

Mutazioak progranulina genean: eragiten duten klinika, patologia eta RNA mailako adierazpena

(Progranulin gene mutations: manifestations of clinical, pathological and RNA level)

López de Munain Arregui, Adolfo; Ruiz Martínez, Javier;
Martí Massó, José F.
Donostia Ospitalea. Neurologia Zerbitzua. Begiristain Doktoarearen
Pasealekua, z/g. 20014 Donostia

Alzualde Zuloaga, Ainhoa; Gorostidi Pagola, Ana;
Otaegui Bichot, David
Donostia Ospitalea. Unitate Experimental. Begiristain Doktoarearen
Pasealekua, z/g. 20014 Donostia

BIBLID [1989-2012 (2008), 9; 67-85]

Jaso: 08.04.04
Onartu: 08.10.28

Garuneko lobulu fronto-temporalaren degenerazioa (FTLD) demenzien barruan sailkatzen den gaixotasun talde konplexu bat da. Lan honetan FTLD duten gaixo serie baten analisi kliniko, molekular eta patologiakoak aurkezten ditugu. 72 gaixoen artean 4 mutazio desberdin aurkitu ditugu eta 14 mutaziodun gaixo. Gainera, odoleko zeluletan aurkitzen den PGRN genearen adierazpen maila neur-tu dugu eta gaixotasunaren markatzaile biologiko bezela erabil litekela erakusten dugu.

Giltza-Hitzak: FTLD. PGRN genea. Mutazioak. Adierazpen-maila. Markatzaile biologikoa.

La degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD) es un complejo grupo de enfermedades que se clasifican dentro de las demencias. En este trabajo presentamos los análisis clínicos, moleculares y patológicos de una serie de enfermos que padecen FTLD. Entre los 72 enfermos hemos encontrado 4 mutaciones diferentes y 14 enfermos portadores de mutación. Además, hemos medido el nivel de expresión del gen PGRN que se encuentra en las células de la sangre y demostramos que se puede utilizar como marcador biológico de la enfermedad.

Palabras Clave: FTLD. Gen PGRN. Mutaciones. Nivel de expresión. Marcador biológico.

La dégénération du lobe fronto-temporel (FTLD) fait partie d'un complexe groupe de maladies qualifiées de démences. Ce travail présente les résultats des prélèvements cliniques, moléculaires et pathologiques effectués chez toute une série de malades atteints de FTLD. Parmi les 72 malades analysés, nous avons trouvé 4 mutations différentes et 14 malades porteurs de mutation. Nous avons, par ailleurs, mesuré le niveau de expression du gène PGRN qui se trouve dans les cellules du sang, pour démontrer qu'il peut être utilisé comme marqueur biologique de la maladie.

Mots Clé : FTLD. Gène PGRN. Mutations. Niveau de expression. Marqueur biologique.

SARRERA

Garuneko lobulu fronto-temporalaren degenerazioa (FTLD) dementzien barruan sailkatzen den gaixotasun talde konplexu bat da. Bere nosologia oso eztabaidatua dago, gaixotasun hau deskribatzeko hogeitaz ezaugarri nosologiko baino gehiago erabiliak izan bait dira, ezaugarri kliniko, patologiko eta genetikoak tarteko (Kertesz, 2003). FTLD gaixotasun multzoak azpimota kliniko desberdinak ditu, nagusienak ondorengoak direlarik: dementzia fronto-temporala (FTD), zeinetan nortasun eta portaera aldaketak diren nagusi; dementzia semantikoa (SD) eta etengabeko afasia primarioa (PPA) lengoaiaren nahasmen goiztiar nabarmenarekin. Hauxe gain, FTLD moduan sailkatu daude ibilkera eta nahasmen motoreak dituzten bi entitate patologiko: degenerazio kortikobasala (CBD) eta etengabeko paralisi supranuklearra (PSP). FTLD mota kliniko bakoitzak patologiaren distribuzio topografiko desberdinak islatzen ditu ziurrenik (Neary *et al.*, 2005). Hala ere, oso arrunta da klinikaren eta patologiaren arteko gainezartzea, eta ondorioz, ohikoa da diagnosi klinikoaren hutsegitea (Kertesz eta Muñoz, 2004; Josephs *et al.*, 2006).

FTLD gaixotasun multzoak patologia dibertsitate handia erakusten du. Badaude kasuak, zeinak neuronetan eta glia zeluletan hiperfosforilatutako tau proteina zitoplasmakoaren metatze arraroen bitartez karakterizatzen diren; beste kasu batzuk aldiz, ez dute tau inklusiorik erakusten. Azken hauek talde heterogeneo bat osatzen dute: kasu batzuetan, neuronetako inklusioak ubikitinarekiko immunoerreaktiboak dira baina negatiboak tau eta sinukleinarekiko (FTLD-U); beste batzuk aldiz gaixotasun motoneuronalak aurkezten dituzte; eta badaude beste gaixotasun arraro batzuk zeinak ez duten histopatologia berezirik edo neuronetako inklusiorik erakusten (Mitsuyama, 1984; Jackson *et al.*, 1996; Woulfe *et al.*, 2001; Knopman *et al.*, 1990; Mackenzie *et al.*, 2006; Josephs *et al.*, 2003). Patologia hauetako batzuk atzean arrazoi genetikoak dituztela ikusi da. Tauopatiaren proportzio txiki batean MAPT geneko mutazioak identifikatu dituzte (Hutton *et al.*, 1998), FTLD-U taldean aldiz, beste gene batzuk identifikatu dira gaixotasunaren erantzule gisa, haien artean, CHMP2B (Skibinski *et al.*, 2005), VCP (Watts *et al.*, 2004) eta orain dela gutxi progranulina genea (PGRN) (Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006; Gass *et al.*, 2006; Masellis *et al.*, 2006; Pickering-Brown *et al.*, 2006; Spina *et al.*, 2007; Mesulam *et al.*, 2007; Benussi *et al.*, 2006).

Progranulina genea 17. kromosomaren beso luzean kokatzen da, 17q21.32 lokazioan, hain zuzen ere. Gene hau, besteak bezala, patroi gisa erabiltzen da RNA mezularia osatzeko, eta PGRNren RNA mezularia PGRN proteina osatzeko. Progranulina proteina funtzionala da baina baita PGRN oinarri bezala hartuz sortzen diren granulinak (GRN) ere. Granulinak PGRN proteina luzea proteasa batez moztu denean eratzen dira. PGRN proteinak 88 kDa-eko pisua du, oso konterbakorrak diren 12-zisteina motibo 7,5 aldiz ditu eta propeptelina edo PC zeluletatik eratorritako hazkuntz faktore bezala ere ezagutzen da. Moztu ondoren osatzen diren granulinek 6 kDa-eko pisua dute eta A granulina, B granulina, C granulina..., deritzaie. Bai proteina aitzindariak (PGRN) eta bai eratorriak (GRN) zelulen hazkundera erregulatzen dute. Hala ere, proteina familia honetako kideek aurkako funtzioak eduki ditzakete, batzuk inhibitzaile bezala joka deza-

kete beste batzuk zelulen hazkunderaren suspertzaileak izan daitezkeelarik. Proteina familia hau garrantzitsua da garapenean, zaurien konponketan eta tumorigenesian.

