in questo gene sono responsabili di circa il 4% delle forme di fALS e di meno del 1% delle sALS [24,25,26].

La proteina *FUS* contiene diversi domini, tra cui un motivo di riconoscimento dell'RNA (RNA recognition motif), una regione ricca in glicine, e un segnale di localizzazione nucleare all'estremità C-terminale, [9,27] che fa sì che la proteina wild-type si localizzi prevalentemente nel nucleo dei motoneuroni. Mutazioni a livello dell'estremità C terminale determinano la distruzione del segnale di localizzazione nucleare con conseguente localizzazione a livello citoplasmatico e, in caso di stress cellulare, successiva incorporazione di *FUS* mutata all'interno di granuli citoplasmatici da stress. [28,29]

Questo fenomeno sembra essere rilevante nella patogenesi della patologia e i granuli da stress sono probabilmente i precursori degli aggregati evidenziati nei tessuti umani in studi post mortem sui pazienti. [30]. Tra le mutazioni del gene *FUS*, la mutazione P525L (una sostituzione prolina-leucina nella regione C-terminus) altera la capacità della proteina di essere trasportata nel nucleo; viene trasmessa in modo autosomico dominante a penetranza completa ed ha un impatto devastante: esordio giovanile (spesso inferiore ai 30 anni) e sopravvivenza che spesso non supera l'anno.

Un gruppo di pazienti con ALS ad esordio precoce dovuta alla mutazione del gene *FUS* presentava ritardo mentale o difficoltà di apprendimento; questi pazienti presentano frequentemente delle mutazioni frameshift. [31]

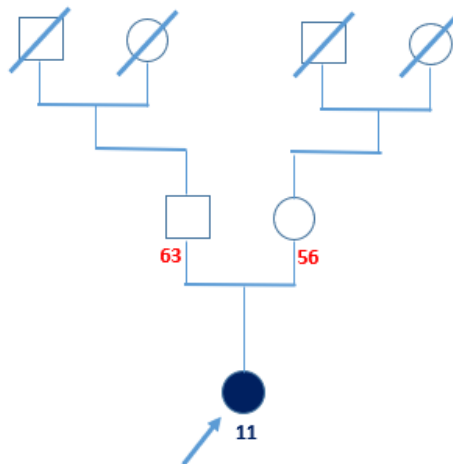
CASI CLINICI

CASO CLINICO 1

Donna, 11 anni

Motivo del primo ricovero: la paziente giunge alla nostra osservazione nell'ottobre 2019 per il sospetto di una lesione al plesso brachiale, in seguito al sollevamento di un peso in agosto 2019. In seguito a questo episodio la paziente aveva manifestato dolore acuto duraturo alla mano destra, seguito poi da debolezza distale dell'arto superiore destro e impossibilità ad abduire il pollice.

Anamnesi familiare: la storia familiare è negativa per patologie neurologiche. Entrambi i genitori sono in buona salute e viene negata consanguineità.



Anamnesi fisiologica: nulla da segnalare durante la gravidanza e il parto. Sviluppo motorio e del linguaggio nella norma. Praticata attività sportiva moderata.

Anamnesi patologica remota: nulla da segnalare, ad eccezione di una non ben definita difficoltà di apprendimento dall'età da 8 anni. A tale proposito non sono stati effettuati accertamenti specifici.

Anamnesi patologica prossima: i genitori riferiscono la comparsa di lievi tremori in entrambe le mani, circa 18 mesi prima dell'ingresso in ospedale.

Decorso clinico

Esame obiettivo neurologico all'ingresso.

- AASS: presenza di tremore segmentale a riposo. Debolezza evidente prossimale all'arto superiore destro (deltoide, bicipiti, tricipiti con forza 3/5, scala MRC), molto marcata nei muscoli distali (muscolo abduktore breve del pollice con forza 2/5, scala MRC). Evidenziata atrofia diffusa, più marcata nell'arto destro.
- AAll: riflessi tendinei profondi simmetrici e vivaci, con normali risposte plantari. Andatura caratterizzata da un incrocio non progressivo e intrarotazione dei piedi e degli arti inferiori.
- Non evidenziate fascicolazioni.
- Rilevato un quadro di disabilità intellettiva di grado lieve (Griffith Mental Development scales IQ 66, valore normale ≥ 70)

Studio neurofisiologico

Gli studi elettrodiagnostici (EDX) ed elettromiografici (EMG) hanno dimostrato una marcata diminuzione dell'ampiezza del potenziale d'azione motorio composto (CMAP) destro (0,2 mV nel lato destro, 13 mV nel lato sinistro) con latenza distale normale e velocità di conduzione motoria leggermente diminuita. L'elettromiografia ad ago dell'abduktore breve del pollice destro ha rivelato segni di denervazione in atto e scarso pattern interferenziale alla contrazione massimale.

I potenziali evocati somato-sensoriali (SEP) dei nervi tibiale e mediano nelle componenti periferiche, spinali e corticali erano normali bilateralmente, con regolare latenza, ampiezza e morfologia; tempo di conduzione centrale nella norma bilateralmente.

EEG normale sia in veglia sia durante il sonno.

Imaging.

Per escludere altre patologie in diagnosi differenziale (sindrome di Parsonage-Turner, malattia di Hyarayama, neuropatia multifocale, atrofia muscolare spinale, infarti midollo spinale e tefromalacia anteriore) sono state effettuate studi neurofisiologici e RNM della spalla e del plesso brachiale, della colonna e dell'encefalo; non sono state rilevate anomalie, a parte una non significativa lieve erniazione delle tonsille cerebellari e tendenza all'inversione della fisiologica lordosi cervicale.

Esami di laboratorio

Sono stati effettuati esami ematologici di routine e test biochimici specifici (inclusa attività dell'esosaminidasi A e B, immunoelettroforesi, livelli di creatinichinasi, organicoaciduria e aminoacidemia del plasma), Ab anti HBV-HCV-HIV, Ab anti-Borellia, effettuata analisi del fluido cerebrospinale e la ricerca degli Ab anti Virus del West Nile (per esordio della sintomatologia motoria con una paralisi flaccida asimmetrica subacuta [32]). Tutti gli accertamenti sono risultati negativi.

È stata effettuata l'analisi Array CGH per la ricerca di microduplicazioni/microdelezioni cromosomiche quale causa di ritardo mentale. Anche questo esame è risultato negativo.

Evoluzione del quadro clinico.

- A dicembre 2019 viene segnalato un peggioramento del quadro clinico con completa perdita della funzione motoria e spasticità del braccio destro con un concomitante peggioramento del quadro neurofisiologico (riduzione dell'ampiezza del cMAP dell'abduktore del mignolo).

Viene quindi avviata la somministrazione di immunoglobuline e.v. senza nessun miglioramento clinico.

