



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato in Medicina molecolare

Curriculum in Genomica, Proteomica e Tecnologie Correlate

Ciclo XXV



MALATTIA DI ALZHEIMER E DEGENERAZIONE LOBARE
FRONTOTEMPORALE: RICERCA DI MUTAZIONI AUTOSOMICHE
DOMINANTI E ANALISI GENETICA E FUNZIONALE
DI GENI CANDIDATI

Tesi di dottorato di ricerca di:
Maria Serpente
Matricola:R08629

Direttore della scuola: Chia.mo Prof Mario Clerici
Tutore : Chia.mo Prof Giacomo Comi
Correlatore: Dott.ssa Daniela Galimberti

Anno Accademico 2011/2012

SOMMARIO

Gli obiettivi di questa ricerca sono stati: effettuare uno screening genetico su una popolazione di pazienti affetti da AD e FTLD, al fine di identificare mutazioni causali (PSEN1, PSEN2 e APP per l'AD; MAPT, GRN e l'espansione G₄C₂ in C9orf72 per la FTLD) e approfondire il ruolo di alcuni geni candidati (GRN, TMEM106b e OLR1) come fattori predisponenti lo sviluppo delle due malattie in 443 pazienti con AD e 300 con FTLD. Sono stati individuati 18 pazienti portatori di mutazioni causali: 1 portatore della mutazione Ala260Val (g.49964C>T) nell'esone 8 di PSEN1, 16 portatori di mutazioni in GRN e 1 portatore di una nuova variante, Gly304Ser (g.123789 G>A), localizzata nell'esone 10 di MAPT. La presenza dell'espansione G₄C₂, situata nel primo introne del gene C9orf72, è stata analizzata in una popolazione di pazienti FTLD più ampia (651 FTLD, 21 CBS, 31 PSP). Sono stati individuati 39 pazienti portatori. L'analisi condotta su 222 controlli sani non ha prodotto alcun risultato positivo così come lo screening sui pazienti affetti da CBS e PSP. Sulla restante popolazione sporadica di pazienti AD e FTLD è stato scelto di condurre diversi studi di associazione caso-controllo. Per quanto riguarda il ruolo di GRN nello sviluppo dell'AD è stato scelto di analizzare due SNPs, rs9897526G>A e rs5848C>T. E' stata osservata una tendenza all'aumento della frequenza dell'allele rs5848T nei pazienti AD rispetto ai controlli sani, mentre per quanto riguarda lo SNP rs9897526, stratificando i risultati in base all'età d'esordio della malattia, è stata osservata una diminuzione significativa dell'età d'insorgenza per quei pazienti portatori di almeno un allele polimorfico. Lo studio condotto sulla popolazione FTLD si è concentrato su 4 Tagging SNP (rs2879096, rs3785817, rs4792938 e rs9897526) oltre che sullo SNP rs5848, localizzato nel 3'UTR di GRN. E' stata riscontrata un'associazione significativa del genotipo rs4792938CC nei pazienti rispetto ai controlli. Nel caso del gene TMEM106b è stato condotto uno studio di associazione su tre SNPs, rs1020004 A/G, rs6966915 C/T e rs1990622 A/G, ma non è stata osservata alcuna differenza significativa nella popolazione di pazienti AD. La possibile rilevanza funzionale della variabilità genetica presente in questo gene è stata determinata mediante dosaggio ELISA di GRN in 80 pazienti. I risultati sono stati stratificati in base al genotipo dello SNP rs1990622, ma tale confronto non ha mostrato alcun risultato significativo. Per quanto riguarda OLR1 è stato studiato in particolare lo SNP rs1050283 T/C, posizionato nel 3'UTR del gene. L'analisi di regressione logistica lineare, corretta per genere e per genotipo ApoE, ha evidenziato la presenza di un'associazione significativa dello SNP rs1050283T/C, sia ipotizzando un modello dominante, sia ipotizzando un modello genotipico. Pertanto tale SNP potrebbe essere considerato un fattore di suscettibilità per l'insorgenza di AD. Dato che rs1050283 è situato anche nel sito di binding per il miRNA hsa-miR369-3p, è stata effettuata un'analisi preliminare dei livelli di espressione dei due trascritti nelle PBMC per verificare un possibile ruolo funzionale della variabilità genetica individuale sull'espressione di OLR1. Stratificando i risultati in base alla presenza dell'allele rs1050283C è stata osservata una diminuzione significativa dei livelli di espressione di OLR1 nei portatori di almeno un allele C rispetto ai non portatori, a dispetto di una normale espressione di hsa-miR369-3p. Questi dati suggeriscono che la presenza di un allele polimorfico potrebbe influenzare il legame del miRNA alla sua sequenza consenso in cui lo SNP è localizzato.

ABSTRACT

This study aims to perform a genetic screening on a population of patients with AD and FTLD in order to identify pathogenic causal mutations (PSEN1, PSEN2 and APP for AD; MAPT, GRN and the G4C2 repeat expansion on the C9orf72 gene for FTLD) and investigate the role of several candidate genes (GRN, TMEM106b and OLR1) considered to be risk factors for the two diseases in 443 AD and 300 FTLD patients. Eighteen patients were carriers of pathogenic causal mutations: 1 carrier of Ala260Val (g.49964C>T) situated in exon 8 of PSEN1, 16 carriers of GRN gene mutations and 1 carrier of a new variant, Gly304Ser (g.123789G>A), located in exon 10 of MAPT gene. The presence of G4C2 repeat expansion, positioned on the first intron of C9orf72 gene, was analyzed in a larger population (651 FTLD patients, 21 CBD and 31 PSP patients). Thirty nine patients with FTLD were carriers of pathogenic repeat expansion, whereas none of CBD and PSP patients as well as 222 controls carried the mutation. Several association studies were performed in the remaining sporadic population of AD and FTLD patients. Regarding the influence of GRN genetic variability on susceptibility to AD, two SNPs rs9897526G>A and rs5848 were investigated. A trend to an increased frequency of the rs5848T allele was found in AD patients as compared with controls, whereas for the rs9897526 SNP, patients carrying the A variant had a significant earlier age at disease onset compared with patients carrying the G allele. The case-control study carried out on a population of FTLD patients was focused on four Tagging SNPs (rs2879096, rs3785817, rs4792938 and rs9897526) as well as on rs5848 SNP, localized in the 3'UTR of GRN gene. A statistically significant association of the rs4792938 CC genotype was observed in FTLD patients compared with healthy controls. Concerning the role of TMEM106b gene on susceptibility to AD, an association analysis was performed on three SNPs, rs1020004 A/G, rs6966915 C/T and rs1990622 A/G, but no significant differences in allelic and genotype frequencies were found for all polymorphisms between AD patients and controls. The possible functional importance of genetic variability associated with this gene was tested by plasmatic ELISA detection of GRN on eighty AD patients. Stratifying the results according to rs1990622 SNP status, no significant differences in progranulin plasma levels were found in AD patients. Regarding OLR1, in particular it was analyzed the SNP rs1050283 T/C, located in 3'UTR of the gene. Logistic regression analysis, adjusted for gender and ApoE status, showed a statistically significant association of OLR1 rs1050283 under the assumption of a dominant and a genotypic model. Therefore this SNP could be considered a susceptibility factor for sporadic AD. Given that the SNP rs1050283 is also located in a predicted binding site of the miRNA has-miR369-3p, a preliminary expression analysis was performed on the two transcripts in the PBMC in order to clarify a possible functional role of individual genetic variability on the expression of OLR1 gene. Stratifying the results according to the presence of rs1050283C allele, a significant decrease of relative expression levels of OLR1 was observed in patients carrying at least one polymorphic C allele, despite the normal expression levels of has-miR369-3p. These data suggest that the presence of the polymorphic allele could influence the binding of has-miR369-3p to its 3'UTR consensus sequence, in which the SNP is located.

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	<i>Le demenze e l'invecchiamento</i>	1
1.2	<i>La malattia di Alzheimer</i>	2
1.2.1	Caratteristiche cliniche	3
1.2.2	Diagnosi	5
1.2.3	Anatomia Patologica	7
1.2.4	Biologia della proteina β -amiloide	10
1.2.5	Neuropatogenesi	13
1.2.5.1	<i>Ruolo delle Preseniline</i>	13
1.2.5.2	<i>Ruolo della proteina tau</i>	16
1.2.5.3	<i>Ruolo dell'infiammazione</i>	16
1.2.5.4	<i>Ruolo dello stress ossidativo</i>	20
1.2.6	Aspetti biochimici	22
1.2.7	Genetica dell'AD	23
1.2.7.1	<i>AD familiare (FAD)</i>	23
1.2.7.2	<i>AD Sporadico (SAD)</i>	25
1.2.7.2.1	<i>OLR1 e AD</i>	28
1.2.8	MicroRNA e AD	29
1.3	<i>La Degenerazione Lobare Frontotemporale</i>	33
1.3.1	Epidemiologia e clinica	34
1.3.2	Aspetti Neuropsicologici	37
1.3.3	Caratteristiche Neuropatologiche	38
1.3.4	Genetica della FTLTLD	40
1.3.4.1	<i>MAPT</i>	41
1.3.4.2	<i>GRN</i>	42
1.3.4.3	<i>C9orf72</i>	43
1.3.4.4	<i>VCP-1</i>	46
1.3.4.5	<i>CHMP2B</i>	46
1.3.4.6	<i>TARDBP e FUS</i>	47
1.3.4.7	<i>Fattori di rischio genetico</i>	47
2	SCOPO DELLA RICERCA	49
3	MATERIALI E METODI	51
3.1	<i>Arruolamento della popolazione oggetto dello studio</i>	51
3.2	<i>Purificazione del DNA genomico da sangue intero</i>	52
3.3	<i>Sequenziamento diretto dei geni MAPT, GRN e PSEN1</i>	53
3.4	<i>Genotipizzazione delle ripetizioni esanucleotidiche in C9orf72</i>	54
3.5	<i>Repeat Primed PCR ed analisi dei frammenti per la rilevazione dell'espansione in C9orf72</i>	55
3.6	<i>Analisi mutazionale tramite High Resolution Melting (HRM)</i>	56
3.7	<i>Analisi in Silico</i>	57
3.8	<i>Discriminazione della variante allelica mediante tecnologia</i>	

<i>TaqMan</i>	57
3.9 Genotipizzazione di ApoE	59
3.10 Estrazione RNA totale e Analisi trascrizionale quantitativa	59
3.11 Estrazione di hsa-miR369-3p e relativa analisi trascrizionale quantitativa	61
3.12 Dosaggio di GRN plasmatica	61
3.13 Analisi statistica	62
4 RISULTATI	63
4.1 Screening di mutazioni autosomiche dominanti	63
4.2 Analisi dell'eterogeneità clinica in famiglie portatrici di mutazioni autosomiche dominanti	65
4.3 Screening delle ripetizioni esanucleotide in C9orf72 in pazienti affetti da FTLD	69
4.4 Studi di associazione caso-controllo condotti secondo l'approccio del gene candidato posizionale e funzionale	71
4.4.1 GRN e AD	71
4.4.2 GRN e FTLD	73
4.4.3 TMEM106b e AD	74
4.4.4 OLR1 e AD	75
4.5 Analisi trascrizionale quantitativa di OLR1 e di hsa-miR369-3p	76
5 DISCUSSIONE	79
6 CONCLUSIONI	87
BIBLIOGRAFIA	90
APPENDICI	106

LISTA SIMBOLI

AD:	Alzheimer's Disease
ApoE:	Apolipoprotein E
APP:	Amyloid precursor protein
Aβ:	β -Amiloide
BACE:	β -site APP cleaving enzyme
bvFTD:	Behavioral variant FTD
bvFTD-MND:	bvFTD with Motor Neuron Disorders
CBS:	Corticobasal Syndrome
ChAT:	Choline acetyltransferase
CHMP2B:	Chromatin Modifying Protein 2B
C9orf72:	Chromosome 9 open reading frame 72
CSF:	Cerebrospinal fluid
EOAD:	Early Onset AD
FAD:	Familial Alzheimer's disease
FTDP-17:	Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17
FTLD:	Frontotemporal Lobar Degeneration
FTLD-T:	Frontotemporal Lobar Degeneration with tau
FTLD-U:	Frontotemporal lobar degeneration with Ubiquitinated inclusions
GRN:	Progranulin
GWAS:	Genome- Wide Association Studies
LOAD:	Late Onset AD
LPA:	Logopenic/Phonemic aphasia
MAPT:	Microtubule Associated Protein Tau gene
MCI:	Mild Cognitive Impairment
MiRNA:	microRNA
NINCDS -ADRDA:	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke -Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
OLR1:	Oxidised LDL receptor 1 gene
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PNFA:	Progressive Non-Fluent Aphasia
PPA:	Primary Progressive Aphasia
PSEN:	Presenilin
PSP:	Progressive Supranuclear Palsy
SAD:	Sporadic Alzheimer's disease
SD:	Semantic Dementia
SNPs:	Single Nucleotide Polymorphisms
SP:	Senile plaques
TMEM106b:	Transmembrane protein 106 b
Taq :	Thermus aquaticus
TARBDP:	TAR-DNA binding protein 43 encoding Gene
VCP-1:	Valosin-Containing Protein

1 INTRODUZIONE

1.1 Le demenze e l'invecchiamento

La "demenza" non è un'accentuazione del fisiologico processo di invecchiamento né una sua anticipazione. Vi sono, infatti, delle chiare differenze qualitative sia sul piano anatomopatologico sia clinico-fenomenologico. Nell'anziano è presente una graduale disfunzione della memoria che riguarda soprattutto la rievocazione di materiale mnesico, mantenendo comunque la capacità di acquisire nuove informazioni. Le funzioni intellettuali globali seppur un po' rallentate rimangono pressoché conservate e le disfunzioni presenti non interferiscono in maniera elevata con la conduzione delle attività quotidiane.