FTLD gaixotasun multzoaren diagnosi klinikoaren eta ezaugarri patologikoen aniztasunak, etiologia genetikoaren konplexutasunarekin batera, akatsaren koka-penean eta izakeran desberdintzen den eta gaixotasunaren garapenean parte hartzen duen mekanismo amankomun bat badagoela pentsa arazten digu. Dena dela, gaixotasunaren diagnosirako baliagarri den markatzaile biologiko baten ezak, konplexutasun maila bat gehitzen dio FTLD-en azterketari. Markatzaile hau aurkitzeak, diagnostia, ikerkuntza eta esku-hartze terapeutikoaren hobetzea suposatuko luke.

Lan honetan, FTLD multzoan sartzen diren gaixotasun familiar eta esporadikoak dituzten gaixo serie baten analisi kliniko, molekular eta patologikoak aurkezten ditugu, eta odoleko zeluletan aurkitzen den PGRN genearen adierazpen maila gaixotasunaren markatzaile biologiko bezela erabil litekela erakusten dugu.

1. MATERIAL ETA METODOAK

1.1. Gaixoak

Lan honetan 72 gaixo aztertu ditugu: Gipuzkoako ospitaletatik datozen 57 gaixok osatzen duten serie kliniko bat, zeinen laginak 1995 eta 2006 urteen artean jasoak izan ziren; eta 15 lagin neuropatologikok osatzen duten atzera begirako serie bat. Azken lagin hauek 1998 eta 2006 urteen artean jaso ziren eta Bartzelonako Unibertsitatea – Clinic Ospitaleko Neuropatologia Institutuko Garun Bankuak helarazi dizkigu.

Lan honetan kontutan hartu ditugun gaixo guzien diagnostikoak argitaratuak dauden adostutako irizpideak aplikatuz burutu ditugu (McKhann *et al.*, 2001; Litvan *et al.*, 2003; McKeith *et al.*, 2005; Snowden *et al.*, 1989; Kertesz *et al.*, 2005). Diagnosi klinikoak esperientziadun 5 neurologoen artean baliozkotu dira ondokoak kontutan hartuz: ezaugarri klinikoak, MRI, SPECT eta test osagarriak.

Gaixotasuna familiarra dela kontsideratu dugu 1) beste familiartekoren bat FTLD gaixotasun multzoen barruan diagnostikatua izan bada 2) hildako familiararteko baten informazio klinikoak edo material patologikoak FTLD diagnostia konfirmatzen badu, edo 3) aurretik gaixotasun hau izan zuten familiartekoen informazio kliniko nahikoa baldin badago FTLDn barruko diagnostia kliniko determinatzeko.

Gaixoen diagnosi kliniko primario edo sekundario gisa kontsideratu dugu ezaugarri klinikoaren agerpenaren ordenaren arabera, Kertesz *et al.* (2005)-en lanak esplikatzen duen bezela. Gaixo edo senitarteko bakoitzak galdeketa txiki bat osatu du sexua, jatorri etnikoa, gaur eguneko adina edo hildako unean zue-na eta gaixotasuna agertu zitzaioneko adina emanaz. Informazio hau datu mole-

kular, neuropatologiko eta erradiologikoekin batera kontsideratu dugu. Ahal izan den heinean, esperientziadun neuropsikologo batek ebaluaketa neuropsikologikoa osatu du.

Ehun eta hogeitamar pertsona osasuntsuen (74 gizonezko eta 56 emakumezkoen) odol laginak jaso ditugu Donostia Ospitaleko Komite Etikoaren baime-na eta odola atera zaion pertsona bakoitzaren adostasun informatuarekin bate-ra. Kontrol gisa erabilitako pertsona hauen ebaluaketa neuropsikologikoak galera kognitiborik ez dutela erakusten du. Kontrol hauek, gaixoetan aurkitutako muta-zioen izaera patogenikoa determinatzeko erabili ditugu, hau da, gaixoen DNAn aurkitutako aldaketak populazio osasuntsuan agertzen diren ikusteko. Haez gain, 9 pertsona osasuntsuen garun laginak (8 gizonezko eta emakumezko bat, $63,8 \pm 11,9$ urtetakoak) lortu ditugu Bartzelonako Unibertsitatea – Clinic Ospitaleko Neuropatologia Institutuko Garun Bankuari esker. Garun lagin haueta-tik RNA erauzia izan da garuneko PGRNren adierazpen maila analisisetan errefe-rentzi gisa erabiltzeko.

1.2. Análisi molekularrak

Análisi genetikoak aurrera eramateko, leuzozitoetatik DNA, prozesu estanda-rak erabiliaz eta RNA totala, “VersaGene RNA Purification System” (Gentra) era-biliaz erauzi ditugu. Nekropsietako garun izoztuetatik ere DNA, QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) erabiliz eta RNA, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) erabiliz erau-zi ditugu, fabrikatzailearen argibideak jarraituz.

MAPT genearen analisisa: MAPT geneko exoi aipagarriak (1. exoia eta 9-13 exoiak) eta inguruko sekuentzia intronikoak sekuentziario bidez analizatu ditugu Baker *et al.* (1999) artikuluan argitaratutako protokoloa jarraituz.

PGRN genearen sekuentziarioa: Progranulina genearen 12 exoi kodifika-tzaileak PCR metodoaren bidez amplifikatu dira aurretik publikatutako hasleak (Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006) eta guk diseinatutako beste hasle batzuk erabiliz: 2. eta 3. exoiak fragmentu bakarrean amplifikatzeko Ex2&3F (5'- AAAG-GGTCATCTTGGATTGG-3') eta Ex2&3R (5'- CTCCTGGGTTCCAGACTC-3') hasleak diseinatu ditugu, eta 12. exoia eta 3'UTRa amplifikatzeko Ex12&3'F (5'- GTCC-CACCTCGTCCAACC-3') eta Ex12&3'R (5'- TGTCTTTCTGTGGGGTAGGG-3') hasleak. PCR produktuak bi norantzetan sekuentziatu ditugu ABI 3130 sistema eta Big Dye v.3.1 erabiliz fabrikatzailearen argibideak jarraituz (Applied Biosystems).

PGRNren RNAREN eta adierazpen edo espresio mailaren analisisa: IVS6-1 G>A mutaziodun laginetan RT-PCRa burutu dugu 6. exoietik 11. exoiera (c6F: 5'- TGGTTCTACCTGCTGTGAGC-3', c11R: 5'- CTTACGTTGCAGGTGTAGC-3'), mutazio horrek 6. introi eta 7. exoiaren arteko moztitsasketan aldaketak eragi-ten dituelako. PCR produktu hauek ere sekuentziatu egin ditugu moztitsasketa berriak detektatzeko. Moztitsasketa berri hauek detektatzen ez balira, alelo mutatuaren “zentsugabeko bitartekariaren bidezko galera” edo NMD (nonsense-mediated decay) gertatu denaren seinale izango litzake. Honez gain, PCR kuan-tifikatzailearen bidez (qRT-PCR: 7300 real time system, Applied Biosystems) pro-

granulina RNAREN adierazpen erlatiboa neurtuak izan ditugu SYBR green erabiliz, bai odolean baita garunean ere. Honetarako diseinatu ditugun hasleak 9. exoitik (c9F: 5'- AATCCCAGAGGCTGTCTGC-3') 10. exoiera (c10R: 5'-GTCTCTGGGGT-GGGATAAGG-3') anplifikatzen dute. Lagin bakoitzean programulinaren geneaz gain GAPDH gene endogenoaren adierazpen maila ere neurtu dugu barne kontrol modura, eta gainera gene bakoitzaren maila hiru aldiz neurtu dugu balio fidagarri bat lortzeko. RNAREN adierazpen erlatiboa kalkulatzeko Δ CT metodoa (Livak eta Schmittgen, 2001) erabili dugu, balioa erlatibizatzeke neurologikoki osasuntsuak diren eta 60 urte baino gehiago dituzten kontrolen PGRN eta GAPDH adierazpen mailak erabiliz.