- A gennaio 2020 vengono riferiti un ulteriore peggioramento della funzione, soprattutto a livello degli arti inferiori, la comparsa di parestesie a livello della lingua e di coinvolgimento bulbare, con disartria; viene effettuata una spirometria e la capacità vitale forzata risulta dell'86%. Il coinvolgimento degli arti inferiori, associato al peggioramento a livello degli arti superiori viene confermato con test neurofisiologici.
- A febbraio 2020 vengono effettuati test funzionali con stimolazione magnetica transcranica che dimostrano la non eccitabilità della corteccia motoria a destra e il coinvolgimento del I motoneurone del trapezio. Non sono presenti sintomi sensitivi.

In questo modo viene così confermato il coinvolgimento del 1 e 2 motoneurone degli arti superiori, del 1 motoneurone del muscolo trapezio e l'iniziale coinvolgimento del 1 motoneurone degli arti inferiori; questo orienta verso la diagnosi possibile di ALS.

In considerazione della precocissima età di esordio e della rapida evoluzione si suggerisce l'effettuazione di test molecolari nel sospetto di ALS geneticamente determinata.

Nel corso di una consulenza genetica si discutono con i genitori i possibili risultati e le implicazioni del test genetico. Alla fine della consulenza i genitori danno il consenso all'analisi e si procede al prelievo.

Il quadro clinico, incluso il lieve ritardo mentale, suggeriscono l'analisi del gene *FUS*, *in primis*.

Diagnosi genetica

Metodiche utilizzate.

L'analisi dei geni ALS-associati viene effettuata mediante pannello di geni in Next Generation Sequencing. Gli esoni 6,9,11,12,14 e 15 del gene *FUS* sono analizzati anche tramite sequenziamento di Sanger.

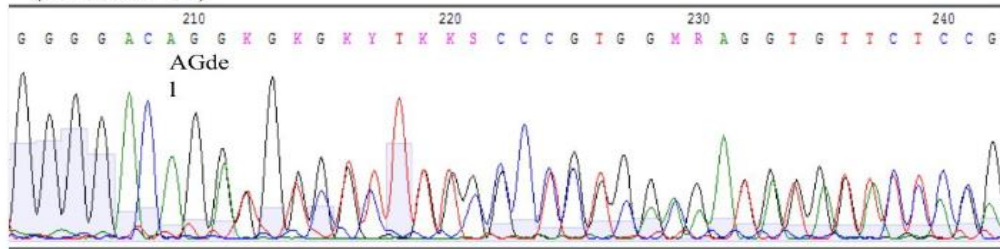
Risultati.

L'analisi NGS dimostra la presenza, in eterozigosi, della delezione c.1509_1510delAG nell'esone 14 del gene, che determina uno stop in posizione 515 della proteina; viene così perso il segnale di localizzazione nucleare. Il risultato molecolare è validato mediante sequenziamento Sanger. Questa variante è già stata descritta in letteratura [36,37], associata a quadri clinici di malattia del motoneurone ad esordio giovanile; tale variante è riportata come causativa nell'Human Genome Mutation Database (HGMD).

Viene inoltre effettuato su linfociti lo studio dell'RNA messaggero e della proteina. Lo studio dell'mRNA dimostra una quantità paragonabile nella paziente e nei controlli; lo studio proteico dimostra una minore quantità di FUS a livello cellulare. Poiché la quantità di mRNA è normale la riduzione della quantità della proteina FUS mutata può essere spiegata da un meccanismo proteolitico post traslazionale. [33] [35]

SLA292

c.1509_1510delAG; p.
(G540Wfs*12)



Wt:

GGGGACAGAGGTGGCTTTGGCCCTGGCAAGATGGATTCCAGGGGT

GAGCAC

Prot: G D R G G F G P G K M D S R R

G E

Mut:

GGGGACAGGTGGCTTTGGCCCTGGCAAGATGGATTCCAGGGGTGA

Prot: G D R W L W P W Q D G F Q G *

Sulla base dei risultati dell'analisi molecolare viene posta la diagnosi di ALS ad esordio precoce (cALS). Lo studio del DNA dei genitori dimostra l'assenza della mutazione in entrambi confermando l'origine *de novo* della mutazione.

Terapia ed evoluzione.

Viene iniziata terapia con Riluzolo.

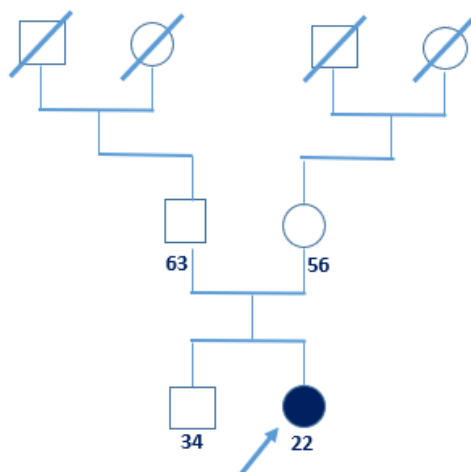
- A marzo 2020 la paziente è sulla sedia a rotelle ed è incapace di scrivere; la spirometria è in peggioramento, con caratteristiche restrittive moderate (capacità vitale forzata 72%).
- A maggio 2020 la disabilità motoria è ulteriormente peggiorata: la paziente è costretta a letto con grave una debolezza al tronco e al collo. Viene rilevato un peggioramento del coinvolgimento bulbare con un pattern restrittivo grave/moderato alla spirometria e l'insorgenza di disfonia.
- A luglio 2020 la paziente è tetraplegica e costretta a letto, incapace di sedersi e di reggere il collo; la disfonia è peggiorata. I riflessi tendinei profondi sono assenti. La paziente non è in grado di tossire e gestire le secrezioni, con conseguente necessità di aspirazione delle stesse. Viene iniziata la ventilazione non invasiva durante la notte ed adattata la dieta alla disfagia progressiva.
- A settembre 2020 vengono eseguite gastrostomia e tracheotomia per ulteriore peggioramento della paziente.

CASO CLINICO 2

Donna, 22 anni

Motivo del primo ricovero: la paziente entra in reparto a novembre 2019 per accertamenti in merito a una rinolalia progressivamente ingravescente, comparsa ad ottobre 2019.

Anamnesi familiare: nega familiarità per malattie neuromuscolari. La paziente ha un fratello riferito in buona salute.



Anamnesi fisiologica: nata a termine da parto eutocico e sviluppo psico-motorio nella norma. Ha sempre praticato attività sportiva anche a livello agonistico. Il ciclo mestruale è regolare, nonostante il calo ponderale riferito negli ultimi mesi. Non sono presenti alterazioni di sonno, alvo e minzione.

Anamnesi patologica remota: nulla di rilevante.