Oggi la demenza è considerata in tutto e per tutto una sindrome clinica, che presenta quindi dei sintomi e dei segni ben precisi. È caratterizzata infatti dalla presenza di disturbi cognitivi acquisiti che hanno un'eziologia organica, cioè sottendono un danno cerebrale. Le funzioni cognitive colpite devono comprendere la memoria e almeno una tra pensiero astratto, funzione critica, linguaggio, orientamento spazio-temporale con conservazione della vigilanza, ma di entità tale da compromettere l'autonomia funzionale del soggetto. Grazie al miglioramento delle possibilità di trattamento, della gestione e delle procedure diagnostiche la demenza viene ad oggi diagnosticata nei suoi primi stadi di insorgenza e riconosciuta all'interno di un quadro globale di sintomi.

L'etimologia della parola demenza, dal latino "demens", significa "fuori di mente" e fu usata per la prima volta nella medicina romana (Aulo Cornelio Celso, "De Medicina"), per indicare genericamente una condizione di alterazione delle capacità cognitive e del comportamento. Il termine è stato usato poi per molto tempo per indicare ogni condizione acquisita che comportasse indebolimento o perdita, da parte di un soggetto, di abilità cognitive precedentemente possedute. Non veniva fatta distinzione tra patologie chiaramente su base organica o su base apparentemente funzionale (da cui la definizione di "dementia praecox" data alla schizofrenia). Con il termine "demenza senile" si intendeva qualsiasi forma di alterazione delle funzioni mentali che insorgesse oltre i 65 anni di età; non c'era interesse ad una maggiore caratterizzazione poiché questa condizione era considerata un risultato parafisiologico dell'invecchiamento. L'affinamento delle tecniche diagnostiche, sia strumentali che neuropsicologiche e la maggiore caratterizzazione dei quadri neuropatologici alla base delle diverse forme di demenza ha portato, negli ultimi 30-40 anni, ad una migliore definizione dei loro quadri clinici, processo che continua anche attualmente, supportato da tecnologie diagnostiche sempre più sensibili e specifiche e stimolato da nuove prospettive terapeutiche.

Negli anni '80 sono stati formulati per la prima volta criteri clinici, approvati a livello internazionale, per la diagnosi della demenza (DSM-III nel 1987; ultima edizione DSMIV- TR nel 2000), più volte rivisti nel corso degli scorsi decenni fino ad arrivare all'attuale definizione.

La demenza può essere causata da numerose malattie, ma l'incidenza delle diverse patologie responsabili è difficilmente precisabile, perché la diagnosi clinica ha un'attendibilità variabile, ma certamente non superiore al 70-80%, e la diagnosi

neuropatologica è disponibile solo in una parte dell'intero gruppo di pazienti dementi. Tuttavia viene generalmente accettato che fra tutti i "dementing disorders", la Malattia di Alzheimer (AD) sia la più frequente, rappresentando quasi il 70% di tutte le demenze, seguita dalla Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD), intesa come un gruppo eterogeneo di sindromi cliniche che si manifestano prima dei 60 anni [1]. La restante percentuale di casi sarebbe attribuibile a demenze di tipo vascolare e a malattie neurodegenerative più rare, associate a cause di tipo metabolico, endocrino, infettivo, tossico, traumatico, neoplastico e, infine, da idrocefalo normoteso. La possibilità di sviluppare l'AD aumenta in maniera esponenziale nella fascia di età compresa tra i 65 e gli 85 anni, raddoppiando approssimativamente ogni cinque anni: essa, infatti, tra i 65 e i 69 anni è pari circa all'1% e raggiunge il 30% nella fascia di età tra gli 85–89 anni. Lo sviluppo della malattia correlata con l'età, ha portato alcuni ricercatori ad ipotizzare che il progressivo decadimento tipico della demenza, sia in effetti, un processo inevitabilmente legato all'invecchiamento: secondo questa ipotesi tutti dovrebbero sviluppare demenza ad un'età che però non è raggiunta dalla maggior parte degli individui. Tuttavia diversi studi sembrano suggerire che oltre gli 85 anni vi sia una riduzione dell'incidenza, e un punto di flessione intorno ai 95 anni, identificando quindi nella demenza una patologia [2] e non un traguardo ineluttabile. Tale effetto è probabilmente dovuto al fatto che l'AD e le altre patologie neurodegenerative sono, di fatto, malattie multifattoriali. Nel determinismo, nel tasso di insorgenza e nella velocità di progressione di queste patologie concorrono, infatti, sia i fattori genetici che fattori ambientali. I primi corrispondono alla programmazione che la cellula neuronale ha di degenerare, mentre i secondi si inseriscono nell'insieme delle cause esogene, come l'alimentazione, l'esposizione a prodotti inquinanti, le abitudini di vita o il clima, che possono concorrere all'aumento della velocità di deterioramento del tessuto cerebrale. Ovviamente il peso relativo di ciascuno di questi elementi è difficilmente quantizzabile ed è con elevata probabilità variabile da paziente a paziente.

In ogni caso e indipendentemente dalla causa, la demenza è una condizione a elevato impatto sociale e personale. I costi che la Società è chiamata a sostenere per assistere questi pazienti sono elevatissimi e la tendenza per gli anni futuri non può che essere verso una crescita esponenziale considerando la variazione dell'assetto demografico a cui stiamo assistendo. Parallelamente ad un miglioramento delle conoscenze mediche e delle tecniche assistenziali si osserva, infatti, un invecchiamento della popolazione associato ad un allungamento della speranza di vita, almeno nei paesi sviluppati. Dal punto di vista personale, invece, all'onere emotivo ed economico che grava su pazienti e familiari si aggiunge, spesso, la confusione generata da una condizione non sempre identificabile con certezza e, quindi, non pienamente comprensibile.

1.2 La malattia di Alzheimer

L'AD è una patologia neurodegenerativa eterogenea con progressione irreversibile, che interessa primariamente le regioni ippocampali e corticali del cervello. L'AD è una forma di demenza del SNC (Sistema Nervoso Centrale), definita da una perdita neuronale selettiva e localizzata, da un deterioramento della

memoria e delle capacità cognitive e dall' incapacità di mantenere le abitudini quotidiane.

Negli ultimi anni del '900 furono riscoperti, nei seminterrati del *Institute of Neuropathology of the University of Munich*, i reperti istologici che il neuropatologo Alois Alzheimer ottenne nel 1906, dal suo primo caso di malattia, con l'aiuto del giovane ricercatore italiano Gaetano Perusini, individuando due caratteristiche peculiari, quali la presenza di ammassi neurofibrillari e di placche amiloidi [3].

L'AD è la più comune causa di demenza nella popolazione anziana dei paesi occidentali, essendo stata diagnosticata al riscontro autoptico nel 50-60% dei casi di decadimento cognitivo ad esordio tardivo [4]. Inoltre non raramente l'AD rende conto di casi di demenza in età tardo-adulta e presenile (45-65 anni). La patologia interessa maggiormente le donne in tutte le fasce d'età [5]: sebbene l'incidenza sia solo lievemente aumentata rispetto alla popolazione maschile, la prevalenza nella popolazione femminile è triplicata. L'incidenza della malattia è simile in tutto il mondo ed è stimata in tre nuovi casi su 100.000 nella popolazione con età inferiore a 60 anni, e 125/100.000 nella fascia d'età superiore ai 60 anni. La prevalenza è circa 300/100.000 tra 60 e 69 anni, 3.200/100.000 nella fascia 70 - 79 e 10.800/100.000 nei soggetti oltre gli 80 anni. In Italia sono attualmente presenti più di 500.000 persone affette, con conseguente forte impatto sulle famiglie e la società. La sopravvivenza dei malati è ridotta a metà di quella attesa, in ragione del fatto che la maggior parte dei decessi avviene per complicanze cardiovascolari e respiratorie secondarie legate allo stato vegetativo in cui nelle fasi gravi i pazienti sono ridotti.

Molti presunti fattori di rischio epidemiologici per l'AD, come l'ordine di nascita l'età della madre, l'anamnesi patologica remota positiva per trauma cranico, non sono stati confermati. Non è stato determinato se un basso livello culturale costituisca un fattore di rischio per lo sviluppo della malattia o se, al contrario, occupazioni impegnative dal punto di vista intellettuale proteggano nei confronti della demenza.

1.2.1 Caratteristiche cliniche

L'AD è una complessa sindrome al cui sviluppo concorrono fattori genetici e ambientali diversamente combinati, che conducono ad un quadro clinico e anatomo-patologico comune [6]. L'inizio delle alterazioni mentali è di solito talmente insidioso, che solitamente né il paziente né i familiari sono in grado di localizzarlo precisamente nel tempo. Talvolta un evento indipendente dalla patologia di base, come potrebbe essere un cambiamento di ambiente (per esempio un ricovero), un'affezione febbrile o un intervento chirurgico rende evidente un quadro precedentemente subclinico.

Il principale sintomo è rappresentato da un deficit di memoria anterograda che insorge gradualmente e progredisce fino a compromettere lo svolgimento delle normali attività quotidiane. Spesso è presente precocemente disorientamento spazio-temporale, con incapacità ad orientarsi in percorsi non noti. Molti pazienti presentano anosognosia e non sono, pertanto, in grado di rendersi conto dei propri problemi cognitivi; altri possono avere una maggiore consapevolezza di malattia, cui consegue quasi invariabilmente uno stato depressivo, che non raramente è il motivo per cui giungono all'osservazione dello specialista.

Il deficit amnesico è complessivo, riguarda sia la memoria verbale sia quella visuo-

spaziale, limitando in particolare l'apprendimento di nuove informazioni. E' noto, infatti, che i ricordi più datati sono conservati più a lungo, e solo in un secondo tempo diviene deficitaria anche la rievocazione. Spesso è presente una discrepanza fra l'esecuzione di compiti automatizzati d'ambito professionale e attività quotidiane, anche banali, ma nuove e non previste. Generalmente il malato demente tenta di coprire le proprie lacune amnesiche con evidenti confabulazioni. Nel momento in cui il deficit amnesico si fa più pronunciato si rendono evidenti gli altri deficit cognitivi. Il linguaggio è difficoltoso per incapacità di ricordare i vocaboli, e il paziente tenta di ovviare a questa situazione ricorrendo a complesse circonlocuzioni. Il vocabolario si restringe, mentre la comprensione è inizialmente conservata, per essere poi compromessa nelle fasi successive. In fase avanzata compare spesso ecolalia, ed infine il disturbo può evolvere fino ad una vera afasia anomica. Progressivamente il paziente diventa incapace di riconoscere i volti familiari (prosopagnosia) e persino il proprio. Anche la capacità di calcolo viene meno (acalculia o discalculia), risultano inizialmente alterate le capacità lavorative del paziente, rendendolo infine incapace di eseguire anche i calcoli aritmetici più semplici. Peculiare è la comparsa di disorientamento spazio-temporale. Con l'aggravarsi della malattia, il paziente presenta difficoltà d'orientamento anche in luoghi a lui familiari, e perfino nella sua stessa casa. Frequente è l'inversione del ritmo sonno-veglia, soprattutto nelle fasi avanzate della malattia, aggravata dal disorientamento temporale, che porta il paziente a non riconoscere le diverse fasi della giornata. Gradualmente il paziente sviluppa difficoltà nel capire la relazione esistente fra se stesso e gli oggetti come si osserva, ad esempio, nell'aprassia dell'abbigliamento, ove emergono difficoltà o incapacità nel posizionare i propri segmenti corporei in accordo con i capi d'abbigliamento o nel rispettarne la corretta stratificazione. Simili difficoltà compaiono nell'utilizzo degli strumenti e degli oggetti della vita quotidiana, come le posate o gli elettrodomestici (aprassia d'utilizzo). Frequentemente con il progredire della malattia interviene difficoltà nella locomozione con instabilità e passi accorciati, ma senza deficit di forza o rigidità; nelle fasi finali il paziente è incapace di mantenere la stazione eretta ed è costretto a giacere a letto, completamente dipendente da altri. La capacità di giudizio viene progressivamente danneggiata: il paziente non è più in grado di cogliere somiglianze o differenze concettuali, di giudicare correttamente prezzi, dimensioni, quantità, diventando con il tempo incapace di badare inizialmente ai propri affari e successivamente a se stesso. Il soggetto inoltre si distrae facilmente con stimoli esterni e si stanca velocemente ad affrontare compiti anche molto semplici. Con il trascorrere del tempo, la vita di relazione è sempre più compromessa dai deficit sopra descritti, aggravati da sintomi psichiatrici, spesso di tipo psicotico (deliri di furto, di gelosia, di riferimento, di persecuzione, allucinazioni visive) che divengono frequenti nelle ultime fasi della malattia; spesso sono inoltre presenti manifestazioni comportamentali inappropriate, vagabondaggio, aggressività verbale e fisica. La presenza di depressione, soprattutto in fase iniziale è frequente e spesso causa difficoltà nella diagnosi differenziale e nell'inquadramento della patologia, soprattutto perché tali manifestazioni possono essere di tipo reattivo alle difficoltà incontrate dal paziente. La concomitante comparsa di sintomi quali alterazioni comportamentali, irritabilità, agitazione, passività, apatia, può allontanare il sospetto di demenza orientando verso una patologia psichiatrica e non verso i sintomi psichiatrici di una patologia degenerativa. Approfonditi test

neuro-psicologici sono in grado di evidenziare i deficit e favorire una corretta diagnosi anche nelle fasi precoci della malattia. Per confermare l'iniziale sospetto è necessario seguire il paziente nel tempo. Talvolta la malattia si manifesta con un episodio "demenziale", vale a dire con un comportamento, circoscritto nel tempo, chiaramente incongruo alle circostanze [7]. L'esame obiettivo inizialmente è normale, mentre nelle fasi successive possono essere evocati i riflessi di suzione, prensione ed altri segni di liberazione frontale; possono essere presenti segni d'interessamento extrapiramidale e raramente crisi epilettiche; compare incontinenza sfinterica e acinesia, e il paziente diventa mutacico. Da alcuni studi neuro-psicologici su soggetti anziani apparentemente sani si è osservato che, in coloro che col tempo sviluppano la malattia, essa resta asintomatica nella maggior parte dei casi per almeno cinque anni dalle prime anomalie emerse ai test più approfonditi, con lieve perdita della memoria e dell'attenzione. Alcuni autori ritengono che tale periodo possa essere anche più lungo. Non in tutti i pazienti la malattia esordisce ed evolve nello stesso modo, esiste, infatti, una gran variabilità nella comparsa dei sintomi e nella loro velocità di progressione; comune è invece il livello di decadimento finale con perdita completa dell'autosufficienza e una vita sempre più di tipo vegetativo che vede nella fase terminale il paziente confinato a letto, acinetico, mutacico, con incontinenza sfinterica, incapace di riconoscere le persone intorno a lui: il decesso avviene solitamente per un'infezione respiratoria o urinaria intercorrente[8]. Il decorso totale della malattia varia da paziente a paziente, ma è generalmente compreso tra 7 e 12 anni. Alcuni pazienti presentano un declino inesorabilmente progressivo, mentre altri possono presentare fasi di stabilità indipendenti dagli interventi terapeutici. Recentemente è stata posta particolare attenzione alle fasi precliniche della malattia, fasi in cui il paziente non è ancora asintomatico oppure in cui la sintomatologia non influenza negativamente le attività della vita quotidiana. In particolare con il termine di MCI (Mild Cognitive Impairment) si intende quello stadio in cui sono riscontrabili deficit soggettivi e oggettivi della memoria episodica e/o di altri ambiti cognitivi di intensità così lieve da non determinare un significativo impatto ecologico; attualmente si tende a distinguere i pazienti affetti da MCI multidominio dai pazienti con MCI amnestico [9]. I pazienti affetti da MCI hanno maggiori probabilità rispetto a pazienti cognitivamente integri di progredire verso uno stadio di AD probabile conclamata ma la progressione non è la regola [10].