1.3. Análisi neuropatologikoak

Hogei gaixoei egin ahal izan zaie post-mortem azterketa neuropatologikoa. Azterketa honen detaileak bi gaixoen kasuan soilik aurkeztuko ditugu, programulina genean mutazioak aukezten dituzten gaixoenak hain zuzen ere: 03-013 gaixoarenean, garunaren pisua 900 gramotakoa zen eta 1.000 gramotakoa 06-420 gaixoarenean. Análisi neuropatologikoa lehenengoaren kasuan hil eta 14 ordutara burutu dugu eta bigarrenarena 30 ordutara. Bi garunek antzeko lesioak erakusten dituzte. Atrofia kortikala lobulu frontal eta tenporaletan nabaria da, batez ere alboko eta erdialdeko gainazalean, baita kortex zingulatuan ere. Hipokanpoak arinki atrofikoak agertzen dira eta sustantzia grisaren depigmentazioa ikusgarria da. 03-013 gaixoarenean, garunaren erdia zentimetro bateko ebaketa koronaletan moztu ondoren izotz lehorrean izoztu eta -80°C-tan gorde dugu azterketa egin arte. Ikuskapen morfologikoa aurrera eramateko, garunak %4ko formalin indargetzailean finkatuak ditugu 3 astez, 4°C-tara. Azterketa neuropatologikoa garuneko estruktura desberdinetako 4 μ m-ko parafinado ebaketetan burutu ditugu. Ebaketa hauek hematoxilina eta eosinarekin tindatu ditugu, baita Kluver barrera eta antigorputz espezifikoa desberdinekin ere, EnVision + peroxidasa prozedura sistema (Dako) erabiliz. Peroxidasa erreakzioa diaminobenzidina eta ur oxigenatuari esker ikusarazi dugu.

2. EMAITZAK

2.1. Gaixoak

Senitarteko erlaziorik ez duten 72 gaixo aztertu ditugu eta post-mortem azterketa neuropatologikoa 20etan burutu ahal izan dugu. 72 gaixoetatik 57k FTLD taldean sartzen diren gaixotasun bat pairatzen dute (29k CBD primario edo sekundarioa, 6k PPA, batek demenzia semantikoa, 15k demenzia frontotemporal, batek alboko esklerosi amiotrofikoa-demenzia (ALS-demenzia), beste batek ALS-demenzia-parkinsonismoa eta 4k ALS). Beste 3 gaixok Pick deritzon gaixotasuna dute eta 12k PSP. Gainera, 72 gaixoetatik 25 kasu familiarak dira, hau da, senitartekoren batek ezaugarri berdineko gaixotasuna aurkeztu du (9 CBD, 3 PPA, 10 FTD eta 3 ALS), beste 47 kasuak esporadikoak izanik (1. taula). 25 kasu familiarretatik 19k jatorri euskalduak dute.

1. Taula. CBD, PPA, SD, FTD, ALS eta PSP diagnostikoa duten gaixoen ezaugarri kliniko eta molekularrak

Kausa	Familiar-tasuna	Sexua	Aurkezpen klinikoa	Bigarren diagnosia	Beste familiariko diagnostikoak (zenbat)	Gaur eguneko adina (urte)	Sintomen agerpeneko adina (urte)	Hildako adina (urte)	Neuropatologia	Tau Mutazioak	PGRN Mutazioak
03-013	Bai	G	CBD	FTD	FTD (1)	-	53	57	Ubiquitin +	-	IV6-1 G>A
05-396	Bai	E	CBD	FTD	FTD (1), CBD (1)	66	64	-	eg	-	IV6-1 G>A
03-246	Bai	E	CBD	FTD	FTD (1)	71	65	-	Eg	-	IV6-1 G>A
04-251	Bai	G	CBD	FTD	FTD (1)	-	60	64	eg	-	IV6-1 G>A
06-140	Ez	E	CBD	-	-	72	72	-	eg	-	-
06-221	Ez	G	CBD	-	-	57	55	-	eg	-	-
06-222	Ez	E	CBD	-	-	73	69	-	eg	-	-
06-225	Ez	G	CBD	-	-	68	63	-	eg	-	-
06-226	Bai	G	FTD	CBD	FTD (1)	73	71	-	eg	-	-
06-235	Ez	E	CBD	-	-	90	84	-	eg	-	-
06-236	Ez	G	CBD	-	-	82	79	-	eg	-	-
06-269	Ez	E	CBD	-	-	73	57	-	eg	-	-
06-248	Ez	E	CBD/PSP	-	-	76	71	-	eg	-	-
06-280	Bai	E	CBD/PSP	-	FTD (1)	80	74	-	eg	-	-
02-071	Bai	E	FTD/DCL	CBD	PPA (1), FTD (1)	-	56	67	eg	-	IV6-1 G>A
06-348	Ez	G	CBD	-	-	81	78	-	eg	-	-
06-296	Ez	G	CBD	-	-	75	73	-	eg	-	-
05-171	Ez	E	FTD	CBDS	-	64	58	-	eg	-	-
03-022	Bai	E	FTD	CBDS	-	70	65	-	eg	-	IV6-1 G>A
04-492	Bai	G	FTD	CBDS	ALS (1), FTD (1)	58	52	-	eg	-	IV6-1 G>A
06-255	Ez	E	PPA	CBDS	-	75	68	-	eg	-	-

Kausa	Familiar- -tasuna	Sexua	Aurkezpen klinikoa	Bigarren diagnosia	Beste familiariko diagnostikoak (zenbat)	Gaur eguneko adina (urte)	Sintomen agerpe- neko adina (urte)	Hildako adina (urte)	Neuropa- tologia	Tau Mutazioak	PGRN Mutazioak
06-300	Ez	E	FTD	CBDS	-	65	61	-	eg	-	-
04-550	Bai	E	PPA	FTD	FTD (1)	70	66	-	eg	-	IV6-1 G>A
06-253	Bai	E	PPA	FTD	FTD (1)	66	64	-	eg	-	IV6-1 G>A
06-303	Ez	G	PPA			73	72	-	eg	-	-
06-252	Ez	E	PPA			66	63	-	eg	-	-
06-288	Ez	E	PPA			82	75	-	eg	-	-
06-240	Bai	E	PPA	FTD	FTD (1)/AD (2)	79	76	-	eg	-	-
06-249	Ez	G	SD			75	74	-	eg	-	-
06-420	Bai	G	FTD	-	FTD (1)/DS (1)	-	44	51	Ubiquitin +	-	P357HfsX3
06-287	Bai	G	FTD	-	FTD (1)	72	70	-	eg	-	-
06-263	Ez	E	FTD	-	-	60	60	-	eg	-	-
06-251	Ez	E	FTD	-	-	70	67	-	eg	-	-
95-027	Ez	G	FTD	-	-	-	70	78	eg	-	R177H
06-405	Bai	E	FTD	-	FTD (1)	58	55	-	eg	-	IV6-1 G>A
06-346	Bai	E	FTD	-	FTD (1)	77	71	-	eg	-	-
06-267	Bai	E	FTD	-	FTD (1)	66	63	-	eg	-	-
98-279	Ez	G	FTD	-	-	-	71	-	eg	-	-
00-440	Ez	G	FTD	-	-	-	47	53	DLDH	-	-
06-297	Bai	E	FTD	-	-	65	64	-	eg	-	-
03-051	Bai	G	ALS	-	ALS (2)/PD (1)/ FTD (1)	-	55	57	Ubiquitin +	-	-
00-330	Bai	E	ALS-FTD	-	FTD (1)	-	63	65	eg	-	V5L
98-083	Bai	G	ALS	-	ALS (3)	-	31	32	eg	-	-