Anamnesi patologica prossima: la paziente riferisce la recente comparsa di rinolalia ingravescente, senza significative alterazioni nell'arco della giornata, e progressiva ipostenia ai 4 arti; riferisce inoltre la comparsa di disfagia importante per i liquidi. Nel novembre 2019 si verifica un episodio broncopolmonitico probabilmente *ab ingestis*. Inoltre la paziente riferisce un calo ponderale di circa 10 kg negli ultimi mesi, (peso al ricovero 36 kg), e la presenza di saltuarie fascicolazioni diffuse e crampi ai polpacci.

Decorso clinico

Esame obiettivo neurologico all'ingresso:

- La paziente appare vigile e orientata nel tempo e nello spazio.
- A livello del settore cranico: deficit dei muscoli estensori e flessori del capo, ipotrofia linguale bilaterale con fascicolazioni e paralisi del velo palatino con un'importante rinolalia.
- A livello dei 4 arti deficit di forza e, prevalentemente a livello degli arti superiori tremore posizionale bilaterale. La sensibilità e la coordinazione risultano nella norma. Vengono evidenziate fascicolazioni a livello della coscia sinistra e dei muscoli paravertebrali. I ROT

sono vivaci e simmetrici e i rotulei appaiono policinetici bilateralmente; non sono invece presenti significativi deficit dell'andatura.

- È presente una diffusa atrofia muscolare con interessamento cranico e dei 4 arti.

Studio neurofisiologico: le indagini neurofisiologiche eseguite evidenziano segni di sofferenza neurogena cronica, con segni di denervazione in atto, su tutti i muscoli esaminati.

Altre indagini

Nel mese di gennaio 2020 viene effettuata una TC del massiccio facciale che appare sostanzialmente nella norma.

Viene effettuata una visita foniatrica con esecuzione di una fibroscopia che evidenzia marcata rinolalia e ipotrofia linguale.

Esami di laboratorio: tutti gli esami eseguiti risultano nella norma.

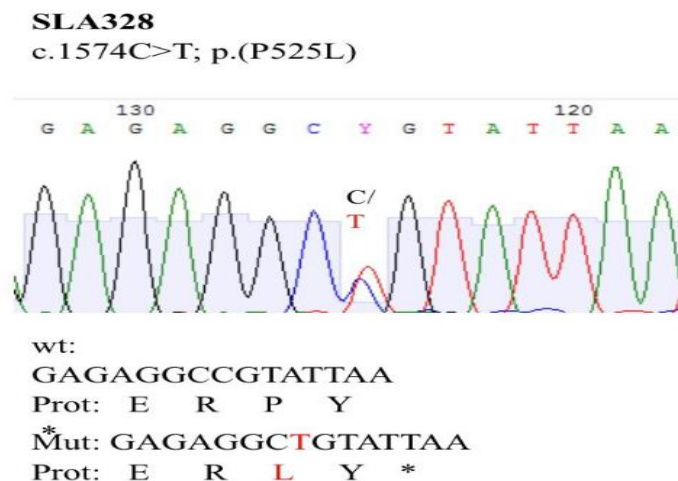
Diagnosi genetica

Metodiche utilizzate

L'analisi dei geni ALS-associati viene effettuata mediante pannello di geni in Next Generation Sequencing. Gli esoni 6,9,11,12,14 e 15 del gene *FUS* sono analizzati anche tramite sequenziamento di Sanger.

Risultato

L'analisi NGS dimostra la presenza, in eterozigosi, della mutazione missenso c.1574C>T (p.P525L) nell'esone 15 del gene, che determina un cambio aminoacidico nella proteina. Il risultato in NGS è validato mediante sequenziamento Sanger. Questa variante è stata già descritta in letteratura, anche nella popolazione italiana [8,9,38,39,40], associata a quadri clinici di malattia del motoneurone ad esordio precoce; è riportata come causativa in HGMD.



Viene posta così la diagnosi di ALS ad esordio precoce (cALS). Lo studio del DNA dei genitori dimostra l'assenza della mutazione in entrambi confermando l'origine *de novo* della mutazione.

Terapia ed evoluzione

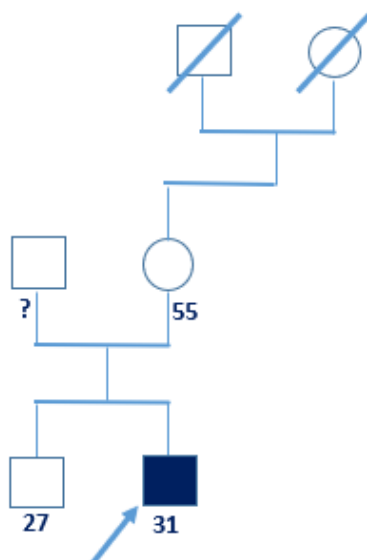
Viene iniziata terapia con Riluzolo.

CASO CLINICO 3.

Uomo, 31 anni

Motivo del ricovero: il paziente viene ricoverato a maggio 2020 per ipotrofia muscolare e ipostenia dei 4 arti con riscontro di segni di denervazione attiva e positività per gli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina (anti-AchR). Al momento del ricovero non sono presenti segni di coinvolgimento del primo motoneurone.

Anamnesi familiare: la madre e il fratello vengono riferiti in buona salute; l'anamnesi paterna non è nota.



Anamnesi fisiologica: il paziente riferisce alvo e diuresi regolari e una perdita di peso importante (di circa 40 kg) nell'ultimo anno.

Anamnesi patologica remota: nulla di rilevante.

Anamnesi patologica prossima: circa 10 anni prima degli eventi che hanno condotto al ricovero, il paziente riferisce l'esordio di una ptosi palpebrale dell'occhio sinistro che, nonostante gli accertamenti eseguiti, non viene meglio caratterizzata; nel 2017, durante una visita neurologica, viene evidenziata una ptosi nettamente sensibile all'affaticamento. Vengono quindi dosati gli anticorpi per la miastenia gravis (anti-AchR, Anti-rianodina e anti-titina) che risultano nella norma. Viene quindi eseguita una RMN dell'encefalo che mostra un'area di alterato segnale in sede cerebellare destra, iperintensa in T2 e FLAIR, ovalare, di 18 mm e con l'utilizzo del Gadolinio non mostra prese di contrasto patologiche. Lo studio in Angio-RM risulta nella norma. Viene quindi posta

una possibile diagnosi differenziale tra un tumore disembrionico neuroepiteliale (DNET) e una displasia corticale. Viene quindi richiesta una valutazione neurochirurgica che indica la necessità di un controllo con una RMN dell'encefalo a 3 mesi. A gennaio 2018 viene quindi eseguita la RNM con risultato invariato, ad eccezione di altre due piccole aree con alterato segnale, una in sede cerebellare destra inferiore e l'altra in sede corticale temporale superiore destra