1.2.2 Diagnosi

La fase diagnostica nella valutazione di un soggetto con apparenti disturbi cognitivi ha inizio con l'indagine anamnestica, analizzando le eventuali difficoltà relative alla memoria e agli altri ambiti cognitivi, e le loro ripercussioni sulla vita di tutti i giorni (indagine ecologica). Se i sospetti si delineano chiaramente, il passo successivo è un'indagine neuro-psicologica volta alla conferma o smentita dei medesimi, alla loro analisi e quantificazione nei diversi ambiti cognitivi in modo da offrire così un utile elemento diagnostico e un parametro confrontabile nel tempo per poter effettuare l'indispensabile follow-up. Appurata l'esistenza del disturbo cognitivo, il clinico deve escludere le forme secondarie con le idonee indagini strumentali e con un'accurata obiettività clinica. In prima istanza è fondamentale escludere tutte le cause reversibili di decadimento cognitivo. Attualmente la maggior parte degli

esperti raccomanda di eseguire almeno un'indagine di imaging cerebrale per escludere la presenza di lesioni occupanti spazio, quali neoplasie a lento accrescimento, di idrocefalo normoteso nonché di ematomi subdurali cronici; è, inoltre, opportuno eseguire test ematochimici con dosaggio di vit. B12, folati e funzionalità tiroidea; tali quadri sono trattabili ed il decadimento cognitivo da essi determinato è, almeno parzialmente, reversibile. Sono inoltre da escludere l'abuso di alcolici o di altre sostanze (compresi i farmaci) e l'esposizione a tossici ambientali. Test sierologici per la ricerca di positività anticorpale nei confronti di HIV e sifilide andrebbero riservati ai casi a rischio.

Se tutti i dati convergono verso una forma di decadimento cognitivo primitivo, l'analisi dell'andamento temporale e dei settori neuro-psicologici più compromessi può indirizzare verso la corretta diagnosi clinica con l'identificazione del tipo di patologia specifica da cui si ritiene sia affetto il paziente.

Comunque l'unica diagnosi sicura di malattia di Alzheimer è quella istopatologica, anche se elevati livelli di sensibilità e specificità sono stati raggiunti mediante la messa a punto di criteri di diagnosi clinica universalmente accettati; Le tecniche di neuroimaging assumono un ruolo importante nell'iter diagnostico delle demenze e dell'AD, da un lato escludendo sindromi e condizioni in grado di generare un quadro patologico simile, quali tumori cerebrali, ematomi sottodurali, idrocefalo e lesioni ischemiche, dall'altro evidenziando un quadro d'atrofia che sebbene non specifico è d'aiuto nel formulare la diagnosi. La tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM) infatti, sono in grado di dimostrare nei pazienti in fase avanzata una dilatazione dei ventricoli laterali e del terzo ventricolo fino al doppio delle dimensioni normali, nonché un ampliamento dei solchi corticali; la RM in sezione sottile dimostra una sproporzionata atrofia degli ippocampi e un allargamento dei corni temporali dei ventricoli laterali. Nelle fasi precoci della malattia invece le alterazioni spesso non sono distinguibili da quelle che si osservano in anziani con funzioni cognitive inalterate, infatti, un certo grado d'atrofia cerebrale è presente anche nell'invecchiamento normale e la differenza con i quadri di AD è di tipo quantitativo.

Attualmente la diagnosi di AD viene posta seguendo i criteri NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work Group), revisionati nel 2007 da Dubois et al [11].

Per soddisfare la diagnosi di AD probabile deve essere riscontrato un deterioramento progressivo e graduale delle funzioni mnesiche, oggettivabile e presente da almeno sei mesi in associazione ad almeno un elemento tra: presenza di atrofia a livello dei lobi temporali mediali, biomarcatori liquorali compatibili (basse concentrazioni di β -amiloide, aumentati livelli di tau totale e/o tau fosforilata), ipometabolismo a livello dei lobi temporali bilaterali documentato alla PET, mutazione patogenetica nota. Oltre ad avere attribuito peso diagnostico ai marcatori biologici di malattia, quali i dati liquorali e di imaging funzionale, la recente revisione eliminato la definizione diagnostica di "AD possibile", precedentemente riservata alle forme con caratteristiche cliniche atipiche (insorgenza brusca, segni neurologici focali, incoordinazione motoria e/o crisi epilettiche precoci) o con malattie sistemiche e/o cerebrali coesistenti, che tuttavia non si ritiene possano essere causa della demenza. Infine, sempre grazie alla nuova stesura dei criteri, è attualmente possibile porre certezza diagnostica, oltre

che in presenza di un quadro anatomopatologico compatibile (criteri di NIA-Regan) anche in caso di paziente portatore di una mutazione patogenetica nota [12].

1.2.3 Anatomia Patologica

Il quadro anatomico-patologico macroscopico della malattia di Alzheimer è caratterizzato da una notevole atrofia del cervello, con circonvoluzioni cerebrali ristrette, solchi e ventricoli ampliati. Il peso del cervello, soprattutto nelle fasi avanzate della malattia, può essere ridotto anche del 20%. I processi atrofici coinvolgono soprattutto i lobi frontali, temporali e parietali, e in modo marcato l'ippocampo, la cui atrofia è talmente caratteristica da essere ritenuta, da alcuni Autori, come diagnostica (Figura 1).

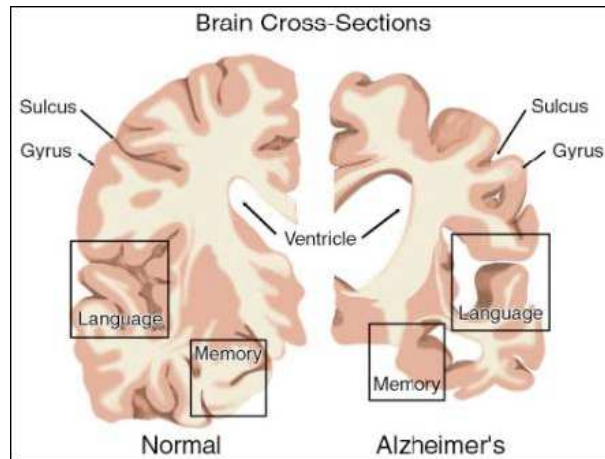


Figura 1. Sezione frontale del cervello normale e affetto da AD

Microscopicamente si può osservare una cospicua perdita cellulare soprattutto a livello corticale; particolarmente colpiti risultano l'ippocampo, la corteccia entorinale, il giro para ippocampale e il subiculum. Sono depauperati anche il nucleo anteriore del talamo, i nuclei settali e la banda diagonale di Broca, l'amigdala e le porzioni del tronco cerebrale appartenenti ai sistemi monoaminergici. Anche i neuroni colinergici del nucleo basale di Meynert e del locus coeruleus sono numericamente ridotti. La perdita neuronale interessa sia le grosse cellule piramidali sia gli interneuroni. Molti dei neuroni superstiti sono di volume ridotto e con minore numero di dendriti, i quali, a loro volta, si presentano addossati l'uno all'altro, a causa della perdita di sinapsi e neuropilo; la perdita sinaptica che accompagna la degenerazione neuronale è correlata ai deficit mnesici cui si assiste nell'AD. Alle alterazioni neuronali si associa una proliferazione astrocitaria, di significato verosimilmente riparativo o compensatorio, soprattutto negli strati III e IV della corteccia. Sebbene l'atrofia cerebrale sia un reperto relativamente costante nell'AD, la considerevole variabilità che si può osservare tra i diversi casi ne impedisce l'utilizzo come marcatore diagnostico affidabile. Gli aspetti tipici all'esame neuropatologico sono rappresentati dalle placche senili (SP), dagli ammassi neurofibrillari (NTF) (Figura

2) e dall'angiopatia amiloide (congofila), il riscontro dei quali post mortem consente la diagnosi definitiva. Tali lesioni si possono riscontrare, sebbene in misura minore e diversamente associate, anche in anziani normali, ed in altre patologie degenerative cerebrali, risultando quindi tipiche ma non patognomoniche di AD: è la valutazione quantitativa più che quella qualitativa a permettere la diagnosi.

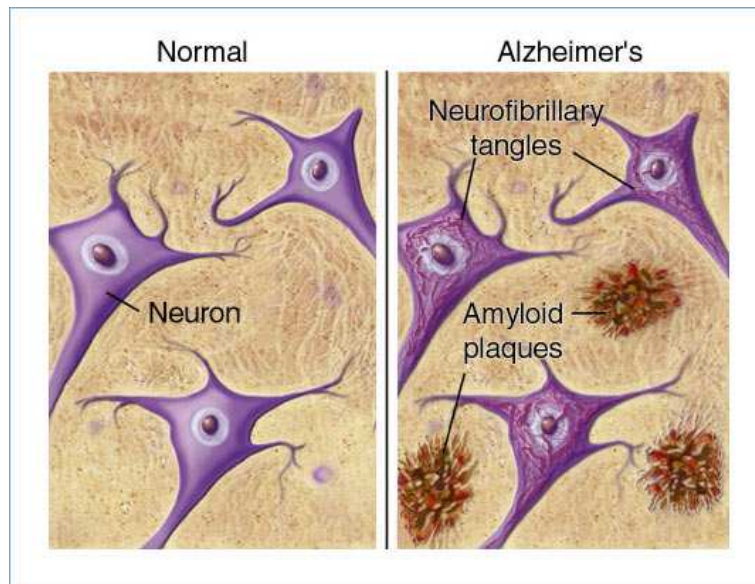


Figura 2. Esempio schematico di placche di amiloide e grovigli neurofibrillari

Le placche senili sono costituite da foci microscopici di depositi extracellulari di amiloide associati a danno assonale e dendritico, generalmente rappresentati in grande numero nella corteccia limbica e associativa [13] queste formazioni contengono depositi insolubili di proteina amiloide β ($A\beta$), principalmente in forma filamentosa, che nella parte centrale della placca si addensano a formare un core compatto, e neuriti distrofici, i quali si localizzano sia dentro, sia in prossimità dei depositi amiloidei. Le placche di amiloide che si accumulano nel cervello sono irregolari, approssimativamente sferiche ed hanno dimensioni molto variabili che possono andare da 10 a parecchie centinaia di micrometri. La sostanza amiloide è formata da fibrille con conformazione a foglietto β di 6-10 nm di diametro presenti nello spazio extracellulare, costituite da una proteina, chiamata $A\beta$ [1-42] che deriva da un precursore di maggiori dimensioni (APP). Tale precursore della proteina β amiloide è una proteina integrale di membrana che possiede un grande tratto di catena extracellulare e una piccola coda citoplasmatica. Si ritiene che i diversi tratti extracellulari della proteina esercitino azioni particolari in condizioni normali e patologiche.

I neuriti danneggiati si presentano dilatati, con alterazioni ultrastrutturali, tra cui lisosomi rigonfi, aumentato numero di mitocondri e filamenti elicoidali accoppiati, generalmente indistinguibili da quelli che compongono gli ammassi neurofibrillari.

I neuriti che partecipano alla formazione della placca senile possono provenire da neuroni di diverse classi neurotrasmettitoriali. La placca senile è inoltre associata ad elementi microgliali ed astrocitari attivati. La componente microgliale esprime antigeni di superficie tipici dello stato attivato come CD45 e HLA-DR ed è localizzata soprattutto dentro il core o nei suoi pressi. Gli elementi astrocitari circondano invece la placca e mostrano abbondanti processi che si estendono verso il core. Nella placca senile si trovano colocalizzate sia la proteina A β [1-42] più idrofobica e particolarmente incline all'aggregazione [14], sia la forma A β [1-40], che è normalmente prodotta in maggiore quantità rispetto alla A β [1-42]. Le indagini immunostochimiche mettono in evidenza la presenza di agglomerati di A β localizzati diffusamente nella corteccia, comprese quelle aree non chiaramente implicate nella tipica sintomatologia della malattia di Alzheimer (come talamo, caudato, putamen, cervelletto), caratterizzati da una leggera e amorfa immunoreattività, senza un core compatto né chiaramente fibrillare (placche diffuse). Inoltre nella maggior parte di questi agglomerati non è possibile dimostrare la presenza di neuriti distrofici o se ne può riconoscere solo una piccola quantità.