Kausa	Familiar-tasuna	Sexua	Aurkezpen klinikoa	Bigarren diagnosis	Beste familiariko diagnostikoak (zenbat)	Gaur eguneko adina (urte)	Sintomen agerpeneko adina (urte)	Hildako adina (urte)	Neuropatologia	Tau Mutazioak	PGRN Mutazioak
06-286	Ez	G	ALS	-	-	29	28	-	eg	-	-
05-470	Ez	G	ALS	-	-	61	59	-	eg	-	-
06-144	Ez	G	ALS	-	-	74	69	-	eg	-	-
02-334	Ez	E	PSP	-	-	-	73	81	PSP	-	-
06-145	Ez	G	PSP	-	-	-	70	73	eg	-	-
06-247	Ez	E	PSP	-	-	62	62	-	eg	-	-
06-150	Ez	G	PSP	-	-	71	69	-	eg	-	-
06-281	Ez	E	PSP	-	-	75	71	-	eg	-	-
06-282	Ez	G	PSP	-	-	69	64	-	eg	-	-
06-292	Ez	E	PSP	-	-	72	64	-	eg	-	-
06-293	Ez	E	PSP	-	-	80	77	-	eg	-	-
06-304	Ez	E	PSP	-	-	88	88	-	eg	-	-
06-229	Ez	E	PSP	-	-	76	72	-	eg	-	-
1	Ez	E	PSP	-	-	-	-	77	Mixed PSP/CBD	-	-
2	Ez	E	AD	-	-	-	-	76	CBD	-	-
3	Ez	G	PiD	-	-	-	-	68	CBD	-	-
4	Ez	E	CBD	-	-	-	-	72	CBD	-	-
5	Ez	G	MSA	-	-	-	-	82	CBD + AGD	-	-
6	Ez	E	CBD	-	-	-	-	75	CBD	-	-
7	Ez	G	FTD	-	-	-	-	67	CBD	-	-
8	Ez	G	PSP	-	-	-	-	65	PSP	-	-
9	Ez	E	PSP	-	-	-	-	71	PSP	-	-

Kausa	Familiar-tasuna	Sexua	Aurkezpen klinikoa	Bigarren diagnosis	Beste familiako diagnostikoak (zenbat)	Gaur eguneko adina (urte)	Sintomen agerpeneko adina (urte)	Hildako adina (urte)	Neuropatologia	Tau Mutazioak	PGRN Mutazioak
10	Bai	G	FTD	FTD	FTD	-	-	52	FTD-Tau +	P301L	-
11	Bai	G	FTD	FTD	FTD	-	-	58	FTD-Tau +	P301L	-
12	Bai	G	FTD	FTD	FTD	-	-	58	FTD-Tau +	P301L	-
13	Ez	G	PiD	-	-	-	-	74	PiD	-	-
14	Ez	G	FTD+AD	-	-	-	-	56	PiD	-	-
15	Ez	G	PiD	-	-	-	-	68	PiD	-	-

FTD: Dementia frontotemporal

CBD: Degenerazio kortikobasala

PPA: Etengabeko afasia primarioa

ALS: Alboko esklerosi amiotrofikoa

AD: Alzheimer gaixotasuna

PD: Parkinson gaixotasuna

PSP: Etengabeko paralisi supranuklearra

PiD: Pick gaixotasuna

DS: Down Sindromea

eg: egin gabea

2.2. Analisi molekularrak

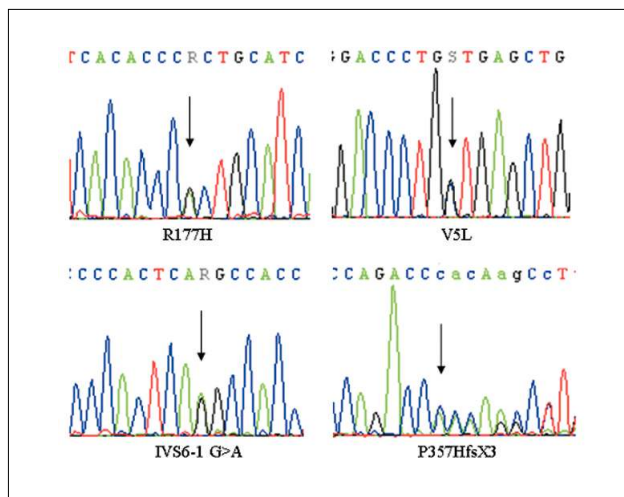
2.2.1. MAPT genearen analisia

MAPT genean aurkitu den mutazio bakarra 10. exoiko P301L izan da eta FTD pairatzen duten 3 kasu familiarretan aurkitu da. Hiru kasu hauek, atzera begirako serieko lagin neuropatologikoak dira eta hiruek tau inklusioak aurkezten zituzten.

2.2.2. PGRN genearen sekuentziazioa

PGRN genean lau mutazio desberdin aurkitu ditugu gure gaixo seriean (1. Irudia). Bi mutazioek motzagoa den proteina bat sortzen dute, batek, RNA mezulariaren moztitsasketa eraldatzen duelako (IVS6-1 G>A mutazioaren kasuan), eta mezulariaren irakurketa araua aldatu eta bukaera kodoi goiztiar bat sortzen duelako besteak (c.1068-1070delC; p.P357HfsX3 mutazioaren kasuan). IVS6-1 G>A mutazioa 11 gaixoetan aurkitu dugu, guziak euskaldun jatorrikoak (7 CBD primario edo sekundarioa dute, 2k PPA eta beste bi gaixok FTD dute). Mutazio hau, hiru familia desberdinetako 4 senitarteko gaixoetan ere aurkitu dugu. P357HfsX3 mutazioa FTD familiarra duen gaixo batean aurkitu dugu. Aurkitutako beste bi mutazioak hauek dira: R177H (c530 C>A), FTD esporadikoa duen gaixo batean deskribatua; eta V5L (c13G>A), ALS-dementia familiarra aurkezten duen gaixo batean deskribatua. Lau mutazioa hauetatik bat ere ez da 130 neurologikoki osasuntsuak diren kontroletan aurkitu.

1. Irudia. Lan honetan aurkitu diren PGRNren mutazio berrien elektroferogramak



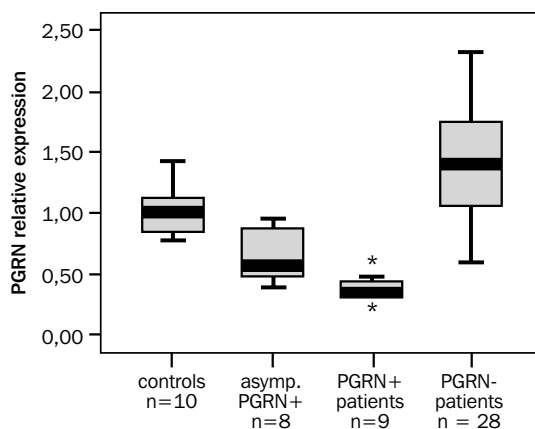
Mutazioen bat aurkezten duten gaixoen 24 senitarteko osasuntsu aztertu ditugu eta arriskuan dauden 14 mutazio eramaile osasuntsu aurkitu ditugu. Hauetatik 12 eramaile osasuntsuk IVS6-1 G>A mutazioa daramate eta bik R177H mutazioa.