Evoluzione del quadro clinico

- A luglio 2019 il paziente riferisce sensazione di peso e impaccio motorio all'arto inferiore sinistro a cui si associa ipostenia; esegue quindi, su indicazione del medico di medicina generale, un'ulteriore RNM dell'encefalo, che risulta invariata rispetto alla precedente, e una RMN cervicale che risulta nella norma.
- A ottobre 2019 viene ricoverato in regime di Day Hospital presso la Clinica Neurologica. Esame obiettivo neurologico: ipostenia all'arto inferiore sinistro, prova del saltello e deambulazione su punte e talloni sostanzialmente impossibile, riflessi osteotendinei deboli ma presenti agli arti superiori, assenti invece rotuleo, achilleo e medioplantare a sinistra. Vengono eseguiti numerosi accertamenti, prevalentemente nel sospetto di una patologia autoimmune: ANA 1:160 pattern speckled, ENA negativi, lieve aumento degli anticorpi anti-fosfatidilserina. Anticorpi per miosite negativi, ad eccezione di una debole positività per Mi-1 Beta. Esame del liquor cefalorachidiano: esame citochimico nella norma, presenza di tenui bande.

Potenziali evocati visivi (PEV): morfologia dei potenziali irregolare bilateralmente; latenza della componente p100 nella norma.

Potenziali evocati somatosensoriali (SEP) agli arti inferiori: reperto alterato per stimolazione a sinistra per aumento in latenza del potenziale lombare e, consensualmente, del potenziale corticale: tempo di conduzione centrale nella norma e simmetrico.

Potenziali evocati motori (PEM) agli arti inferiori: per intolleranza all'esame è stata erogata una stimolazione a bassa intensità: con tali limiti i valori risultano nella norma.

Studio neurofisiologico: quadro elettroencefalografico complesso consistente in segni espressivi di lesione neurogena periferica diffusa in assenza di significative alterazioni.

RM encefalo: si osservano un'alterazione del segnale iperintensa in T2 e FLAIR di circa 17 mm di diametro massimo in sede cerebellare emisferica laterale destra e due aree analoghe, ma più piccole, di alterato segnale in sede cerebellare emisferica inferiore destra e nello splenio del corpo calloso in sede centrale. Tali reperti sono privi di specificità.

RM della colonna cervico-dorsale nella norma.

Dosaggio anticorpi anti- AchR: 3,4 nmol/L

- A gennaio 2020 eseguito test genetico per sospetta Lhermitte Duclos che risulta ancora in corso a maggio quando il paziente viene ricoverato. Il paziente viene quindi trattato con un bolo steroideo di metilprednisolone, 1 g e.v. per 3 giorni, senza beneficio.

Decorso clinico durante il ricovero di maggio 2020

Esame obiettivo neurologico all'ingresso:

- Al settore cranico: ptosi in occhio sinistro. Deficit dell'orbicolare dell'occhio bilateralmente. Non riferisce diplopia. Presenza di fascicolazioni alla lingua con ipotrofia dell'emilingua sinistra.

- Agli arti superiori: tremore da affaticamento durante il test di Mingazzini I, soprattutto a sinistra. Deficit di forza diffuso, soprattutto a sinistra. ROT deboli.
- Agli arti inferiori: ipostenia diffusa, prevalente a sinistra. ROT: rotuleo accennato a destra, sinistro assente. Achilleo a destra presente, assente a sinistra.
- Allo sforzo fisico, anche durante la visita, compaiono crampi muscolari soprattutto al collo.
- Si segnalano fascicolazioni a livello del bicipite sinistro, quadricipite sinistro e sul dorso.
- Diffusa ipotrofia.
- Non sono presenti deficit di sensibilità o coordinazione, né fenomeni miotonici.
- Andatura steppante a sinistra, impossibile su punte, talloni e in tandem. Difficoltà ad alzarsi da accovacciato.

Studio neurofisiologico: mostra un peggioramento del quadro. Si conferma la modesta alterazione dei PEV e la presenza di alterazioni all'EMG indicative di sofferenza neurogena periferica, con denervazione attiva e cronica anche sui muscoli paravertebrali. Si segnala inoltre che il muscolo gastrocnemio destro, indenne al controllo di gennaio, risulta attualmente alterato.

Esami di laboratorio: si segnala CPK 507 U/L. Marcatori tumorali negativi e Ab anti-Ach-R=4

Imaging:

Eseguita TC total body e ecocolordoppler per escludere una genesi paraneoplastica: entrambe nella norma.

Evoluzione del quadro clinico durante il ricovero.

Viene eseguito un ciclo di immunoglobuline e.v. al dosaggio di 0,4 g/kg/dia in cinque giorni, con un iniziale miglioramento della forza a livello del deltoide sinistra. Si decide inoltre di avviare terapia con Mestinon, successivamente sospesa per inefficacia clinica e per il peggioramento della sintomatologia crampiforme; viene quindi introdotta per i crampi terapia con carbamazepina con netto miglioramento clinico.

Per la presenza di uno screezio autoimmune (per la presenza di pregresso rilievo di positività ANA 1:160, della positività per gli anticorpi anti-AchR e di tenui bande oligoclonali sul liquor) e data l'iniziale risposta alla terapia con immunoglobuline, si orienta la diagnosi verso una sindrome a genesi autoimmune, nello spettro della neuromiotonia; la diagnosi differenziale è con una malattia del motoneurone.

Il paziente viene quindi dimesso, quando ancora si è in attesa del risultato del dosaggio degli anticorpi anti-sistema nervoso centrale e onconeurali nel sospetto di una sindrome da ipereccitabilità neuromuscolare (risultato successivamente negativo), con indicazione a un secondo ciclo di Immunoglobuline e.v. e ricovero presso una struttura di riabilitazione specialistica.

Viene segnalata una chiara progressione del quadro clinico del paziente e viene quindi proposto, nel corso di una consulenza genetica, di effettuare, con il consenso del paziente test molecolari per malattia di Kennedy, che risulta negativa, e per patologia del motoneurone.

Diagnosi genetica

Metodiche utilizzate

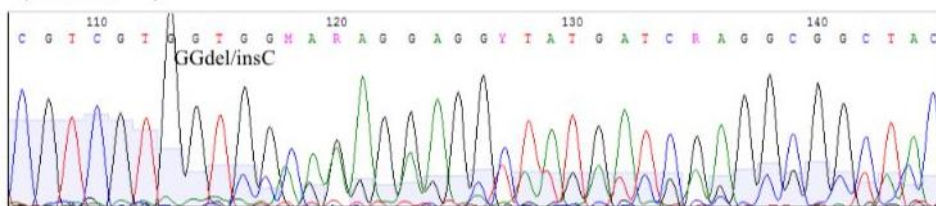
L'analisi dei geni ALS-associati viene effettuata mediante pannello di geni in Next Generation Sequencing. Le varianti identificate sono state poi confermate mediante sequenziamento con metodo di Sanger.