Le placche diffuse sono costituite quasi esclusivamente da A β [1-42][15,16,17,18], e sono le uniche forme riconoscibili in quelle regioni nelle quali mancano o si ritrovano in piccola quantità i neuriti distrofici, le modificazioni gliali e gli NTF, e che non sono chiaramente implicate nella sintomatologia tipica della AD. Esse possono essere anche messe in evidenza come uniche lesioni nella corteccia limbica e associativa di soggetti della stessa età non affetti da malattie dementigene degenerative, e sono presenti già durante l'età adolescenziale in soggetti con trisomia 21 (Sindrome di Down)[19]. Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare per queste lesioni un significato di precursori delle placche senili, ipotesi supportata anche da esperimenti su topi transgenici esprimenti il gene mutante umano per l'APP, i quali sviluppano depositi diffusi prima della forma fibrillare associata alle modificazioni neuritiche e gliali. Molti neuroni nelle regioni tipicamente coinvolte nell'AD (corteccia entorinale, ippocampo, giro paraippocampale, amigdala, corteccia associativa frontale, parietale, temporale e occipitale, e alcuni nuclei sottocorticali che proiettano a queste regioni) contengono grandi ammassi di fibre anomale, non legate alla membrana, che occupano lo spazio perinucleare, aventi forma globosa o a fiamma, spesso estese fino ai prolungamenti cellulari. La maggior parte di queste fibre (di dimensione ~10 nm) consistono in coppie di filamenti elicoidali con un periodo pari a ~160 nm. Le fibre che realizzano gli ammassi neurofibrillari sono composte da aggregati della proteina tau [20,21,22,23], che nella cellula normale si trova associata ai microtubuli, e che negli ammassi neurofibrillari si trova in forma iperfosforilata e insolubile. In vitro, numerose chinasi sono in grado di fosforilare la proteina tau in vari siti [24], tuttavia non è ancora chiaro quante e quali chinasi siano responsabili *in vivo* nell'iniziare il processo di iperfosforilazione che conduce alla dissociazione della proteina tau dai tubuli e alla sua aggregazione in filamenti elicoidali appaiati insolubili. Negli ammassi neurofibrillari, associate alla proteina tau iperfosforilata si localizzano altre proteine anomale, quali l'ubiquitina, la proteina associata ai microtubuli e una proteina dei neurofilamenti. Le due lesioni classiche dell'AD possono essere presenti indipendentemente l'una dall'altra; ammassi

neurofibrillari molto simili o addirittura indistinguibili da quelli riscontrati nell'AD sono stati descritti in più di una dozzina di altre patologie neurodegenerative, quasi in tutti i casi in assenza di depositi di A β o placche senili.

Inoltre depositi di A β possono essere riscontrati nella corteccia cerebrale di anziani cognitivamente normali in assenza di ammassi neurofibrillari. Nelle placche senili si può dimostrare la presenza di numerose altre molecole, la maggior parte delle quali di significato infiammatorio. Vi sono evidenze che ApoE4, C1q e altre molecole possano legarsi alla A β e accelerare la formazione di fibrille [25,26,27]; altre invece, come la *clusterina*, possono inibirla[28]. La fibrillogenesi potrebbe essere quindi determinata da uno squilibrio tra i fattori che la favoriscono e quelli che la inibiscono [29]. È interessante notare che la densità di placche senili e di ammassi neurofibrillari in alcune aree corticali è stata correlata con la gravità del decadimento cognitivo[30]. Nelle arteriole e venule meninge e in quelle che attraversano la corteccia cerebrale sono presenti depositi di A β , localizzati nella membrana basale e che si estendono nel tessuto circostante[31], costituiti principalmente da A β [1-40] [32]. Associati ai depositi amiloidei sono riscontrabili cellule della serie monocitomacrofagica che in alcuni casi sembrano precedere la deposizione di A β , facendo ipotizzare per quest'ultima un significato di conseguenza più che di causa; queste considerazioni, cui si aggiunge l'evidenza di cellule microgliali associate alle placche senili, richiamano l'attenzione sul significato delle popolazioni di origine monocitomacrofagica (di cui anche gli elementi microgliali fanno parte) nella genesi ed evoluzione delle lesioni tipiche dell'AD. I depositi amiloidei si interrompono bruscamente quando il vaso passa nella sostanza bianca sottocorticale, ove infatti solo rari vasi presentano i depositi di A β ; l'estensione dell'angiopatia amiloide varia considerevolmente anche tra individui con una quantità di A β parenchimale confrontabile.

1.2.4 Biologia della proteina β -amiloide

La proteina A β deriva dal suo precursore APP a seguito di tagli sequenziali da parte di diversi enzimi. Il termine APP comprende un gruppo eterogeneo di polipeptidi espressi ubiquitariamente nell'organismo, eterogenei sia per la presenza di diverse isoforme (le tre maggiormente rappresentate di 695, 751 e 770 residui) sia per modificazioni post-traduzionali, tra cui glicosilazioni, solfatazioni e fosforilazioni [33,34,35,36]. Le isoforme contenenti 751 e 770 residui sono largamente espresse sia dalle cellule non neuronali che da quelle neuronali, invece l'isoforma contenente 695 residui è espressa in maggiore quantità dai neuroni [37]. La differenza tra le isoforme 770/751 e 695 consiste nella presenza nelle prime due di un esone codificante un enzima inibitore della serina proteasi (KPI); nelle piastrine umane le isoforme contenenti il dominio KPI hanno la funzione di inibitori del fattore XIa, serina proteasi, implicata nella cascata della coagulazione [38].

La APP è una proteina a singolo dominio transmembrana traslocata in sede tradizionale nel reticolo endoplasmico; sia durante che dopo il transito nella via secretoria può andare incontro a tagli sequenziali con la produzione di derivati secreti nel lume vescicolare o nello spazio extracellulare. Il taglio proteolitico

operato dalla α -secretasi[39] porta al rilascio di un grosso frammento solubile (α -APPs) nello spazio extracellulare (o nel lume); residua un frammento transmembranario di 83 residui aminoacidici (C83)[40]. Alternativamente la APP può essere scissa da una β -secretasi, che taglia un frammento solubile di dimensioni ridotte rispetto a quello generato dalla α -secretasi, residuando un frammento transmembranario di 99 residui (C99)[41]. L'enzima che opera l'attività β -secretasica è stato identificato e denominato BACE [42]. L'attività del BACE risulta essere ottimale a pH acido e l'enzima preferenzialmente è attivo all'interno degli endosomi.

Per rispondere a questo requisito è necessario che la APP sia trasportata dalla superficie all'interno della cellula[43]. Il prodotto del BACE può essere in seguito trasferito sulla superficie cellulare dove diventa substrato per la γ -secretasi[44]. L'azione della γ -secretasi sui frammenti transmembranari residuati dall'azione della α e β -secretasi porta al taglio e secrezione di due frammenti proteici: rispettivamente p3 [45] e $A\beta$ (Figura 3).

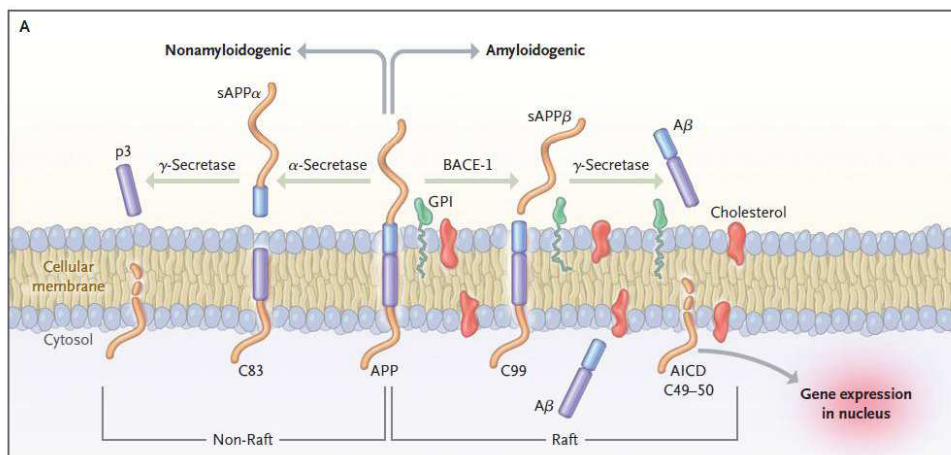


Figura 3. APP e i suoi prodotti proteolitici

Il peptide p3 non si trova generalmente nel "core" delle placche di amiloide, ma va soprattutto ad accumularsi in depositi di amiloide in aree selezionate del cervello di pazienti AD[46].

Il peptide $A\beta$ (che esiste in due isoforme: $A\beta$ [1-40] e $A\beta$ [1-42]) è costitutivamente prodotto e rilasciato dalle cellule in condizioni di normalità[41,45], ed è misurabile nel liquido cefalorachidiano (CSF) e nel plasma di soggetti normali durante tutta la vita. Non è ancora precisamente determinato in quale punto della catena sintetica dell'APP avvenga il taglio enzimatico operato dalla α , β o γ -secretasi; una consistente parte della α -APPs può essere generata dall'azione dell' α -secretasi sulla APP inserita nella membrana plasmatica[47], ma può essere generata anche durante la catena sintetica intracellulare della APP[48]. L'azione della β -secretasi può avvenire, almeno in parte, durante le ultime fasi dei processi sintetici post-traduzionali [45] i siti in cui è operato il taglio dei frammenti C99 e C83 da parte della γ -secretasi sono ancora oggetto di studio.

Sembra che i frammenti A β [1-40] e A β [1-42] siano generati in percentuale considerevole durante l'internalizzazione e la processazione endosomiale dell'APP[43]. Vi sono dati contraddittori sul principale sito di produzione della forma A β [1-42], se durante le prime fasi della catena sintetica intracellulare (cioè il reticolo endoplasmatico, il compartimento intermedio e le prime fasi del Golgi) oppure dopo che la APP abbia raggiunto la superficie cellulare. Alcune evidenze suggeriscono che i peptidi di A β generati precocemente durante le fasi intracellulari non siano destinati alla secrezione e vengano catabolizzati all'interno della cellula[49]. Tuttavia è probabile che la maggior parte dei peptidi di A β siano invece destinati alla via secretoria. I livelli di A β nel CSF umano sono compresi nell'intervallo 3 – 8 Nm[50], mentre la quantità plasmatica è generalmente minore di 500 pM. Sia la forma A β [1-40] che A β [1-42] possono essere identificate nel CSF e nel plasma. È stato dimostrato che i frammenti C99 e C83 (substrati della γ -secretasi) originano da molecole di APP completamente glicosilate[45], suggerendo che l'attività α , β e γ -secretasica avvenga principalmente sulla superficie cellulare o in prossimità di essa, probabilmente in gran parte durante il ricircolo endosomiale[43]. Nella cellula neuronale, che esprime livelli di APP tra i più alti dell'intero organismo (soprattutto APP695), la molecola APP può essere trasportata lungo l'assone sia in senso anterogrado (nella componente veloce del trasporto assonale)[51], sia in senso retrogrado verso il corpo cellulare e essere quindi traslocata sulla superficie somatodendritica[52]. La APP è presente in vescicole nei terminali assonali, anche se non specificamente nelle vescicole sinaptiche. Nonostante sia stato ipotizzato che il terminale assonale sia uno dei siti principali di produzione della A β , non esistono ancora prove definitive al riguardo, essendo tutt'altro che remota la possibilità che la produzione di A β avvenga durante il ricircolo endosomiale in altri siti neuronali. Inoltre, nonostante il neurone esprima abbondantemente la APP e sia in grado di secernere A β in notevole quantità[45], anche altri stipiti cellulari nel tessuto cerebrale esprimono quantità variabili di APP (astrociti, microglia, cellule endoteliali e muscolari lisce) e potrebbero contribuire al processo di secrezione e deposizione della A β . Inoltre, poiché in periferia praticamente tutte le cellule esprimono APP e sono in grado di generare la A β , ed essendo la A β presente nel plasma, non è da escludere la possibilità che quest'ultima sia in grado di superare la barriera ematoencefalica e depositarsi nel tessuto cerebrale. Vi sono evidenze della capacità della A β di superare in piccola quantità la barriera ematoencefalica mediante un meccanismo di endocitosi mediato da recettori[53]. Della A β è stata provata una neurotossicità sia diretta che, soprattutto, indiretta, mediata da numerosi agenti infiammatori dopo attivazione della microglia.

Sono state proposte numerose funzioni per la famiglia di proteine della APP (APP Like proteins: APPLPs) e dei suoi derivati principali (α -APPs): in particolare α -APPs sembra avere proprietà autocrine[54] ed essere in grado di agire come fattore neuroprotettivo e probabilmente anche neurotrofico[55]. Le isoforme di APP con 751 e 770 residui (contenenti il dominioKPI -inibitore della serina proteasi)[56] sono in grado, negli studi in vitro, di inibire enzimi con proprietà serina proteasiche come la tripsina e la chimo tripsina[57]; inoltre inibiscono il fattore IXa nella cascata coagulativa. Le isoforme secrete di APP possono conferire proprietà adesive cellula - cellula e cellula - substrato in coltura[58].

È stato suggerito sulla base dei risultati di studi in vitro che la APP inserita nella membrana plasmatica possa avere un ruolo nelle interazioni cellulari. Non vi sono evidenze che nei soggetti affetti da AD vi sia una perdita di funzione della APP, viceversa sembra più probabile che mutazioni conferiscano alla APP proprietà tossiche, incrementando la produzione del frammento A β , potenzialmente citotossico.