2.2.3. PGRNren RNAREN eta adierazpen mailaren analisia

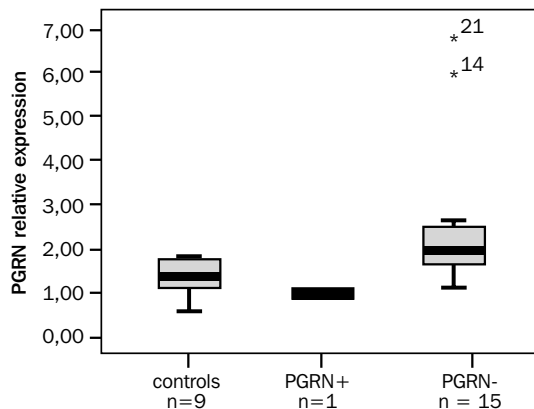
RNA 37 gaixoen odoletik eskuratu dugu, hauetatik 9 IVS6-1 G>A mutaziodunak direlarik (denak emakumezkoak, batazbesteko adina $68,4 \pm 3,3$ urtekoa delarik), eta beste 28ak mutaziorik gabekoak (18 emakumezko eta 10 gizonezko, batazbesteko adina $71,5 \pm 11,1$ urtekoa dekarik). Hauetaz gain, 8 mutaziodun senitarteko osasuntsuren odola ere aztertu dugu (4 emakumezko eta 4 gizonezko, hauen batazbesteko adina $49,25 \pm 12,8$ urtekoa izanik) eta 10 kontrol osasuntsurena ere (6 emakumezko eta 4 gizonezko, batazbesteko adina $62,2 \pm 13,1$ urtekoa izanik).

IVS6-1 G>A mutazioa duten gaixoen cDNA (RNA oinarrituz eraturako DNA) sekuentziatu dugunean ez dugu mutaziodun alelorik topatu. Honek NMD (zentsugabe bitarteko deskonposizio) prozesua iradokitzen du argitaratuak dauden PGRNren adierazpen analisiekin bat etorri (Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006). Kontrolen PGRNren adierazpen erlatiboa, mutaziodun gaixoena (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U, $p < 0,003$) eta mutaziodun senitarteko osasuntsuena ($p < 0,003$) baino esangarriki altuagoa da. Mutaziodun gaixo eta senitarteko osasuntsuen arteko PGRNren adierazpen desberdintasunak ere estatistikoki esangarriak dira ($p < 0,008$), gaixoen PGRN adierazpen txikiagoa dutelarik. Gainera, PGRNren RNA kopia gehiago aurkitu dira mutaziorik gabeko gaixoetan kontrolen baino ($p < 0,003$) (2. Irudia). Garuneko PGRN adierazpena neurtzean, mutaziorik erakusten ez duten gaixoetan ere PGRN RNA gehiago detektatzen ditugu kontrolen baino ($p < 0,012$) (3. Irudia).

2. Irudia. Odoleko PGRNren RNAREN adierazpen erlatiboa kontrolen, mutaziodun senitarteko osasuntsuetan (asyp. PGRN+), mutaziodun gaixoetan (PGRN+ patients) eta PGRNn mutaziorik ez duten gaixoetan (PGRN- patients)



3. Irudia. Garuneko PGRNren RNAREN adierazpen erlatiboa kontroletan, mutaziodun gaixoetan (PGRN+) eta PGRNn mutaziorik ez duten gaixoetan (PGRN-)



2.3. Azterketa neuropsikologikoa

Azterketa neuropsikologikoa 7 mutazio eramaile (PGRN+) gaixoetan eta 14 mutazio gabeko (PGRN-) gaixoetan burutu dugu. IVS6-1 G>A mutazioa CBD klinika aurkezten duten gaixoei nahasmen kognitibo goiztiarrago eta hedatuagoa erakusten dute. Gainera, mutazioadun gaixo hauek lehenago hasten dira gaixotasuna garatzen ($59,3 \pm 5.6$ urterekin) CBD klinika aurkezten duten baina mutaziorik aurkezten ez duten gaixoei konparatuz gero ($68,9 \pm 8,6$ urte) (Studentent test $p < 0,014$) (1. Taula).

2.4. PGRN genean mutazioak aurkeztutako azterketa neuropatologikoa

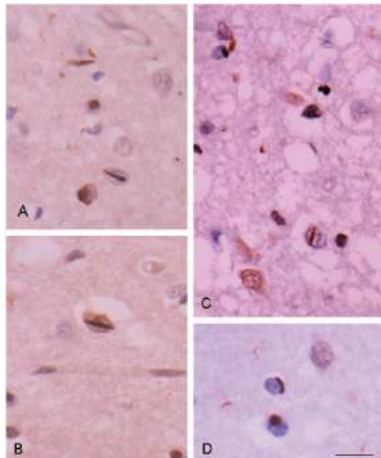
FTD klinika eta PGRNn mutazioak dituzten bi kasuak antzeko aldaketa mikroskopikoak aurkezten dituzte, hau da, neurona galera ikusgarria eta astrozitoen gliosia kortex frontal, tenporal, intsular eta zingulatuan. Hau dena, esponjosia-rekin batera agertzen da II geruzan. Bai kaudatu eta bai putamenean ere, neurona galera eta gliosi ahul bat ere nabariak dira; sustantzia grisean, neurona pigmentatuen galera, zelula kanpoko neuromelanina eta gliosia ikusten diren bitartean. Ez da ez tau, ez α sinukleinarekiko immunoerreaktiboa den inklusiorik aurkitu, ez neuronetan ez eta glia zeluletan ere. β amiloide metaketarik ere ez da topatu. Hala ere, garuneko kortexean ubikitinarekiko immunoerreaktiboak diren heldugabeko neurona aberrante ugari aurkitu dira (4. eta 5. irudiak). Ubikitinarekiko immunoerreaktiboak diren zitoplasma barruko inklusio neuronalak isokortexean eta kortex zingulatuan ikusi dira, baita zirkunboluzio dentatuko neurona granularretan ere. Azkenik, katu-begi formako edo borobilak diren nukleo barruko inklusio neuronal gutxi batzuk ere ikusi dira. Inklusio guzi hauek TDP-43 proteinen aurkako antigorputzak errekonozitzen ditu. Interesgarria da zelula ukuituen

TDP-43arekiko immunoerreaktibitatea nukleo barruko inklusioetara mugatua egotea, normalean nukleo osoan zehar detektatzen baita.

4. Irudia. PGRN genean mutazioak dituzten FTD gaixoen heldugabeko neurona aberranteak, inklusio intrazitoplasmiko eta intranuklearrak, ubikitinaren aurkako antigorputzekin tindatuak.

(A, B) eta anti-TDP-43 antigorputzekin (C, D).

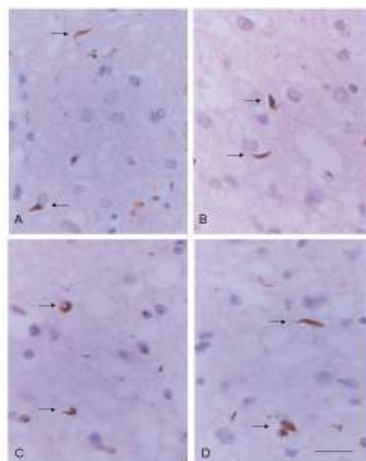
Hematoxilinarekin tindatutako parafina ebaketak. Bar = 25 mikroi



06/51; A, B: ubi; C,D: TDP43 x400, bar = 25 microns

5. Irudia. PGRN genean mutazioak dituzten FTD gaixoen neurona heldugabe aberranteak eta inklusio intrazitoplasmikoak (geziak) ubikitinaren aurkako antigorputzekin tindatuak.