Risultato: Viene identificata una mutazione di *FUS* (NM_004960) c.1423_1424delinsC p.(G475Pfs*54).

La valutazione del cambio aminoacidico introdotto dalla variante nella proteina, effettuata mediante sistemi di predizione bioinformatici, ne suggerisce un probabile effetto patogenetico anche se questa variante non è mai stata riportata in letteratura.

SLA330

c.1423_1424delinsC; p.
(G475Pfs*54)



Wt: CGTCGTGGTGGCAGAGGAGGCTATGATCGAGGCGGCTACCGGGGCCGCGGCGGGGACCGTGGAGGCTTC
Prot: R R G G R G G Y D R G G Y R G R G G D R G G F
Mut: CGTCGTGGTCCAGAGGAGGCTATGATCGAGGCGGCTACCGGGGCCGCGGCGGGGACCGTGGAGGCTTCCGAG
Prot: R R G P E E A M I E A A T G A A A G T V E A S E

Terapia ed evoluzione

Viene iniziata la terapia con Riluzolo.

Le condizioni cliniche attuali si caratterizzano per un grave deficit di forza distale alla gamba sinistra e per una grave compromissione della capacità di camminare. È presente una diffusa ipotrofia muscolare, soprattutto all'arto inferiore sinistro e ad entrambe le mani; la disartria è lieve ma comunque evidente. Il paziente, inoltre, lamenta una sempre maggiore difficoltà a tenere la testa sollevata e la funzione respiratoria è in continuo peggioramento.

In considerazione del quadro clinico grave e rapidamente progressivo si prende in considerazione la possibilità di utilizzare un approccio di terapia genica mirato alla mutazione di *FUS* identificata dallo studio molecolare. Tale terapia genica è ancora in fase sperimentale e viene quindi richiesta la possibilità di inserire il paziente all'interno di un programma sperimentale di medicina personalizzata con l'ASO Jacifusen, già utilizzato per altri pazienti con mutazione del gene *FUS* e fornito per compassionevole uso dall'università della Columbia.

TERAPIA PER ALS

Terapia convenzionale

Ad oggi la ALS è una patologia incurabile, ma non per questo deve essere considerata non trattabile. Il management della patologia è cambiato moltissimo negli ultimi decenni e, per quanto non siano stati ancora identificati farmaci che arrestino o addirittura ribaltino il progressivo danno neuronale,

ci si è maggiormente concentrati su strategie di gestione dei pazienti in modo da migliorarne la qualità di vita e mantenerne l'autonomia per il maggior tempo possibile.

L'approccio nei confronti di questi pazienti deve essere multidisciplinare, con la partecipazione non solo di neurologi, ma anche di altri specialisti, di fisioterapisti, logopedisti, terapisti per la respirazione e dietisti, in modo da trattare e alleviare la sintomatologia di questi pazienti; con questo approccio, oltre ad aumentare la sopravvivenza dei pazienti, è indubbiamente migliorata soprattutto la qualità di vita.

Table 4: Palliative care for ALS symptoms

Symptoms	Treatment
Disability and weakness	Orthotics (ankle foot orthosis, neck collars) Physiotherapy Adaptive aids (walking frame, wheelchair)
Dysphagia	Assessment by speech therapist and dietitian Safe swallowing techniques and modified diet Insertion of gastrostomy tube dyspnea and poor cough Ventilator support Morphine or benzodiazepines Chest physiotherapy Suction machine Manually assisted coughing techniques
Pain (i.e., musculoskeletal pain and cramps, fasciculations and spasticity, skin pressure pain caused by immobility)	Physiotherapy, NSAIDs Muscle relaxants (baclofen, botulinum toxin) Anticonvulsants (gabapentin) Re-positioning and pressure area care Opioid drugs Pressure-relieving cushions and mattress
Dysarthria	Assessment by speech pathologist Communication aids Educate family and caregivers Cognitive changes (frontal lobe dysfunction or dementia) Explain symptomatology to caregivers and family Antidepressant therapies
Sialorrhea	Anticholinergic antidepressants (amitriptyline) Anticholinergic drugs (glycopyrronium bromide) Botulin toxin injections Radiation of salivary glands Mouth care products Suction
Thickened saliva	Natural remedies (papaya) Ensure adequate hydration Saline nebulisers; nebulised N-acetylcysteine Suctioning of the mouth Mouth care
Emotional lability	Educate patients with ALS and caregivers Amitriptyline Benzodiazepines Dextromethorphan hydrobromide/quinidine sulfate
Depression and anxiety	Counseling Benzodiazepines Antidepressants
Sleep disturbance	Treat underlying problem Respiratory review, noninvasive ventilation Benzodiazepines, tricyclic antidepressants
Constipation	Dietary changes (increase fluid and fiber intake) Use formulations high in bran, bulk, or fiber Regular oral aperients (Movicol or suppositories)

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis, NSAIDs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs

Per quanto riguarda le opportunità farmacologiche il **Riluzolo** è ad oggi l'unico farmaco approvato dall'FDA ad avere un effetto benefico sulla sopravvivenza dei pazienti con ALS; diminuisce l'effetto neurotossico del glutammato attraverso tre meccanismi: attivazione dell'inibizione pre-sinaptica e conseguente inibizione del rilascio del glutammato dai terminali dei nervi cerebrocorticali, inattivazione dei canali del sodio Voltaggio-dipendenti ed è un antagonista non competitivo del recettore NMDA. La dose raccomandata di Riluzolo è di 50 mg 2 volte al giorno in soggetti con ALS diagnosticata o probabile, con esordio della malattia da meno di 5 anni, FVC >60% e non tracheostomizzati [41]. In realtà il Riluzolo ha mostrato solo un modesto, quasi insignificante, effetto sulla sopravvivenza (un incremento di 3 mesi circa, su una sopravvivenza mediana, come storia naturale di malattia, di 33-56 mesi) [42,43]

Recentemente è stato introdotto in Italia, grazie a una Determina dell'AIFA (n° 1224/2017), un farmaco antiossidante, l'**Edaravone** [44], i cui effetti sulla malattia si sono rivelati estremamente deboli, se non nulli.[45]

Terapia non convenzionale

Grazie agli studi molecolari e dei meccanismi patogenetici a livello cellulare è stato possibile comprendere alcuni dei meccanismi chiave della patologia, così da progettare nuove terapie che mirino specificamente, attraverso diversi approcci, alla correzione dei pathways metabolici e cellulari alterati nell'ALS.