Probabilmente l'accumulo di amiloide è solo il punto di confluenza cui giungono vie patogenetiche diverse. Molte ipotesi sono state formulate: alcune propendono per un'eccessiva produzione di A β , altre per un ridotto catabolismo del precursore che provocherebbe la formazione e l'accumulo di molecole con la spontanea tendenza ad aggregarsi (per ridotta attività degli enzimi del catabolismo o a causa di mutazioni della APP che ne ostacolano il metabolismo). Secondo alcuni autori [59] nei soggetti sani la forma A β [1-42] non si accumulerebbe grazie ad una più rapida clearance. La glicazione della molecola di A β può facilitarne l'aggregazione rendendola più resistente alle proteasi e meno solubile[60]. Anche le mutazioni genetiche identificate non sono dirimenti, in quanto, fatta eccezione per quelle riguardanti il gene per APP sul cromosoma 21 che deporrebbero per un problema qualitativo o quantitativo dell'APP, le altre sembrano essere associate ad un'APP normale.

Studi di genetica molecolare relativi all' APP in forme di AD familiare hanno permesso di dimostrare che qualunque mutazione presente nel gene va ad aumentare la tendenza di A β ad aggregare in vitro[61]. Invece studi molto recenti, condotti su topi transgenici Tg2576 (che esprimono la proteina APP mutata e rappresentano il modello murino dell'AD), hanno messo in evidenza che deficit cognitivi significativi nell'AD sono attribuibili direttamente ad una forma di A β secreta naturalmente[62]. L'ipotesi che questa forma di amiloide solubile possa essere importante nella fase di esordio della patologia è attualmente presa in esame da parecchi gruppi[63] Inoltre in una recente analisi condotta da Postina e colleghi, usando topi transgenici, è stato dimostrato che l' attivazione dell' α -secretasi potrebbe costituire un'ideale opportunità terapeutica che potrebbe ostacolare l'accumulo di A β a livello cerebrale[64]. Infatti dall'azione dell' α -secretasi sull'APP viene liberato un frammento solubile N-terminale (APPs α), che ha proprietà neurotrofiche e neuro protettive[65]. Risulta interessante evidenziare il fatto che è stata sottolineata una evidente riduzione di APPs α nel liquido cerebrospinale di pazienti AD[66].

1.2.5 Neuropatogenesi

La Malattia di Alzheimer è sicuramente una patologia eterogenea dal punto di vista eziopatogenetico e numerosi fattori concorrono al suo sviluppo. Tra questi fattori le alterazioni anatomopatologiche così come il danno infiammatorio giocano sicuramente un ruolo importantissimo[67].

1.2.5.1 Ruolo delle Preseniline

Negli anni '90, mediante studi di linkage, sono stati identificati due geni denominati *PSEN1* e *PSEN2*, le cui mutazioni sono causali delle forme familiari di AD ad esordio precoce, caratterizzate da una trasmissione autosomica dominante. Fino

ad oggi sono state identificate 185 mutazioni in 405 per la *PSEN1* e 13 mutazioni in 22 famiglie per *PSEN2* (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>); tutte mostrano un elevato grado di penetranza e sono state trovate in soggetti che presentano sintomi in età precoce (<< 65 anni). *PSEN1* e *PSEN2* sono localizzati rispettivamente sul cromosoma 14 (14q42.2) e sul cromosoma 1 (1q42.2); in particolare, *PSEN2* è stata identificata per l'elevata omologia (67%) con *PSEN1* [67]. *PSEN1* e *PSEN2* codificano per due proteine integrali di membrana formate rispettivamente da 467 e 448 aminoacidi. La loro struttura tridimensionale è costituita da 6 a 9 possibili domini trans-membranosi (TM) e da un largo loop idrofilico intracellulare tra il sesto (TM-VI) e il settimo (TM-VII) dominio transmembrana; le estremità N- e C-terminale della proteina sono entrambe rivolte verso l'ambiente citoplasmatico [68]. Ancora oggi non si è riusciti a risolvere completamente la struttura delle preseniline. *PSEN1* e *PSEN2* sono proteine espresse in maniera ubiquitaria all'interno dell'organismo; in base ad un meccanismo tessuto-specifico possono differenziare la loro struttura, tramite modificazioni post- trascrizionali e splicing alternativi. La principale forma in cui le preseniline si trovano a livello cellulare e tissutale sembra essere quella frammentata. Infatti, in forma di oloproteina, la presenilina (del peso di circa 44 kDa) va incontro costitutivamente ad endoproteolisi in una sua regione ad α -elica citoplasmatica, in molti tessuti tra cui anche il cervello, generando due frammenti: uno più grande N-terminale e l'altro più piccolo C-terminale, che insieme formano la proteina funzionale. Gli eterodimeri stabili risultanti, svolgono un ruolo chiave nella modulazione del Ca^{2+} intracellulare necessario per il rilascio dei neurotrasmettitori presinaptici [69]. Inoltre, i livelli medi dei frammenti N- e C-terminali sembrano essere rigidamente controllati anche in caso di aumentata espressione del gene *PSEN1* in topi transgenici o in cellule transfettate, infatti la loro quantità non varia significativamente ed il loro eccesso è rapidamente rimosso, soprattutto dai proteosomi [70,71].

Studi effettuati su topi knock-out hanno portato a riconoscere alle preseniline diverse funzioni cellulari. Il primo ruolo è implicato nella segnalazione cellulare mediata da Notch, il quale è un fattore coinvolto nello sviluppo embrionale, nel differenziamento neuronale, nella miogenesi, nella ematopoiesi e nella differenziazione delle cellule T immunitarie. Si è valutato che la crescita di embrioni deficienti in *PSEN1* è severamente ritardata rispetto agli embrioni wt. In contrasto gli embrioni knock-out per *PSEN2* sono vitali, fertili e sviluppano solo delle moderate fibrosi polmonari ed emorragie con l'aumentare dell'età. Sebbene le funzioni e le disfunzioni della *PSEN1* siano state ben studiate, poco si sa ancora sul suo omologo *PSEN2* in vivo; quello è certo è che, seppur in misura minore, anche quest'ultimo è associata allo sviluppo embrionale dei mammiferi mediato da Notch [72]. Il secondo ruolo risiede nel fatto che, sebbene in piccola quantità, le preseniline entrano a far parte di complessi molecolari localizzati in corrispondenza della superficie cellulare, in associazione alla nicastrina [73] e a proteine della famiglia delle caderine [74], entrambe implicate nella adesione cellulare. In particolare la nicastrina è una proteina transmembrana, contenente siti di glicosilazione multipli, che è stata copurificata con le preseniline, poiché è implicata nel loro trasporto dal reticolo endoplasmatico alla superficie cellulare, dove può modulare l'attività del complesso della γ -secretasi.

Il terzo ruolo è associato al processamento dell'*APP* [75,76]. Utilizzando neuroni

ottenuti da topi knock-out si è dimostrato che la *PSEN1* costituisce una parte essenziale dell'attività proteolitica della γ -secretasi che taglia il precursore dell'amiloide. Infatti, mutazioni puntiformi sono associate ad un aumento selettivo del peptide A β (1-42), tossico per la cellula. Al contrario, in topi knock-out per la *PSEN2*, l'assenza sembra non provocare variazioni evidenti nel processamento dell'*APP*. Questi risultati indicano perciò che non è tanto l'assenza dei geni in analisi a provocare un danno, bensì sono le mutazioni causali (soprattutto nella *PSEN1* ma anche nella *PSEN2*) ad essere associate a malattia, poiché provocano una "gain of abnormal function" delle proteine da essi codificate [72].

Nei decenni scorsi si è dibattuto molto sul reale ruolo svolto dalla famiglia delle preseniline nel complesso della γ -secretasi. Venivano proposte due ipotesi differenti: la prima, basandosi sulla capacità delle preseniline e *APP* di coprecipitare, suggeriva che queste facessero parte del complesso catalitico presumibilmente come cofattori [77]; la seconda invece rifiutava il ruolo attivo delle preseniline e supponeva che avessero solo un ruolo nel traffico di membrana di alcune proteine, inclusi i componenti della reazione della γ -secretasi [78,79].

Ad oggi sembra ormai evidente che l'ipotesi corretta sia quella per cui la presenilina non solo abbia un ruolo centrale, ma che sia essa stessa a coincidere con il complesso della γ -secretasi, il quale altro non è che una proteasi intramembrana attivata mediante autoproteolisi sui residui conservati di aspartato propri della presenilina.

In particolare la secretasi costituisce un complesso multiproteico formato da altri tre elementi oltre la presenilina, quali la NTC, la Aph-1 e PEN-2, in modo da consentire un'efficiente attività di trasporto nonché di proteolisi al complesso enzimatico stesso [72,80] (Figura 4). Un recente lavoro di Spasic e collaboratori [81] fornisce una forte evidenza per cui la *PSEN1* presenta una struttura a nove tratti trans-membrana. In dettaglio, a seguito della sua scissione, la presenilina si unisce al complesso della secretasi, prima che quest'ultima si sia inserita nella membrana plasmatica.

Studi di knockout e knockdown condotti sugli organismi modello hanno dimostrato che tutti e quattro i componenti del complesso risultano importanti per l'attività enzimatica [80,82,83]. Tramite i recenti studi, innumerevoli progressi sono stati ottenuti sulla conoscenza della struttura, funzione, regolazione e assemblamento dei differenti componenti della γ -secretasi, ma non si conosce ancora abbastanza sul loro esatto ruolo nel legare i substrati e sulla cinetica di proteolisi, mediata dai differenti componenti del complesso enzimatico [72].

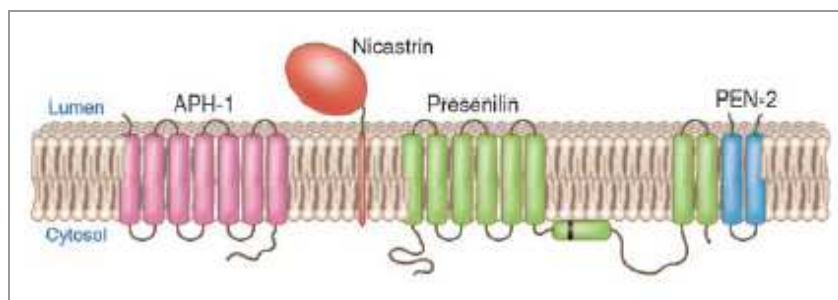


Figura 4. Complesso delle preseniline

1.2.5.2 Ruolo della proteina tau

La proteina tau è presente in tutte le cellule dell'organismo e il suo ruolo fondamentale è quello di legare e stabilizzare i microtubuli a livello del citoscheletro (Figura 5). La proteina tau esiste in 6 isoforme diverse composte da 352-441 aminoacidi. Il gene che codifica per tau (*MAPT*) è localizzato sul cromosoma 17 e comprende 16 esoni. Lo splicing alternativo a livello degli esoni 2,3 e 10 genera sei diverse isoforme di tau all'interno della cellula. La forma di tau patologica è abnormemente fosforilata e tale fenomeno comporterebbe una perdita della normale funzione di tale proteina, cioè si arriverebbe a una riduzione della capacità di assemblare i microtubuli. Recentemente topi transgenici portatori di mutazioni nei geni *APP*, *PSEN1* e *MAPT* avrebbero sviluppato una forma di AD molto aggressiva con la formazione di elevati livelli di grovigli neurofibrillari.

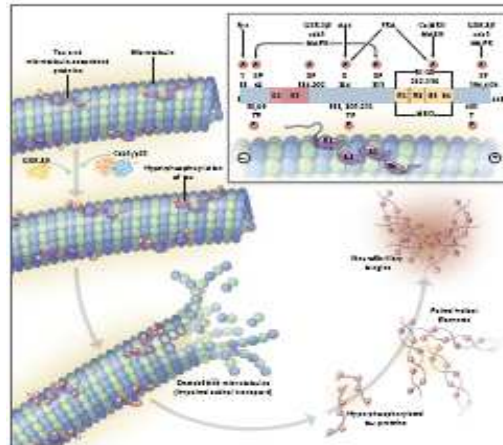


Figura 5. Struttura e funzione di tau

Un numero elevato di PDPKs, tra cui la GSK-3B e la Cdk5, potrebbero essere coinvolte nella fosforilazione in vivo della proteina tau ed essere quindi associate alla produzione di grovigli neurofibrillari nell'AD. l'equilibrio tra fosforilazione da parte delle chinasi e defosforilazione da parte di fosfatasi sembra essere cruciale. Infatti nei cervelli affetti da Ad vi è una riduzione dell'attività di fosfatasi; in particolare la fosfatasi PP-2A è ridotta del 20%-30% nell'AD. Anche l'attività di Pin1, un enzima capace di regolare le funzioni di tau e il processamento di APP, sembra essere ridotta in cervelli di soggetti affetti da AD.

Le diverse isoforme fisiologiche determinano la generazione di due diverse isoforme di tau iper-fosforilata, denominate 4R e 3R. Diverse patologie neurodegenerative mostrano differenti rapporti tra 4R tau e 3R tau, per esempio nella patologia di Alzheimer osserviamo una distribuzione più o meno equivalente tra livelli di 4R tau e 3R tau, nella degenerazione corticobasale e nella paralisi sopranucleare progressiva si osserva, invece, una prevalenza della forma 4R [84].