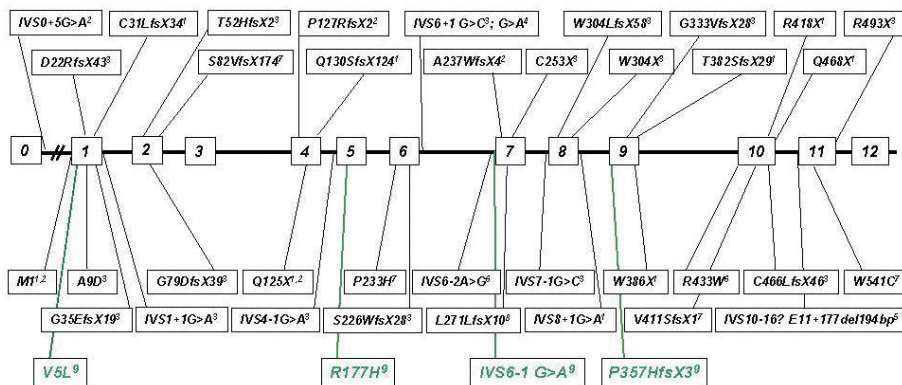
Hematoxilinarekin tindatutako parafina ebaketak. Bar = 25 mikroi



3. EZTABAIDA

Ikerkuntz lan honetan aztertu ditugun indibiduen artean PGRN genean mutazioak dituzten 13 kasu aurkitu ditugu, orain arte deskribatugabeko lau mutazio berri aurkituz; MAPT genean mutazio berdina duten hiru kasu soilik aurkitu ditugun bitartean. Gainera, analizatu diren 24 kasu familiarretatik 12 kasutan aurkitu dira PGRN genean mutazioak, MAPT-en mutazioak dituzten hiru familia aurkitu diren bitartean. Honek, FTD gaixoetan MAPT genearen parte-hartzea erlatiboki arraroa dela berresten du, genea deskribatu zenetik gaur arte 50 mutazio baino gutxiago izan direlarik argitaratuak (www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations). PGRN geneko mutazioak berriz oso sarri aurkitu dira azken hilabeteetan, gaixotasun honekin erlazionatutako 40 mutazio baino gehiago argitaratu direlarik (14, 21, lan hau) (6. Irudia). Hala ere, lan honetan aurkitutako PGRNko mutazio eramaileen proportioa (72 kasuetatik 14) haunditua egon daiteke euskal populazioan IVS6-1 G>A arbaso-mutazioa izan daitekelako. Beraz, mutazioen frekuentzia altu hau berresteko beste gaixo talde handiago bat ikertua izan beharko litzake.

6. Irudia. Gaur egunerarte deskribatuak dauden PGRNren mutazioak



¹ Baker et al., 2006; ² Cruts et al., 2006; ³ Gass et al., 2006; ⁴ Masellis et al., 2006;
⁵ Pickering-Brown et al., 2006; ⁶ Spina et al., 2007; ⁷ Bronner et al., 2007; ⁸ Benussi et al., 2006; ⁹ Lan hau

CBD klinikaren (bai primario eta bai sekundarioa) eta IVS6-1 G>A mutazioaren artean elkarrekin estu bat aurkitu dugu, orain dela gutxi aurkitu den PGRN geneko mota berdineko mutazioen eta CBD duten gaixoen ezaugarri klinikoen arteko erlazioa indartuz (Gass et al., 2006; Masellis et al., 2006). Gure gaixo serieran, hasieran CBD klinikari dagozkien ezaugarriak aurkeztu dituzten kasu familiar guzietan IVS6-1 G>A mutazioa erakutsi dute.

Historikoki, CBD lehenengoz nahasmen motor estrapiramidal bat bezela deskribatu zen, eta ondorioz lengoaiaren arazo eta beherakada kognitiboak azpidiagnostikatuak izan dira (Rinne et al., 1994). Hala ere, gaixo gehiagoren berrikuste

zehatzagoak gainbehera kognitiboak argitara ekarri du, eta batez ere lengoai nahasmenduak onartuak izan dira CBDren garapeneko ezaugarri berantiar moduan edo PPA-n hasierako desberdindugabeko ezaugarri kliniko moduan (McMongle *et al.*, 2006). Gure IVS6-1 G>A mutaziodun gaixoetan lengoai nahasmendua totalka hitz egite afemiko baten moduan deskribatzen da hasierako fasean eta afasia ez-elokuyente batean bilakatu ondoren mututasunean bukatzen da. Progranulina genean mutaziorik ez duten gaixoekin konparatuz, mutaziodunek gaixotasunaren hasiera goiztiarragoa, eta nahasmen kognitibo hedatuagoa eta goiztiarragoa erakusten dute. Ezaugarri hauek lengoaiaren nahasmen nabarmenago batekin lotuta agertzen dira. Laburbilduz, beste autore batzuk ondokoa onartzen ez duten arren (Josephs *et al.*, 2007), CBD klinika inguruan hiru ezaugarri hauek progranulina geneko mutazioek eragindako gaixotasuna aurreikusten lagun dezakete: familiaritasuna, gaixotasunaren hasiera goiztiarragoa eta nahasmen kognitibo eta lengoai arazo larriagoetara bilakatzen diren ezaugarri kliniko hedatuagoak. Beste lan batzutan deskribatzen duten moduan (Mesulam *et al.*, 2007), gure datuen arabera IVS6-1 G>A mutaziodunek fenotipo nagusi bat aurkezten badute ere, familia gehienetan gaixotasunaren garapenean familia barruko heterogeneitate kliniko bat existitzen da, beste autoreek erakusten duten bezela (Benussi *et al.*, 2006).

Beste aurkikuntza kliniko garrantzitsu bat IVS6-1 G>A mutazioa eta ALS gaixotasunaren arteko erlazioa izan da. Autore batzuk ubikitinarekiko positibo diren inklusioak dituzten FTD edota dementzia-neurona motoreen gaixotasuna aurkezten dituztenen antzeko ubikitin-immunoerreaktibilitate patroia proposatu zuten ALS gaixotasunarentzako (MacKenzie *et al.*, 2005). Hala ere, FTLDren neuropatologiar buruzko lan konparatibo berri batek, ubikitin-immunoerreaktibilitatearen banaketa PGRN genearen mutazioen presentziaren arabera dela erakusten du (MacKenzie *et al.*, 2006). Gure datuek neuronetako inklusio intrazitoplasmiko eta intranuklearrak lehenago pentsatzen zena baino hedatze zabalagoa eduki dezaketela erakusten dute, hain zuzen ere, behegaroko neurona motoretaranzko hedapena (MacKenzie *et al.*, 2006).