Un primo approccio è quello di ridurre i livelli dei prodotti genici mutati (mRNA e/o proteine) nei pazienti portatori di mutazioni in geni coinvolti nella patogenesi della patologia, in modo da ridurre il trigger patogeno per consentire ai neuroni di recuperare la loro normale funzione; esempio di questo tipo di terapie sono gli **oligonucleotidi antisenso (ASO)** diretti contro alleli mutanti, che sono già stati testati per la mutazione di SOD 1 [46], e che potrebbero essere utilizzati anche per mutazioni a livello di *MAPT*, *TARDBP* e *FUS*. In questi pazienti la **terapia genica** risulta essere il trattamento più promettente in quanto progettata per eliminare o ridurre la noxa patogena alla base del meccanismo di malattia.





La terapia genica può essere utilizzata in diversi approcci:

- Inserire una copia normale di un gene mutato (sostituzione del gene)
- ridurre l'espressione del gene causale (gene knock-out)
- introdurre un fattore protettivo (geni modificatori)
- modificare il genoma mutante (gene-editing)

Alcuni approcci di terapia genica non utilizzano vettori virali ad esempio gli Oligonucleotidi AntiSenso (ASO) e gli Small interfering RNAs (siRNA); entrambi questi metodi generalmente diminuiscono la quantità di mRNA o di proteina mutata diminuendo il trigger patogenetico della cellula o del neurone colpito.

In altri casi, per il tipo di tessuto coinvolto o per il processo patogenetico alla base della malattia è più efficace un approccio di terapia genica in cui vengono utilizzati virus modificati come vettori, che differiscono per tropismo, interazione con il genoma dell'ospite, capacità di packaging ed efficienza.

Table 1. This table summarizes the different approaches for *in vivo* gene transfer.

Tools for In Vivo Gene Therapy and Their Characteristics			
Non-viral strategies	 Antisense Oligonucleotides (ASO)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 13–25 nucleotide long, single-stranded nucleic acid (RNA or DNA) ✓ Induction of mRNA degradation through activation of RNaseH ✓ In clinical trial for SOD1-ALS and C9-ALS ✓ ASOs can be produced by plasmids encoding for small nuclear RNA particles (such as modified U7) 	ASOs and siRNAs are rapidly degraded by endonucleases and require repeated invasive injection into the central nervous system for ALS treatment. When encoded by plasmids they can be delivered using viral vectors for stable transduction.
	 Small Interfering RNAs (siRNA)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 19–23 nucleotide long, double-stranded RNA ✓ Induction of mRNA degradation through nucleases activity ✓ They can be continuously produced by plasmids encoding short-hairpin RNA or artificial microRNA 	
Viral vector-mediated strategies	 Lentiviral (LV) vectors	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Large cloning capacity (8–10 Kb) ✓ Transduction of dividing and non-dividing cells ✓ Long-term transgene expression in dividing cells 	LV have a broad tropism and transduce areas close to the injection site. They integrate into the host genome and have a mutagenic risk.
	 Adeno-Associated virus (AAV) vectors	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Transduction of dividing and non-dividing cells ✓ Non pathogenic ✓ Specific tropism for different cell types, according to serotypes ✓ Persistence in the cells as extra-chromosomal episomes ✓ Low risk of insertional mutagenesis 	AAV have many advantages for clinical application, but they have a small cloning capacity (single stranded: about 4.7 Kb; self complementary: about 2.4 Kb).

[47]

Gli **oligonucleotidi antisense** in grado di legarsi alla specifica sequenza di mRNA del gene mutato così da diminuire il contributo genetico alla patogenesi; gli ASO sono stati prevalentemente studiati in pazienti con SMA (Nusinersen), in individui portatori di ripetizioni in regioni non codificanti responsabili di Distrofia miotonica 1 [48,49], in soggetti con Malattia di Batten (Milasen) e potrebbero quindi essere utilizzati anche nella ALS.

Si parla quindi di medicina genetica personalizzata: sulla base della conoscenza della specifica mutazione patogena è possibile progettare un farmaco e proporlo come terapia per quel determinato paziente. La somministrazione a un soggetto con patologia rara è possibile grazie alla creazione, da parte delle Autorità regolatorie del farmaco (FDA/EMA), del programma Expanded Access ancora registrati e/o non ancora in commercio (DM 07-09-2017) (in Italia assimilabile all'uso compassionevole), che prevede la possibilità di utilizzare un farmaco per il quale non ci sono ancora dati di un trial clinico di supporto, per pazienti privi di alternative terapeutiche. [50,51]

Uno dei limiti degli ASO è che non passano la barriera ematoencefalica; per raggiungere il cervello e il midollo spinale devono quindi essere somministrati direttamente all'interno del CSF con puntura lombare.

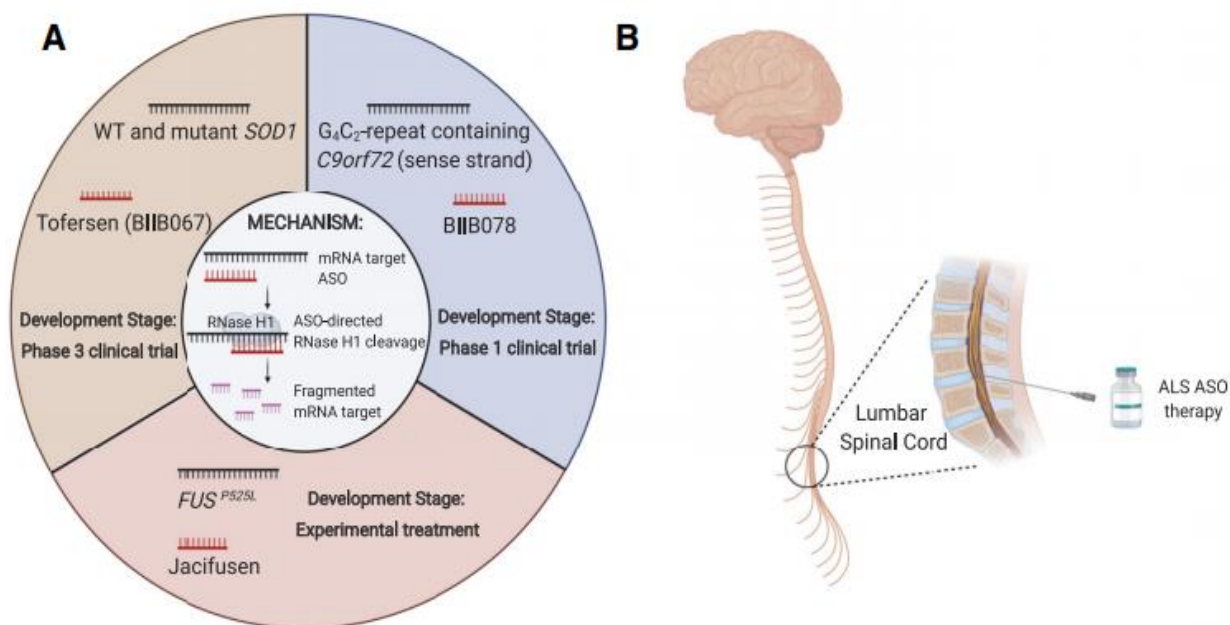


Figure 1. ASOs Targeting Mutant ALS Genes

(A) ASOs targeting mRNA from three ALS genes—SOD1, C9ORF72 and FUS—for degradation have been administered to human ALS patients. These ASOs are at various stages of development, as indicated.