1.2.5.3 Ruolo dell'infiammazione

Le evidenze che, al quadro della malattia di Alzheimer, contribuisca in misura

importante una distruzione dei neuroni sono ormai ampie e ben documentate. Il danno a carico della cellula neuronale è mediato dall'attivazione del sistema immunitario dell'ospite, senza tuttavia un coinvolgimento quantitativamente significativo della componente anticorpale o della attivazione dei linfociti T e B che classicamente accompagnano la risposta immunitaria specifica[85]. È quindi improprio parlare di autoimmunità, concetto che presuppone una risposta immune umorale o cellulomediata specifica. Si può invece definire questa risposta dell'organismo "autotossica", mediata dai meccanismi immunitari innati, aspecifici, che non richiedono l'attivazione e la espansione di cloni linfocitari né il riconoscimento di determinanti che siano bersaglio della risposta immune. Se l'attivazione di questo sistema avviene nei confronti di strutture dell'organismo, il quadro finale può essere simile a quello della risposta autoimmunitaria, sebbene il percorso patogenetico sia radicalmente differente[86]. Quando si parla di tessuto nervoso anche il concetto di infiammazione va ridefinito e analizzato nello specifico: infatti la mancata risposta vascolare, la presenza della barriera ematoencefalica e l'assenza di fibre nocicettive all'interno del cervello non permettono lo svilupparsi dei segni classici dell'infiammazione. Il ruolo del processo infiammatorio nella patogenesi dell'AD è testimoniato dal riscontro che la microglia presente nelle placche senili contiene una proteina associata all'infiammazione l'HLA-DR, proteina del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. Numerosi altri mediatori della flogosi sono stati riscontrati in associazione con la placca: tra questi anche l'interleukina-1 β (IL-1 β), l'interleukina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α)[87]. Ulteriori dati sono stati forniti da evidenze epidemiologiche e studi retrospettivi che ipotizzano un effetto protettivo della terapia antinfiammatoria non ancora confermato in studi clinici[88]. Poiché la maggior parte delle molecole infiammatorie non sono in grado di superare la barriera ematoencefalica, la loro presenza all'interno del tessuto nervoso implica che questo sia in grado di produrle: infatti le proteine infiammatorie nel SNC originano principalmente dalla microglia e dalla astroglia attivate(Figura 6).

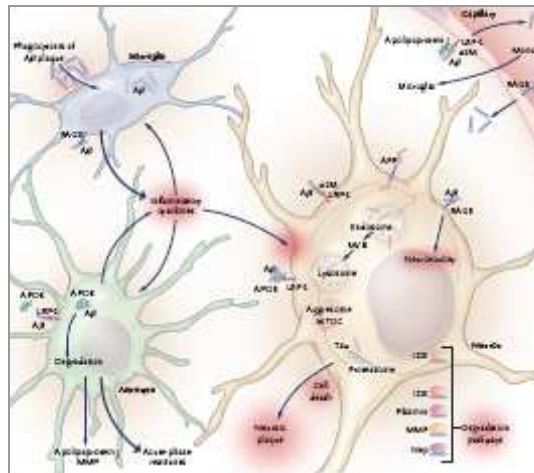


Figura 6: ruolo della microglia e dei processi infiammatori

La lista dei mediatori che intervengono durante il processo autotossico nel tessuto cerebrale è ampia e comprende le proteine del complemento e i loro inibitori, le citochine infiammatorie e i rispettivi recettori, i componenti della via della coagulazione e una serie di proteasi e inibitori specifici.

La A β è in grado di attivare la cascata del complemento, supportando l'idea che nella malattia di Alzheimer la componente infiammatoria potrebbe essere una reazione aspecifica indipendente da una reazione immunitaria mirata e che potrebbe essere una risposta alle alterazioni neuropatologiche presenti, eventualmente facilitandone la progressione.

L'affinità del C1q per la A β è massima quando questa si trova conformata a foglietto β . Il complesso C1q - A β è inoltre più facilmente aggregabile, ed è in grado di avviare la nucleazione delle fibrille di amiloide a loro volta capaci di attivare il complemento: è quindi anche possibile che il processo patologico sia in grado di autoamplificarsi. Anche il complemento è fortemente implicato nella distruzione neuronale. Nei soggetti AD si possono in effetti evidenziare frammenti del complemento in forma attivata a livello della placca senile e in associazione alla membrana dei neuriti distrofici è stata addirittura osservata la presenza del complesso di attacco[89]. L'azione litica del complemento è modulata da una serie di inibitori, tra cui la vitronectina, la clusterina e il CD59. Una deregolazione di queste molecole potrebbe contribuire alla patogenesi dell'AD. In particolare è stato osservato che la A β è in grado di inibire l'espressione del CD59 e che nella corteccia frontale e nell'ippocampo di soggetti AD i livelli di quest'ultimo sono ridotti. In coltura la lisi di cellule neuronali mediata dal complemento è inversamente proporzionale alla capacità del neurone di produrre CD59.

La microglia, la astroglia e anche gli stessi neuroni sono in grado di secernere in condizioni di normalità interleuchine in piccola quantità, ma quando la microglia è attivata, per esempio dopo un trauma o in seguito a stress ossidativo, è in grado di produrre elevate quantità di IL-1 β e TNF- α . In seguito la IL-1 β e il TNF- α inducono la espressione di svariate proteine da parte degli astrociti, come la GFAP, la ApoE, la sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS), la α 1-antichimotripsina, IL-6, IL-1 β e TNF- α [90]. La IL-1 α , la IL-1 β , la IL-6 e il TNF- α sono tra le più potenti interleuchine proinfiammatorie, e sono presenti in aumentata quantità nel cervello di soggetti AD.

La famiglia della IL-1 è composta da tre molecole: IL-1 α , IL-1 β e l'antagonista del recettore dell'IL1 (IL-1RA), il quale funziona come fisiologico inibitore della IL-1. Dai risultati di alcuni studi longitudinali che hanno valutato nel tempo un campione di soggetti sani, in quelli che in seguito hanno sviluppato AD, si può riscontrare, nelle sedi tipiche delle lesioni, una notevole espressione di cellule microgliali attivate e secernenti IL-1 α , che testimoniano il ruolo di questo mediatore nelle fasi iniziali della patologia. Apparentemente l'attivazione delle cellule microgliali da parte della A β sarebbe sufficiente a stimolare la produzione di IL-1 e di numerose altre citochine[91]. La IL-1 svolge numerose attività nell'organismo e nel SNC alcune delle quali potrebbero essere implicate nella patogenesi dell'AD: promuove la sintesi e processazione della APP [92] nei neuroni e nelle cellule gliali, incrementando la produzione di A β , aumenta l'espressione e l'attività delle acetilcolinesterasi (AChE), spiegando forse in parte il deficit di questo neurotrasmettitore, stimola come fattore autocrino la produzione di IL-1 da parte

delle cellule microgliali e agisce sugli astrociti attivandoli e promuovendo l'espressione di α 1-antichimotripsina. Essa inoltre incrementa l'espressione da parte degli astrociti della S100B, una citochina neurotrofica e gliotrofica, che stimola la crescita neuritica ed aumenta i livelli intracellulari di calcio e l'espressione di APP[93]. Tale molecola è anche in grado di stimolare la nitrossidosintetasi astrogliale, con produzione di NO, radicale libero dell'ossigeno potenzialmente neurotossico. L'aumentata espressione di IL-1 potrebbe dunque spiegare molte delle alterazioni che si osservano durante la degenerazione neuronale, quali l'aumentata crescita dei neuriti distrofici, la sovraespressione della APP e i meccanismi citotossici come l'eccessiva presenza di calcio intracellulare e i livelli tissutali aumentati di ossido nitrico. La conseguenza di questa cascata è un'aumentata produzione di A β , che a sua volta può stimolare la produzione di interleuchine da parte della microglia[91]. IL-6 è una citochina coinvolta in molti processi cellulari, va a mediare la risposta immunitaria e le reazioni infiammatorie relative alla crescita cellulare e alla differenziazione nel sistema nervoso centrale. Queste funzioni sono possibili grazie ad interazioni con specifici recettori, solubili o di membrana, che sono in grado di andare a costituire il complesso IL-6–recettore (IL-6RC) biologicamente attivo.

Un innalzamento acuto della IL-6 sembra essere neuroprotettivo, mentre livelli aumentati cronicamente sarebbero lesivi: infatti la IL-6 è in grado di indurre gliosi, stimolare la sintesi di fattori del complemento, delle proteasi, delle prostaglandine (PG) e delle proteine di fase acuta di classe II, contribuendo ad amplificare la risposta infiammatoria con ulteriore deposizione di A β e relativa lesione neuronale.

L'interferon γ (IFN γ), prodotto dai linfociti T attivati, è in grado di amplificare notevolmente la risposta della microglia. In quest'ottica le lesioni tipiche dell'AD potrebbero quindi anche derivare, almeno parzialmente, da un'aumentata espressione di IFN γ , che stimolando la microglia come la A β agirebbe in modo ad essa sinergico sia stimolando la produzione di TNF α , che inducendo l'accumulo di NO e di intermedi azotati neurotossici. A sua volta il TNF α può stimolare, come fattore autocrino, la microglia, innescando un processo capace di autoalimentarsi. Quindi in tutti questi processi risulta fondamentale il ruolo della microglia, in assenza della quale i danni cellulari non sembrano verificarsi.

Le prostaglandine sono acidi grassi insaturi a lunga catena, con molteplici funzioni nell'organismo, tra cui la mediazione dei processi infiammatori. Esse derivano dall'acido arachidonico mediante l'azione degli enzimi COX-1 e COX-2 (Cicloossigenasi: COX). La COX-1 è espressa costitutivamente dalla maggioranza dei tessuti e nel SNC si trova espressa soprattutto dalla microglia. La COX-2 è un enzima poco espresso dai tessuti umani, ma può essere facilmente indotto da stimoli infiammatori, come IL-1. Nel SNC è espressa prevalentemente dai neuroni ed ha un ruolo nell'infiammazione nell'intero organismo, nonché una funzione protettiva per svariati tessuti, tra cui quello renale e verosimilmente anche quello nervoso: è quindi possibile che la COX-2 sia coinvolta solo in minima parte nei processi degenerativi all'interno del SNC, il che spiegherebbe il fallimento dei tentativi di trattamento con inibitori selettivi della COX-2. Anche gli steroidi sembrano, secondo alcuni studi, non essere efficaci, e anzi, possono essere lesivi per il neurone, mentre altri lavori riportano risultati contrastanti[88].

interessante evidenziare che numerosi studi epidemiologici suggeriscono un ruolo protettivo dal rischio di sviluppare l'AD è rappresentato dalle terapie antinfiammatorie croniche assunte per altre patologie, che confermerebbero la possibilità di intervenire sulla patogenesi della malattia interferendo con quei meccanismi infiammatori che mediano il danno cellulare e tissutale e che verosimilmente sono capaci di amplificare la neurodegenerazione, anche stimolando la produzione e la deposizione di A β [94].

1.2.5.4 Ruolo dello stress ossidativo

Tra i fattori genetici solo l'allele ϵ 4 del gene dell'Apolipoproteina E (ApoE) è stato dimostrato rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza dell'AD sporadico [95], comunque si stanno studiando altri geni che possono aumentare la suscettibilità di sviluppo alla patologia. Molti di questi sono coinvolti nel processo dello stress ossidativo, che risulta giocare un ruolo rilevante nell'eziopatogenesi dell'AD. Lo stress ossidativo è causato da uno squilibrio tra i livelli di antiossidanti e le concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno[96]. I depositi di β amiloide (A β) nel cervello di pazienti AD comporta la produzione di radicali superossido, che, combinati con l'ossido nitrico (NO), formano perossinitrito che a sua volta, induce la morte cellulare. Lo stress ossidativo può insorgere per svariate ragioni: per un inadeguato apporto di antiossidanti dovuto ad una dieta sbagliata, per l'azione di tossine presenti nel corpo a causa di agenti esterni, quali l'inquinamento ambientale o il fumo da sigaretta, o per un'attivazione inappropriata di fagociti, che si può verificare in caso di infiammazione cronica [96]. Le cellule sotto stress ossidativo perdono la loro capacità di funzionare a causa di modificazioni dovute alle specie reattive dell'ossigeno a carico dei lipidi, delle proteine e del DNA. Ad esempio, l'anione radicalico superossido e il perossido di idrogeno, rilasciati da cellule fagocitiche, possono interagire con metalli di transizione e produrre quantità elevate di radicali idrossilici altamente reattivi, comportando modificazioni alle proteine, formando lipidi saturi e acidi grassi poliinsaturi e causando un esteso danno tissutale[97]. Dal momento che lo stress ossidativo può comportare un declino funzionale, è di conseguenza importante stimare il significato dello stress ossidativo nel processo patologico. Si è iniziato a considerare lo stress ossidativo come un fattore implicato nell'eziopatogenesi dell'AD nel 1986 [98]; da allora molte altre indagini sono state condotte al riguardo, in vari stadi ed in vari processi della patologia[99,100]. Dal 1992, numerose analisi hanno permesso di stabilire che alti livelli di stress ossidativo sono presenti nei neuroni morti nei cervelli di pazienti AD[101,102]. Molti studi hanno anche permesso di evidenziare che le placche di amiloide sono un centro focale di ossidazione cellulare e molecolare[103]. Nei casi di AD con una implicazione genetica, l'inferiore capacità di difesa contro i radicali liberi che si verifica con l'avanzamento dell'età, sembra essere ulteriormente compromessa, probabilmente a causa di fonti addizionali di radicali liberi che risultano dalla suscettibilità genetica e/o dalla presenza di mutazioni nei geni dell'APP e PS1[101]. Parecchi studi hanno dimostrato che il peptide A β esiste in due isoforme: A β [1-40] e A β [1-42]. L' A β [1-40] è decisamente più solubile rispetto all'A β 1-42, che, quindi, tende a formare aggregati, originando placche di amiloide. Il peptide A β riveste un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione dell'AD

ed è stato dimostrato che conferisce neurotossicità, inducendo la produzione di radicali liberi. E' stato dimostrato che Aβ causa l'accumulo di perossido di idrogeno (H₂O₂) in colture di neuroni ippocampali [55] e induce la perossidazione lipidica ed inoltre può causare un'eccessiva produzione di radicali superossido per interazione con cellule vascolari endoteliali [104]. Questi studi vanno a supportare la teoria che lo stress ossidativo vada ad incidere sul processo di amiloidogenesi. Un aumento di produzione di β-amiloide può contribuire ad una produzione a ciclo continuo di stress ossidativo (Figura7).