MAPT genean mutazioak dituzten hiru kasuetan tau inklusioak deskribatuak zeuden eta neuropatologikoki konfirmatuak zeuden beste tauopatiek ere PGRN genean mutaziorik ez dutela ikusi da. Gainera, PGRN-n mutazioak dituzten eta neuropatologikoki analizatuak dauden bi kasuek tau-ekiko negatiboak baina ubikitinarekiko eta TDP-43rekiko immunoerreaktiboak diren inklusioak aurkeztu dituzte. Bi topaketa hauek forma genetiko bakoitzak bere patologia espezifikoak duela iradokitzen du. Aipatzekoa da, TDP-43 inklusioak ez direla PGRN mutaziodun indibiduoetan soilik agertzen, PGRN mutazioak TDP-43 inklusiodun kasuen proportzio batean soilik deskribatu dira eta. Gainera, TDP-43rekiko immunoerreaktibilitatea FTD eta ALS klinika duten eta ubikitin-positibo eta tau-negatibo diren inklusioak dituzten kasuen parte batean besterik ez da agertzen (Neumann *et al.*, 2006; Arai *et al.*, 2006).

Lan honetako aurkikuntza garrantzitsuena, ikusi diren PGRNren adierazpen maila desberdinetan datza. IVS6-1G>A mutaziodun senitarteko osasuntsuek kontrol osasuntsuekin konparatuz, PGRNren odoleko adierazpenean %35eko beharpena erakusten dute eta IVS6-1G>A mutaziodun gaixoeke oraindik eta

beherapen haundiagoa dute, %60koa, gutxi gora behera. Honek NMD edo zentzugabeko bitartekariaren bidezko galeraz gain genearen adierazpen maila erregulatzen duen beste mekanismo bat badagoela irakokitzen du. Senitarteko osasuntsuen adina gaixoena baino txikiagoa denez, oraindik ezin dugu ziurtatu mutaziodun osasuntsu eta gaixoen arteko adierazpen mailaren desberdintasuna, gaixotasunaren status-aren edo gaixotasunaren penetrantzia desberdintasunaren islapena den. Edozein modutara, gure emaitzek PGRNrekin erlazonaturik dagoen FTLD gaixotasuna haplogutxiegitasunaren ondorioz gertatzen dela iradokitzen dute, hau da, genea bi aleloetan funtzionala izan beharrean, alelo bakarrekoa soilik denean erabilgarria. Esan dugun bezela, proteina honentzako haplogutxiegitasuna adinaren arabera areagotua agertzen da. Oraindik zehazteko dago genearen eskualde promotorean egon daiteken aldakortasun genetikoak den edo beste mekanismo batzuek dauden proteinaren adierazpena gutxiagotzen dutenak. Egoera hau beste gaixotasun baten kasuan ere ikusi da, *retinitis pigmentosa* kasuan hain zuzen ere. Gaixotasun hau RP11 genean dauden mutazioak eragin arazten dute eta haplogutxiegitasunagatik garatzen da. Gure kasuan bezela, gaixoei genearen adierazpen txikiagoa erakusten dute osasuntsu dauden mutaziodunekin konparatuz gero (Rivolta et al., 2006).

Oso interesgarria da baita ere PGRN genean mutaziorik ez duten FTLD gaixoen PGRN adierazpena, haunditua bait dago kontrolekin konparatuz. Honek PGRN, mutaziorik ez duten kasuan ere inplikatu dagoela iradokitzen du. Adierazpen haundiagotu hau FTLD gaixo guzietan agertzen den edo gaixotasunaren azpimota kliniko batzutar mugatua dagoen jakiteko adierazpen espresioa gaixo gehiagotan burutu behar da. Oraindik zehazteko dago PGRNren adierazpen haundiagotu hau genearen promotorearen eskualdean egon daiteken aldakortasun genetikoarengatik gertatzen den, edo bide metaboliko berdinean dagoen beste gene bateko mutazioak egon daitezken inplikatuak, edo beste mekanismo batzuk parte hartzen duten.

Mikroglia eta beste neurona populazio batzuk dira garunean eta nerbio sistema zentralean PGRN adierazten edo espresatzen duten zelula mota nagusiak (Baker et al., 2006; MacKenzie et al., 2006). Beste nahasmendu neurodegeneratiboetan bezela, FTLD-U gaixotasun taldean ere neuronen galera mikroglia aktibazioarekin batera agertzen da. Ahmed et al., (2007) argitaratutako lan berrian, PGRN mikroglia ugaritzearekin eta aktibazioarekin erlazonatua dagoela dio eta ondorioz, gene hau neuroinflamazioan eta garun konponketan inplikatu egon litekela iradokitzen du. FTLD-U gaixotasun taldean PGRN geneak duen parte-hartze biologikoa hobeto ulertzeko, mikroglia propietate funtzionalak estuki begiratu beharko dira eta erantzun inflamatorioa ikertu, bai PGRN genean mutazioak duten eta bai mutaziorik ez duten gaixoetan ere.

PGRNren RNA mezulariaren ohizko kuantifikazioa burutu daiteke PGRN mutazioak dituzten gaixoetan eta oraindik gaixotasuna garatu ez duten mutaziodunetan ere. Horrela gaixotasunaren progresioaren iragarle izan litezken balioak determina ditzakegu eta gaixotasunaren sintomak garatzeko RNA mezulariaren ze gutxipen maila eduki behar den ezagutu dezakegu. Oraindik osasuntsu diren mutaziodunak aurkitzeak arazo batzuk ekartzen baditu ere, ikerkuntzarako ate asko irekitzen ditu. Mutazio hauen penetrantzia erregulatzen duten faktoreak oso

pobreki ezagunak dira, ondorioz sintomak agertu aurreko diagnosis burutzeko eta ohizko aholku genetikoa garatzeko arazoak sortuz. Gainera, puntu honek dakartzan bistako arazo etikoak alde batera utzita, osasuntsuak diren mutaziodun indibiduoek talde erakargarri bat osatzen dute gaixotasunaren seinale edo sintoma goiztiarren agerpena kontrolatzeko. Ezagutza honek, diagnostikoa burutzeko ordezko tresnak erabiltzearen posibilitatea irekitzen du eta neurobabele izan daitezkeen agenteen eraginkortasuna egiazta lezake. PGRNren RNA mezulariaren odoleko adierazpena denboran zehar egonkorra den ere kontrolatu beharra daukagu eta sintoma gabeziarekin daukan erlazioan sakondu, etorkizuneko azterlan batean.

Orokorrean, mutazioaren edo arrazoi ezezagunen ondoriozko PGRNren adierazpen maila aldatuak FTLDrekin duen erlazioak, FTLD talde konplexuan PGRNK duen parte-hartzea indartzen du.

4. BIBLIOGRAFIA

- ARAI, T; HASEGAWA, M; AKIYAMA, H; IKEDA, K; NONAKA, T; MORI, H, et al. "TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis". *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 351: 602-611.
- BAKER, M; LITVAN, I; HOULDEN, H; ADAMSON, J; DICKSON, D; PEREZ-TUR, J, et al. "Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy". *Hum Mol Genet*, 1999; 8 (4): 711-5.
- BAKER, M; MACKENZIE, IR; PICKERING-BROWN, SM; GASS, J; RADEMAKERS, R; LINDHOLM, C, et al. "Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17". *Nature* 2006; 442: 916-919.
- BRONNER, IF; RIZZU, P; SEELAAR, H; VAN MIL, SE; ANAR, B; AZMANI, A, et al. "Progranulin mutations in Dutch familial frontotemporal lobar degeneration". *Eur. J. Hum. Genet*, 2007. doi:10.1038/sj.ejhg.5201772.
- CRUTS, M; GIJSELINCK, I; VAN DER ZEE, J; ENGELBORGHES, S; WILS, H; PIRICI, D, et al. "Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21". *Nature*, 2006; 442: 920-924.
- DAVIES, RR; HODGES, JR; KRIL, JJ; PATTERSON, K; HALLIDAY, GM; XUEREB, JH. "The pathological basis of semantic dementia". *Brain*, 2005; 128: 1984-1995.
- FORMAN, MS; FARMER, J; JOHNSON, JK; CLARK, CM; ARNOLD, SE; COSLETT, HB, et al. "Frontotemporal dementia: clinicopathological correlations". *Ann Neurol*, 2006; 59: 952-962.
- GASS, J; CANNON, A; MACKENZIE, IR; BOEVE, B; BAKER, M; ADAMSON, J, et al. "Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration". *Hum Mol Genet*, 2006; 15: 2988-3001.
- HUTTON, M; LENDON, CL; RIZZU, P; BAKER, M; FROELICH, S; HOULDEN, H, et al. "Association of missense and 5'-splice site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17". *Nature*, 1998; 393 (6686): 702-5.
- JACKSON, M; LENNOX, G; LOWE, J. "Motor neurone disease inclusion dementia". *Neurodegeneration*, 1996; 5: 339-350.