(B) ASOs are delivered broadly throughout the central nervous system after injection into the cerebrospinal fluid at the base of the spinal cord (intrathecal administration). [33]

I pazienti oggetto della presente tesi potrebbero beneficiare dell'oligonucleotide antisense **Jasifusen**, già utilizzato in alcune forme di ALS dovute a mutazione del gene *Fus*.

Jasifusen è stato utilizzato per la prima volta nel 2019 per una giovane ragazza americana di nome Jaci Hermstad, da cui appunto il nome del farmaco. La giovane, all'età di 25 anni, ha riscontrato una crescente riduzione di forza nelle gambe e difficoltà a salire le scale. Poiché la sorella gemella di Jaci si era ammalata di SLA 14 anni prima ed era deceduta 6 anni dopo, Jaci è stata inviata al Centro SLA della Columbia University, diretto dal Dottor Neil Shneider; è stata quindi sottoposta a test genetici da cui è risultata la presenza della mutazione P525L nel gene *FUS* [9,10].

Sulla scorta del recente studio sulla malattia di Batten, in cui un ASO (Milasen), utilizzato secondo l'Expanded Access Program della FDA, aveva cambiato la storia naturale di una piccola paziente affetta [52], il dr Shneider ha deciso di rivolgersi all'Azienda Ionis Pharmaceuticals Inc, la stessa azienda che ha creato l'ASO Nusinersen per la SMA, col fine di disegnare e "costruire" un ASO specifico per la mutazione P525L [53]. L'ASO specifico, chiamato appunto Jasifusen, era pronto già prima del mese di maggio 2019 e, dopo qualche resistenza, l'FDA, pur non approvandolo per una commercializzazione, ne ha concesso l'utilizzo; nel mese di giugno 2019 veniva iniziato il trattamento. [54]

Jeci Hermstad è stata ricoverata e sottoposta a cicli quindicinali di infusione intrarachidea di Jasifusen; la patologia sembra presentare un concreto rallentamento. Jaci è risultata stabile nei mesi successivi ed è stata sottoposta ad un altro ciclo di otto infusioni nell'autunno 2019. [55]

In base a questa esperienza i colleghi neurologi dell'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino che seguono i pazienti qui descritti e da noi diagnosticati hanno richiesto una collaborazione alla Columbia University per somministrare il farmaco a Genova.

Grazie all'iniziativa personale del dottor Daniele Michelis, specializzando in Neurologia, che ha scritto direttamente al dottor Neil Shneider, è in corso la pratica per l'ottenimento del parere del Comitato Etico per l'utilizzo di Jacifusen per questi pazienti.

Il processo è stato facilitato dal fatto che, presso un altro centro italiano (Neurologia e Neurofisiopatologia, A.O.U.P. "P. Giaccone", Università di Palermo) è stato ottenuto il parere favorevole del Comitato Etico per l'utilizzo di Jacifusen in un loro paziente con mutazione FUS. Le pratiche amministrative per l'invio del farmaco all'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino sono al momento in corso.

CONCLUSIONI

La diagnosi di malattie del motoneurone ed in particolare di sclerosi laterale amiotrofica è, da sempre, una diagnosi che coinvolge il paziente e il clinico a diversi livelli; la mancanza di biomarcatori, il processo diagnostico spesso non univoco, l'assenza attuale di terapie efficaci, la possibilità di forme geneticamente determinate e quindi il rischio per i familiari precipitano il paziente, la famiglia e il curante in una situazione di grave distress psicologico e di impotenza.

La diagnosi di ALS giovanile è, se possibile, ancora più drammatica ed è quindi evidente il beneficio offerto dalla possibilità di nuove terapie innovative che stanno ormai diventando trial clinici.

La presente tesi vuole offrire una speranza per tutti coloro che sono trascinati in prima persona o come caregivers in questa difficile e complessa condizione clinica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Renton, A.E.; Chiò, A.; Traynor, B.J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* 2014
- (2) Taylor, J.P.; Brown, R.H.; Cleveland, D.W. Decoding ALS: From genes to mechanism. *Nature* 2016
- (3) Brown, R.H.; Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2017
- (4) Mathis, S.; Goizet, C.; Soulages, A.; Vallat, J.-M.; Masson, G.L. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. *J. Neurol. Sci.* 2019
- (5) Alonso, A.; Logroscino, G.; Jick, S.S.; Hernán, M.A. Incidence and lifetime risk of motor neuron disease in the United Kingdom: A population-based study. *Eur. J. Neurol.* 2009
- (6) Logroscino, G.; Piccininni, M. Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. *NED* 2019
- (7) Fecto, F., Siddique, T., 2011. Making connections: pathology and genetics link amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobe dementia. *J. Mol. Neurosci.*
- (8) Leblond, C.S., Webber, A., Gan-Or, Z., Moore, F., Dagher, A., Dion, P.A., Rouleau, G.A., 2016. De novo FUS P525L mutation in Juvenile amyotrophic lateral sclerosis with dysphonia and diplopia. *Neurol. Genet.* 2
- (9) Conte, A., Lattante, S., Zollino, M., Marangi, G., Luigetti, M., Del Grande, A., Servidei, S., Trombetta, F., Sabatelli, M., 2012. P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul. Disord. NMD*
- (10) Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009
- (11) Picher-Martel, V., Brunet, F., Dupré, N., Chrestian, N., 2020. The occurrence of FUS mutations in pediatric amyotrophic lateral sclerosis: a case report and review of the literature. *J Chil Neurol*
- (12) 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. *Journal of Neurological Sciences* 1994;124 Suppl:96-107.
- (13) Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 2000;1(5):293-299.
- (14) Geevasinga N, Menon P, Scherman DB, Simon N, Yiannikas C, Henderson RD, Kiernan MC, Vucis S. Diagnostic criteria in amyotrophic lateral sclerosis: A multicenter prospective study. *Neurology* 2016;87(7):684-690.
- (15) Brown, R.H.; Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2017
- (16) Taylor et al.. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*
- (17) Bruijn et al., 1997; Deng et al., 1993; Gurney et al., 1994; Rosen et al., 1993; Wong et al., 1995
- (18) DeJesus Hernandez et al., 2011; Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS
- (19) Renton et al., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 in the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD
- (20) Gitler and Tsuiji, 2016; There has been an awakening: Emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS.