Il cervello ha un'elevata attività metabolica che è alimentata dal glucosio. Studi specifici hanno permesso di evidenziare la presenza di anormali bassi livelli di proteine trasportatrici di glucosio nei cervelli di pazienti AD[105] e questo fatto sembra essere una conseguenza della perossidazione lipidica[106].

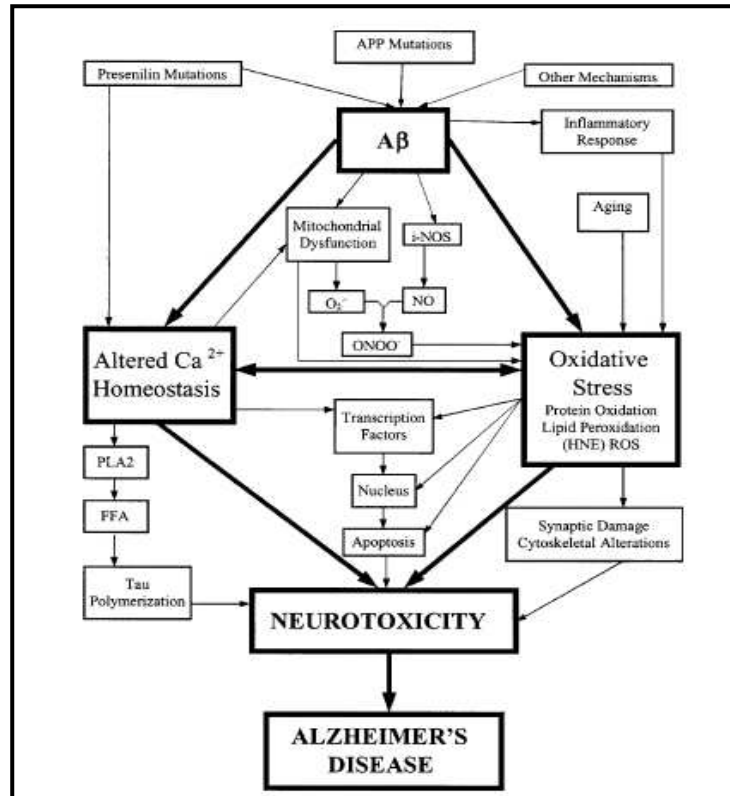


Figura 7: Modello schematico del ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi della AD

I livelli di β-amiloide risultano aumentati in funzione dell'avanzamento dell'età, della dieta, dei livelli ormonali e della componente genetica. Tutti questi parametri vanno ad incidere sulla formazione di radicali liberi e sull'aumento di molecole infiammatorie, comportando un incremento nella produzione di APP e dei livelli di β-amiloide. Si viene così a creare un circolo vizioso di stress ossidativo e di

produzione di A β .

I mitocondri sono le centrali energetiche delle cellule, comprese quelle nervose, in quanto producono l'energia necessaria allo svolgimento delle proprie funzioni. Tali organelli sono molto suscettibili al danno indotto da radicali liberi, che sono continuamente prodotti dalla catena respiratoria[107]. Disfunzioni a livello mitocondriale possono comportare necrosi e apoptosi cellulare[108]. Recenti analisi morfometriche di biopsie cerebrali, specialmente di pazienti AD, hanno dimostrato una notevole riduzione del numero di mitocondri e un aumento del contenuto citoplasmatico di DNA mitocondriale nei neuroni contenenti un alto livello di composti ossidati, supportando la teoria nell'eziopatogenesi dell'AD sono presenti anomalie mitocondriali[109].

L'attivazione infiammatoria di microglia ed astrociti evidenziata attorno alle placche di β -amiloide e la conseguente aumentata espressione di citochine e chemochine, consente di affermare che il fattore preponderante nella patogenesi dell'AD è rappresentato dall'infiammazione. Il rischio di sviluppare la patologia può aumentare nel caso in cui determinati soggetti siano portatori di polimorfismi o mutazioni in geni-chiave[110]. Recenti studi hanno permesso di collegare l'infiammazione con un'aumentata produzione di radicali liberi e stress ossidativo [111].

Tutti i fattori qui discussi, quali appunto l'incremento di produzione di β -amiloide, il ridotto metabolismo del glucosio, il danno mitocondriale e l'infiammazione, causati da una produzione eccessiva di radicali liberi e dallo stress ossidativo, rappresentano una delle cause principali di neurodegenerazione nell'AD.

Dal momento che è stato testato sperimentalmente che la restrizione calorica, l'esercizio fisico e l'attività intellettuale promuovono la sopravvivenza neuronale, abbinando un apporto equilibrato di antiossidanti naturali (come vitamine C ed E, beta-carotene e melatonina) si potrebbe costituire una delle strategie più efficaci per la prevenzione dell'AD[112].

1.2.6 Aspetti biochimici

Il sistema colinergico è particolarmente colpito sia nell'invecchiamento normale sia nel processo patologico sottostante la malattia di Alzheimer. Nell'ippocampo e nella neocorteccia di pazienti con AD vi è, infatti, una marcata riduzione sia della colinoacetil-transferasi (ChAT) che dell'acetilcolina. La maggior parte dell'attività della ChAT della neocorteccia si riscontra nelle terminazioni presinaptiche del sistema ascendente originante dal nucleo basale di Meynert, i cui neuroni colinergici ricevono afferenze dall'ipotalamo, dall'amigdala, dal nucleo peripeduncolare, dal mesencefalo e dai nuclei del tronco encefalico. Essi proiettano a loro volta alla neocortex, alla corteccia entorinale, all'amigdala, all'ippocampo, al bulbo olfattivo, al talamo, all'ipotalamo e al tronco encefalico. Inizialmente, la riduzione dell'attività colinergica è stata attribuita a perdita neuronale a carico del nucleo basale di Meynert e correlata con la presenza delle alterazioni istopatologiche dell'AD. Tale ipotesi è stata poi ridimensionata, in seguito al riscontro di una riduzione dell'attività della ChAT anche in zone prive d'alterazioni istopatologiche tipiche, come il nucleo caudato, dove non si riscontrano, infatti, né placche senili né ammassi neurofibrillari. In antitesi alla alla

stessa ipotesi è anche l'evidenza che, non raramente, in pazienti AD manca la degenerazione del nucleo di Meynert, e che i deficit colinergici divengono apparenti relativamente tardi nel corso della patologia [113]. La specificità stessa delle alterazioni delle proiezioni colinergiche corticali a partenza dal nucleo basale è stata messa in discussione da alcuni autori. Inoltre, è possibile dimostrare nel cervello dei soggetti colpiti da AD una perdita anche di neuroni monoaminergici e delle funzioni noradrenergiche, GABAergiche, glutamatergiche e serotoninergiche. A carico della corteccia colpita inoltre è riscontrabile una marcata riduzione della concentrazione di numerosi neurotrasmettitori neuropeptidici quali la sostanza P, la colecistochinina e la somatostatina; tuttavia ancora non è chiaro quale delle sopra elencate anomalie (comprese quelle a carico del sistema colinergico) sia primaria o secondaria alla perdita neuronale, che è stato osservato, risulta essere così eterogenea.

1.2.7 Genetica dell'AD

L'AD si può presentare in diverse forme; si distinguono infatti le forme familiari e quelle sporadiche. Negli ultimi decenni è diventato sempre più evidente che l'AD può essere considerata come una patologia genetica, riscontrata in molte famiglie, nelle quali viene trasmessa di generazione in generazione in maniera autosomica dominante. Numerosi studi hanno documentato un aumento significativo del rischio di sviluppare l'AD, apparentemente sporadico, tra i congiunti di primo grado dei pazienti affetti. Nonostante quanto detto, si calcola che in una percentuale non superiore al 5-7% dei casi, si osserva un pattern ereditario per cui le forme genetiche rappresentano una minoranza nel panorama medico.

E' doveroso aggiungere che dal punto di vista fenotipico le forme familiari FAD e i casi sporadici SAD, sono molto simili e spesso indistinguibili tra loro, se non per l'età d'esordio che risulta più ravvicinato nel tempo nelle forme autosomiche dominanti conosciute.

1.2.7.1 AD familiare (FAD)

Nelle forme FAD (circa il 7-10% dei casi) più persone della stessa famiglia vengono colpite dalla malattia, per cui risultano presenti più portatori. In questo caso, il pattern di trasmissione della patologia è di tipo autosomico dominante. Benché l'AD sia tipicamente una patologia tardiva legata all'invecchiamento vi sono casi ad insorgenza precoce. Questo ha permesso di suddividere la malattia in forme ad esordio precoce e quelle ad esordio tardivo. In particolare, la forma precoce familiare EOAD si manifesta nei casi di malattia che si verificano prima dei 65 anni e costituiscono circa 1% dei casi totali [114]. Al contrario, la forma tardiva familiare LOAD, si diagnostica nelle famiglie con più casi di malattia che però si manifestano dopo i 65 anni. E' noto dalla letteratura che le forme autosomiche dominanti di AD sono causate da mutazioni in diversi geni candidati, come *APP* [115], *PSEN1* [116] e *PSEN2* [117].

Il gene che codifica per la proteina precursore dell'amiloide è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 (21q21.22) e codifica per la proteina transmembrana che viene processata, dando origine ai frammenti A β . Nel 1991 è stata descritta la prima mutazione missenso a livello di questo gene [115] e da

allora, sono state descritte 32 differenti mutazioni in 89 famiglie. Tutte queste mutazioni determinano una sostituzione aminoacidica a livello di ipotetici siti di clivaggio per le secretasi, alterando così il processamento e favorendo la netta prevalenza di prodotti amiloidogenetici tossici [118]. Un'altra possibilità secondo cui alterazioni nella *APP* predispongono allo sviluppo di AD riguarda la sua overespressione, come di fatto si verifica nella Trisomia 21. In questi pazienti si presentano infatti, sin dalla giovane età, depositi di soli peptidi A β 1-42 e solo verso la fine della terza decade di vita iniziano ad associarsi anche: accumuli di A β 1-40, microgliosi, astrocitosi, neuriti distrofiche e ammassi neurofibrillari. Sono proprio le lesioni tipiche dell'AD che in questi soggetti spesso si mettono in relazione con la perdita progressiva delle funzioni cognitive e ad alterazioni comportamentali a partire dalla quarta decade di vita [119]. Sebbene sia difficile dimostrare che le alterazioni neuropatologiche nei soggetti con Trisomia 21, siano da attribuire specificamente alla duplicazione del gene *APP* e non ad altri loci sul cromosoma 21 che comunque resta sovranumerario, indizi sono forniti da casi di traslocazione di questo cromosoma che portano alla non duplicazione del gene *APP*: tale condizione genetica pur producendo un fenotipo compatibile con Sindrome di Down, non porta alle alterazioni neuropatologiche e comportamentali tipiche dell'AD.

Nel 2009 si è scoperta la prima mutazione (A763V) nel gene *APP*, in grado di causare la patologia solo nello stato di omozigosi, mentre i portatori eterozigoti risultano non affetti da FAD, suggerendo un'eredità mendeliana anche di tipo recessivo. Tale mutazione è in grado di influenzare il processamento di *APP*, che porta ad un'aumentata produzione della proteina A β ed alla formazione di fibrille di amiloide in vitro [120].

Gli altri due geni implicati nelle forme autosomiche dominanti di malattia sono *PSEN1* (14q24.3) e *PSEN2* (1q31-q42). Come detto, le preseniline costituiscono componenti fondamentali della γ -secretasi e loro mutazioni sembrerebbero in grado di sbilanciare la via enzimatica di *APP* in senso amiloidogenetico. Fino ad oggi sono state descritte 185 mutazioni in 405 per la *PSEN1* e 13 mutazioni in 22 famiglie per *PSEN2* (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>); tutte mostrano un elevato grado di penetranza e generalmente le mutazioni che colpiscono la *PSEN1* provocano le forme più aggressive di AD. La maggior parte delle mutazioni che colpiscono questi geni sono missenso e provocano una sostituzione aminoacidica più o meno grave a livello della proteina; solo raramente si tratta di delezioni di singole basi. La conseguenza patogenetica di queste mutazioni porta verosimilmente ad un guadagno di funzione che coinvolge la subunità proteasica dell'enzima γ -secretasi, che a sua volta si ripercuote sul rapporto fisiologico tra A β 1-42 e A β 1-40. In particolare si determina un aumento dei frammenti tossici A β 1-42, i cui livelli raddoppiano sia nel plasma che nel medium di coltura di fibroblasti di pazienti affetti [78, 121-124].

La maggior parte dei pazienti portatori di mutazioni a livello di uno di questi due geni sviluppano precocemente (età media 50 anni) una forma di AD fenotipicamente indistinguibile dai casi sporadici.

1.2.7.2 AD Sporadico (SAD)

Le forme SAD sono la maggioranza (circa il 90%): tutti i casi di malattia che non presentano familiarità, vengono considerati come sporadici, per cui la malattia colpisce un solo membro di una famiglia e l'esordio avviene tra i 65-70 anni. La SAD riconosce un'eziologia multifattoriale in cui giocano un ruolo importante, oltre che assetti genetici predisponenti o fattori di suscettibilità, anche fattori non genetici, al momento non completamente identificati, tra cui: il basso tasso di scolarità, il trauma cerebrale, le malattie cardiovascolari, gli alti livelli di colesterolo e il fumo. Nessuno di questi tuttavia si è dimostrato essere il fattore causale della patologia. L'unico fattore di rischio accertato è l'invecchiamento, anche se la probabilità di sviluppare AD oltre i 95 anni di età risulta essere molto bassa.