- JOSEPHS, KA; HOLTON, JL; ROSSOR, MN; BRAENDGAARD, H; OZAWA, T; FOX, NC, et al. "Neurofilament inclusion body disease: a new proteinopathy?" *Brain*, 2003; 126: 2291-2303.
- JOSEPHS, KA; PETERSEN, RC; KNOPMANN, DS; BOEVE, BF; WHITWELL, JL; DUFFY, JR, et al. "Clinicopathological analysis of frontotemporal and corticobasal degeneration and PSP". *Neurology*, 2006; 66: 41-48.
- KERTESZ, A. "Pick's complex and FTDP-17". *Mov Disord*, 2003; 18 (Suppl 6): S57-62.
- KERTESZ, A; MUÑOZ, DG. "Relationship between frontotemporal dementia and corticobasal degeneration/progressive supranuclear palsy". *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2004; 17: 282-288.
- KERTESZ, A; MCMONAGLE, P; BLAIR, M; DAVIDSON, W; MUÑOZ, DG. "The evolution and pathology of frontotemporal dementia". *Brain*, 2005; 128: 1996-2005.
- KNOPMAN, KS; MASTRI, AR; FREY, WH, et al. "Dementia lacking distinctive histologic features: a common non Alzheimer degenerative dementia". *Neurology*, 1990; 40: 251-256.
- LITVAN, I; BHATIA, KP; BURN, DJ, et al. "Movement Disorders Society Scientific Issues Committee. Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders". *Mov Disord*, 2003; 18: 467-86.
- MACKENZIE, IRA; FELDMAN, HH. "Ubiquitin immunohistochemistry suggests classic motor neuron disease, motor neuron disease with dementia and frontotemporal dementia of the motor neuron disease type represent a clinicopathologic spectrum". *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005; 64: 730-739.
- MACKENZIE, IRA; SHI, J; SHAW, CL; DUPLESSIS, D; NEARY, D; SNOWDEN, JS, et al. "Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited". *Acta Neuropathol*, 2006a; 112: 551-559.
- MACKENZIE, IRA; BAKKER, M; PICKERING-BROWN, S; HSIUNG, GYR; LINDHOLM, C; DWOSH, E, et al. "The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in progranulin gene". *Brain*, 2006b; 129: 3081-3090.
- MASELLIS, M; MOMENI, P; MESCHINO, W; HEFFNER, R; ELDER, J; SATO, C; LIANG, Y, et al. "Novel splicing mutation in the progranulin gene causing familial corticobasal syndrome". *Brain*, 2006; 129: 3115-3123.
- MCKEITH, IG; DICKSON, DW; LOWE, J, et al. "Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. Third report of the DLB consortium". *Neurology*, 2005; 65: 1863-1872.
- MCKHANN, GM; ALBERT, MS; GROSSMAN, M; MILLER, B; DICKSON, D; TROJANOWSKI, JQ. "Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia. Report of the work group on frontotemporal dementia and Pick's disease". *Arch Neurol*, 2001; 58: 1803-1809.
- MCMONAGLE, P; BLAIR, M; KERTESZ, A. Corticobasal degeneration and progressive aphasia. *Neurology*, 2006; 67: 1444-1451.
- MESULAM, M; JOHNSON, N; KREFFT, T; GASS, J; CANNON, A; ADAMSON, J, et al. Progranulin Mutations in Primary Progressive Aphasia. *Arch. Neurol* 2007; 64: 43-47.
- MITSUYAMA, Y. "Presenile dementia with motor neuron disease in Japan: a clinico-pathological review of 26 cases". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1984; 47: 953-959.

López de Munain, A. [et al.]: Mutazioak progranulina genean: eragiten duten klinika, patologia eta RNA...

- NEARY, D; SNOWDEN, JS; MANN, DMA. Frontotemporal dementia. *Lancet Neurology* 2005; 4: 771-779.
- NEUMANN, M; SAMPATHU, DM; KWONG, LK; TRUAX, AC; MICSENYI, MC, et al. "Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis". *Science*, 2006; 314: 130-133.
- PICKERING-BROWN, SM; BAKKER, M; GASS, J; BOEVE, BF; TOY, CL; BROOKS, WS, et al. "Mutations in progranulin explain atypical phenotypes with variants in MAPT". *Brain*, 2006; 129: 3124-3126.
- RINNE, JO; LEE, MS; THOMPSON, PD; MARSDEN, CD. "Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases". *Brain*, 1994; 117: 1183-1196.
- RIVOLTA, C; MCGEE, TL; RIO FRIO, T; JENSEN, RV; BERSON, EL; DRYJA, TP. "Variation in the retinitis pigmentosa-11 (PRPF31 or RP11) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations". *Human Mutation*, 2006; 27 (7): 644-653.
- SKIBINSKI, G; PARKINSON, NJ; BROWN, JM; CHAKRABARTI, L; LLOYD, SL; HUMMERICH, H, et al. "Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia". *Nat Genet*, 2005; 37: 806-808.
- SNOWDEN, JS; GOULDING, PJ; NEARY, D. "Semantic dementia: a form of circumscribed cerebral atrophy". *Behav Neurol*, 1989; 2: 167-182.
- SPINA, S; MURRELL, JR; HUEY, ED; WASSERMANN, EM; PIETRINI, P; BARAIBAR, MA, et al. "Clinicopathologic features of frontotemporal dementia with Progranulin sequence variation". *Neurology*, 2007; 68:
- WATTS, GDJ; WYMER, J; KOVACH, MJ, et al. "Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein". *Nat Genet*, 2004; 36: 377-381.
- WOULFE, J; KERTESZ, A; MUNOZ, DG. "Frontotemporal dementia with ubiquitinated cytoplasmic and intranuclear inclusions". *Acta Neuropathol*, 2001; 102: 94-102.

5. KOLABORATZAILEAK

Adolfo López de Munain; Ainhoa Alzualde; Ana Gorostidi; David Otaegui; Javier Ruiz-Martínez; Begoña Índakoetxea; Isidro Ferrer; Jordi Pérez-Tur; Amets Sáenz; Alberto Bergareche; Myriam Barandiaran; Juan José Poza; Ramón Zabalza; Miren Maneiro; Irune Ruiz; Miguel Urtasun; Iñaki Fernández-Manchola; Bixen Olasagasti; Juan Bautista Espinal; Javier Olascoaga; Marta Ruibal; Fermín Moreno; Nieves Carrera; José Félix Martí-Massó.