- (21) Fredi, M., Cavazzana, I., Biasiotto, G. *et al.* C9orf72 Intermediate Alleles in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis, Systemic Lupus Erythematosus, and Rheumatoid Arthritis. *Neuromol Med*
- (22) Ismail et al., 2013; Concurrence of multiple sclerotic and amyotrophic lateral sclerosis in patients with hexanucleotide repeat expansions of C9orf72
- (23) Kim et al., 2020; ALS Genetics: Gain, losses and implications for future therapies.
- (24) Vance C, Rogelj B, Shaw C. Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science*. 2009
- (25) Kwiatkowski T Jr, Bosco D, Brown R Jr. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. 2009
- (26) Belzil VV, Valdmanis PN, Dion PA, Daoud H, Kabashi E, Noreau A, et al. Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations. *Neurology*. 2009
- (27) Zou ZY, Cui LY, Sun Q, Li XG, Liu MS, Xu Y, et al. De novo FUS gene mutations are associated with juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis in China. *Neurobiol Aging*. 2013
- (28) Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, et al. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt transportin-mediated nuclear import. *The EMBO Journal*. 2010
- (29) Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, Kathe C, et al. ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet*. 2013
- (30) Mackenzie I, Ansorge O, Neumann M. Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta Neuropathol*. 2011
- (31) Zou ZY, Cui LY, Sun Q, et al. De novo FUS gene mutations are associated with juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis in China. *Neurobiol*
- (32) Yu, A., Ferenczi, E., Moussa, K., Elliott, D., Matiello, M., 2020. Clinical spectrum of West Nile virus neuroinvasive disease. *Neurohospitalist*
- (33) P. Lanteri, I. Meola, A. Canosa et al., The heterozygous deletion c.1509_1510delAG in exon 14 of FUS causes an aggressive childhood-onset ALS with cognitive impairment, *Neurobiology of Aging*
- (34) Chiò, A., Restagno, G., Brunetti, M., Ossola, I., Calvo, A., Mora, G., Sabatelli, M., Monsurrò, M.R., Battistini, S., Mandrioli, J., Salvi, F., Spataro, R., Schymick, J., Traynor, B.J., Bella, La, 2009. Two Italian kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to FUS mutation.
- (35) Grassano, M., Calvo, A., Moglia, C., Brunetti, M, Barberis, M, Sbaiz, L, Canosa, A, Manera, U., Vasta, R., Corrado, L., D'Alfonso, s., Mazzini, L., Scholz, S.W., Dalgard, C., Ding, J., Gibbs, R.J., Chia, R., Traynor, B.J., Chiò, A., 2020. Mutational analysis of known ALS genes in an Italian population-based cohort.
- (36) Kent, L., Vizard, T.N., Smith, B.N., Topp, S.D., Vance, C., Gkazi, A., Miller, J., Shaw, C.E., Talbot, K., 2014. Autosomal dominant inheritance of rapidly progressive amyotrophic lateral sclerosis due to a truncation mutation in the fused in sarcoma (FUS) gene. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 15, 557–562. doi:10.3109/ 21678421.2014.920033
- (37) Hirayanagi K, Sato M, Furuta N, Makioka K, Ikeda Y. Juvenile-onset Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis with a Frameshift FUS Gene Mutation Presenting Unique Neuroradiological Findings and Cognitive Impairment. *Intern Med.* 2016;55(6):689-93. doi: 10.2169/internalmedicine.55.5569. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26984092.
- (38) Zhou B, Wang H, Cai Y, Wen H, Wang L, Zhu M, Chen Y, Yu Y, Lu X, Zhou M, Fang P, Li X, Hong D. *Brain Behav.* 2020 Jun;10(6):e01625. doi: 10.1002/brb3.1625.

- (39) Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M, Hashimoto T, Shibuya M, Arai M, Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K, Mihara B, Mizutani T. Familial ALS with FUS P525L mutation: two Japanese sisters with multiple systems involvement. *J Neurol Sci*. 2012 Dec 15;323(1-2):85-92. doi: 10.1016/j.jns.2012.08.016. Epub 2012 Sep 11. PMID: 22980027.
- (40) Eura N, Sugie K, Suzuki N, Kiriya T, Izumi T, Shimakura N, Kato M, Aoki M. A juvenile sporadic amyotrophic lateral sclerosis case with P525L mutation in the FUS gene: A rare co-occurrence of autism spectrum disorder and tremor. *J Neurol Sci*. 2019 Mar 15;398:67-68. doi: 10.1016/j.jns.2019.01.032. Epub 2019 Jan 18. PMID: 30684766.
- (41) Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, Pagani W, Lodin D, Orozco G, China A. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surgical Neurology International* 2015;6:171.
- (42) Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *New Engl J Med* 1994; 330:585-91
- (43) [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. *The Lancet* 1996; 347:1425-31.
- (44) 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;16:505-512.
- (45) Lunetta et al, *J Neurology*, 2020, paper submitted
- (46) Gros-Louis F, Soucy G, Larivière R, Julien JP. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *Journal of Neurochemistry* 2010;113:1188–1199
- (47) Cappella et al., *Gene Therapy for ALS-A perspective*. 2019
- (48) Miller TM, Pestronk A, David W, Rothstein J, Simpson E, Appel SH, Andres PL, Mahoney K, Allred P, Alexander K, et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet. Neurology* 2013;12:435-442.
- (49) Wheeler TM, Leger AJ, Pandey SK, MacLeod AR, Nakamori M, Cheng SH, Wentworth BM, Bennett CF, Thornton CA. Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* 2012;488:111-115.
- (50) FDA. Expanded Access. Information for Physicians. May 19, 2020. Accessible at: <https://www.fda.gov/news-events/expanded-access/expandedaccess-information-physician>
- (51) Jarow JP, Lurie P, Ikenberry SC, Lemery S. Overview of FDA's Expanded Access Program for Investigational Drugs. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science* 2017; 51:177-179
- (52) Kim J, Hu C, El Achkar C M, et al. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *N Engl J Med* 2019; 381:1644-1652
- (53) Arnold C. Tailored treatment for ALS poised to move ahead. *Nature Medicine*, 2019. News May 30,2019; pg 1-4
- (54) Arnold C. Antisense therapies pose a regulatory conundrum. *Nature Medicine*, 2019. News June 07,2019; pg 1-4
- (55) Arnold C. Custom therapies pose huge financial burdens. *Nature Medicine*, 2019. News October 29,2019; pg 1-4