Fra i fattori genetici predisponenti, diversi geni candidati sono stati proposti. Ad oggi, il fattore di rischio più noto è rappresentato dall'allele $\epsilon 4$ del gene *ApoE*. Tale gene normalmente codifica per una proteina coinvolta nel trasporto del colesterolo, poiché è capace di interagire coi recettori epatici (recettori LDL), ma anche nella sintesi di vari tipi di lipoproteine in una grande varietà di tessuti [95]. Più recentemente il gene *ApoE* è stato descritto anche come fattore associabile alle forme di Alzheimer sporadico in gran parte della popolazione. Il locus dell'*ApoE* è situato sul cromosoma 19 ed è un gene polimorfico che esiste, cioè, nella popolazione in tre differenti forme o alleli denominati rispettivamente $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$; ogni individuo ha due copie del gene, quindi vi possono essere diverse combinazioni, ognuna delle quali influenza in modo diverso la predisposizione dell'individuo all'AD.

La relazione AD ed *ApoE* è stata confermata da più di 100 studi condotti in differenti gruppi di popolazioni. In particolare viene riconosciuto nel mondo scientifico che l'allele $\epsilon 4$ si presenta con una frequenza maggiore nei soggetti con AD, rispetto alla popolazione generale; inoltre è associato con un aumentato rischio di sviluppare la malattia nonché con una più precoce età d'insorgenza, rispetto ai soggetti che invece presentano gli alleli $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$ [125,126]. Altre evidenze riconoscono infatti nell'allele $\epsilon 2$ un fattore protettivo per l'AD [125]. Studi longitudinali svolti sulla popolazione caucasica hanno dimostrato che portatori eterozigoti di $\epsilon 4$ hanno un rischio doppio di sviluppare SAD, rispetto alla popolazione non portatrice. La condizione di omozigosi per $\epsilon 4$ sarebbe, addirittura, associata ad un rischio circa 5 volte maggiore e ad un esordio precoce di malattia.

Nonostante quanto evidenziato sin qui, è doveroso sottolineare che il genotipo per *ApoE* non è da considerarsi come una caratteristica predittiva, né tantomeno un metodo di diagnosi per l'AD: indica importante, oltre che assetti genetici predisponenti o fattori di suscettibilità, anche fattori non genetici, al momento non completamente identificati, tra cui: il basso tasso di scolarità, il trauma cerebrale, le malattie cardiovascolari, gli alti livelli di colesterolo e il fumo. Nessuno di questi tuttavia si è dimostrato essere il fattore causale della patologia. L'unico fattore di rischio accertato è l'invecchiamento, anche se la probabilità di sviluppare AD oltre i 95 anni di età risulta essere molto bassa.

E' importante comunque ricordare che i dati inerenti ai geni sui quali è stata evidenziata un'eventuale predisposizione, possono essere applicati come supporto in diagnosi differenziali. Per cui ad una persona che presenta segni di demenza, è

più probabile che venga diagnosticato correttamente l'AD se ci sono alti fattori di suscettibilità per il morbo stesso, come l'averne genotipo *ApoE* $\epsilon 4/\epsilon 4$.

Dalle conoscenze acquisite sino ad ora, è chiaro che il gene *ApoE* risulta in stretta associazione con i depositi di $A\beta$ nel tessuto cerebrale di pazienti portatori dell'allele $\epsilon 4$. Il meccanismo mediante il quale questo allele favorisce un'aumentata produzione di amiloide non è facile da riconoscere; non esistono evidenze provate su cellule, che l'espressione di $\epsilon 4$ rispetto a $\epsilon 3$ o $\epsilon 2$ provochi un significativo aumento della produzione di $A\beta$, invece sembra che *ApoE* $\epsilon 4$ sia in grado di aumentare i livelli medi dei peptidi $A\beta$ nel tessuto cerebrale, presumibilmente riducendone la clearance dal tessuto stesso. Ciò designa l'allele $\epsilon 4$ come marcatore di suscettibilità che agendo sinergicamente con altri fattori genetici o ambientali, è in grado di incrementare il rischio d'insorgenza della patologia.

Diversi studi di associazione di tipo genome-wide (GWAS: Genome- Wide Association Studies) di recente pubblicazione, hanno evidenziato la presenza di altri possibili loci di suscettibilità che potrebbero indurre l'insorgenza dell'AD, tra cui ad esempio i cromosomi 9,10 e 12 [127,128]. Questi tipi di studio sono basati sull'analisi di Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) presenti nell'intero genoma, ovvero di quelle sequenze di DNA che variano da individuo ad individuo e che si pensano responsabili della suscettibilità individuale a manifestare determinate malattie. Molti di questi studi si sono focalizzati su geni codificanti per molecole infiammatorie (citochine e chemochine) o coinvolte nei meccanismi di stress ossidativo, entrambi considerati i maggiori protagonisti della patogenesi dell'AD. Le varianti alleliche più rilevanti sono state individuate in particolari geni tra cui : *CLU*, *PICALM* (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) e *CR1* (fattori 3b/4b del complemento) ed altri indicati nella tabella seguente (Tabella 1).

GENE	CROMOSOMA	ASSOCIAZIONE
APP	21.q21	familiare
PSEN1	14q.24.3	familiare
PSEN2	1q.31-q42	familiare
ApoE	19q13.32	sporadico
IL-1 α	2q14-q21	sporadico
IL-1 β	2q14-q21	sporadico
IL-1R	2q14-q21	sporadico
IL-6	7p21	sporadico
TNF- α	6p21,3	sporadico
MCP-1	17q11.2-q12	sporadico
RANTES (CCL5)	17q11.2-q12	sporadico
CCR2	3p21.31	sporadico
CCR5	3p21	sporadico
NOS3 (endoteliale)	7q36	sporadico
NOS1 (neurone)	12q22	sporadico
CLUSTERINA	8p21	sporadico
PILCAM	11q14	sporadico

Tabella 1: elenco dei possibili fattori di suscettibilità

Inoltre, numerosi studi si sono focalizzati su geni codificanti per fattori dell'infiammazione, sottolineando il ruolo che questa e, in particolare lo stress ossidativo, avrebbero nella patogenesi della patologia. Una delle prove più forti a sostegno di questa ipotesi è l'evidenza che varianti polimorfiche del gene che codifica per IL-1, localizzato sul cromosoma 2 (2q14-21), sarebbero associate ad un aumentato rischio di sviluppare AD in popolazioni differenti [129,130]. Il gene codifica per IL-1- α , IL-1- β e la proteina antagonista del recettore di IL1 (IL-1Ra); per quanto riguarda il gene *IL-1 α* il genotipo 2/2 sembrerebbe conferire un incremento del rischio di sviluppo di malattia [131]. Tale studio mostra inoltre che soggetti omozigoti per l'allele 2 dell'*IL-1 α* e l'allele 2 dell'*IL-1 β* presentano il rischio maggiore. Il polimorfismo T/C dell'*IL-1 α* è stato indagato in una popolazione AD Italiana. Dai risultati è emerso che il genotipo T/T è fortemente associato con la forma EOAD [132]. Il Polimorfismo T/C nell'*IL-1 β* è risultato associato all'insorgenza della AD in studi condotti su popolazioni appartenenti ad etnie differenti quali la popolazione AD Giapponese [131], Italiana [133] e Australiana [134]. Tali variazioni potrebbero influenzare l'espressione del gene provocando un'ulteriore attivazione della microglia. Questi risultati non sono stati però replicati nella popolazione Cinese [135].

Grande attenzione è stata rivolta anche al gene che codifica per l'IL-6; localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 7 (7p21), *IL-6* codifica per l'omonima citochina proinfiammatoria e presenta polimorfismi nella regione promoter e a livello della regione non tradotta all'estremità 3', sotto forma di ripetizioni tandem (VNTR). Per entrambe le regioni studi caso-controllo hanno dimostrato un'associazione positiva con AD [136].

Studi di screening genomico hanno fornito prove a favore di un possibile ruolo del fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) e della α 2-macroglobulina (A2M). TNF- α è codificato da un gene localizzato sul cromosoma 6 (6p21.3) e un suo ruolo come fattore predisponente è stato dimostrato, oltre che nell'AD, anche in numerose malattie infiammatorie e autoimmuni [137]. A2M, invece, è codificata da un gene localizzato sul braccio corto del cromosoma 1; gli studi condotti da Blacker e collaboratori hanno dimostrato una forte associazione tra polimorfismi genici coinvolgenti questa regione e lo sviluppo di AD [138].

Tra i geni codificanti per le chemochine, *MCP-1* e *RANTES*, sono stati a lungo studiati come loci di suscettibilità per numerose malattie neurodegenerative [139]. Studi finalizzati a rilevare la prevalenza della variante polimorfica A-2518 G in popolazioni affette da AD e in controlli sani hanno dimostrato una mancanza di associazione di questa variante con la malattia, escludendo quindi la possibilità che si tratti di un fattore di rischio per lo sviluppo di malattia. È stato, inoltre, dimostrato come la presenza di almeno un allele polimorfico G non aumenti il rischio di sviluppare AD ma correli con più alti livelli sierici di MCP-1 [140].

Il polimorfismo -403 A/G della regione promoter di *RANTES* è stato positivamente associato a numerose malattie autoimmuni, senza, però, mostrare un'associazione positiva con la Malattia di Alzheimer [139]. I geni *CCR2* e *CCR5*, codificanti rispettivamente per i recettori di MCP-1 e *RANTES*, sono stati, recentemente presi in considerazione; una singola sostituzione amminoacidica, valina con isoleucina, a livello del codone 64 di *CCR2* (*CCR264I*) e una delezione di 32 paia di basi a livello della regione codificante di *CCR5* (*CCR5 Δ 32*) sono stati protagonisti di molti studi. Per quanto riguarda la sostituzione amminoacidica, è stata messa in evidenza

una diminuita prevalenza della variante e l'assoluta assenza di una condizione di omozigosi per l'allele polimorfico nella popolazione affetta da AD, potendo quindi suggerire un ruolo protettivo del polimorfismo [141]; al contrario, non è stata dimostrata alcuna rilevanza di *CCR5Δ32* nei pazienti affetti da AD rispetto ai controlli [141].

IP10 è un'altra chemochina recentemente testata per un possibile ruolo nell'insorgenza di AD. La ricerca di nuove varianti alleliche nella regione codificante del gene in pazienti con AD, ha dimostrato la presenza di due polimorfismi già riportati nell'esone 4 (*G/C* e *C/T*) e di un nuovo polimorfismo raro nell'esone 2 (*C/T*). Successivamente questi SNPs sono stati analizzati attraverso uno studio caso-controllo che non ha dato alcun risultato significativo [142]. Sono stati analizzati anche geni coinvolti nello stress ossidativo, un processo coinvolto nella patogenesi dell'AD. Tra questi sono stati presi in considerazione i geni codificanti per il complesso di sintesi dell'ossido nitrico (NOS). Un polimorfismo già depositato nel gene *NOS3* (*NOS endoteliale*) caratterizzato dalla transizione di una timina in una citosina e positivamente associato con patologie vascolari, analizzato nei pazienti AD non ha riportato nessuna differenza significativa rispetto ai controlli. L'espressione di *NOS3* in cellule del sangue periferico sembrerebbe, però, essere notevolmente influenzata dalla presenza del polimorfismo in modo dose-dipendente. L'influenza che questo polimorfismo ha sull'espressione di *NOS3* supporta l'ipotesi di un effetto benefico esercitato nell'AD dove contribuirebbe a ridurre il danno ossidativo [143]. Un'ulteriore variante nel gene *NOS3* è stata analizzata nei pazienti con AD, essa consiste in un cambiamento di una singola base che produce una sostituzione aminoacidica in posizione 298 (*Glu298Asp*). Uno studio pubblicato nel 1999 ha dimostrato che l'omozigosi per l'allele wild-type è molto più frequente nei casi di LOAD [143]. Un secondo studio, pubblicato nel 2003, ha dimostrato che i soggetti omozigoti presentano elevate concentrazioni sanguigne di omocisteina. Dato che l'isoforma maggiormente espressa nel cervello è *NOS1* (la forma neuronale), è stato analizzato il gene che codifica per questa proteina. L'analisi genetica ha dimostrato che il genotipo omozigote del polimorfismo sinonimo nell'esone 29 di *NOS1* rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di EOAD [144], mentre il polimorfismo nel 3'UTR di *NOS1* non risulta essere associato con l'AD [145].

Un unico studio, condotto da Feulner e collaboratori nel 2009, ha replicato l'associazione di quattro geni candidati: *GAB2*, *PCBD1*, *PCK1* e *LMNA* [146]. Tra questi, l'unico estesamente studiato è *GAB2* (11q14.1) che codifica per una proteina coinvolta in numerose vie di proliferazione e differenziazione cellulare. [147]. Una recente metanalisi che riunisce tutti gli studi pubblicati su *GAB2* conferma una significativa associazione di questo gene con l'AD [148]. È interessante notare come alcuni studi abbiano riportato un effetto additivo di *GAB2* e dell'allele *APOε4* sul rischio di sviluppo di malattia [147].

1.2.7.2.1 *OLR1* e AD

Come noto, l'unico fattore di rischio genetico confermato per l'insorgenza dell'AD sporadico è l'allele $\epsilon 4$ della gene ApoE, che è coinvolto nel metabolismo lipidico e correlato a elevati livelli di colesterolo. La proteina ApoE è un enzima trasportatore del colesterolo ed è responsabile dell'eliminazione di tale molecola dai neuroni;è

inoltre capace di legare la proteina β -amiloide, responsabile della patogenesi dell'AD, formando complessi stabili sia *in vitro* sia *in vivo*. Questi dati suggeriscono un legame tra il metabolismo del colesterolo e l'AD[149].

Recenti studi GWA hanno evidenziato diversi loci genetici, come siti contenenti potenziali geni responsabili dell'insorgenza dell'AD.

Tra questi, un risultato consistente è stato trovato sul cromosoma 12p[150]. In questa regione cromosomica sono presenti un numero considerevole di possibili geni candidati, come per esempio i geni LRP1 e *A2M*.

Un altro gene localizzato sul cromosoma 12p è *OLR1*, che codifica per il recettore della lipoproteina a bassa densità ossidata. Tale proteina fa parte della superfamiglia delle proteine *C-like lectin* ed è regolato dalla cascata di trasduzione del segnale legata all'AMP ciclico (Figura 8).

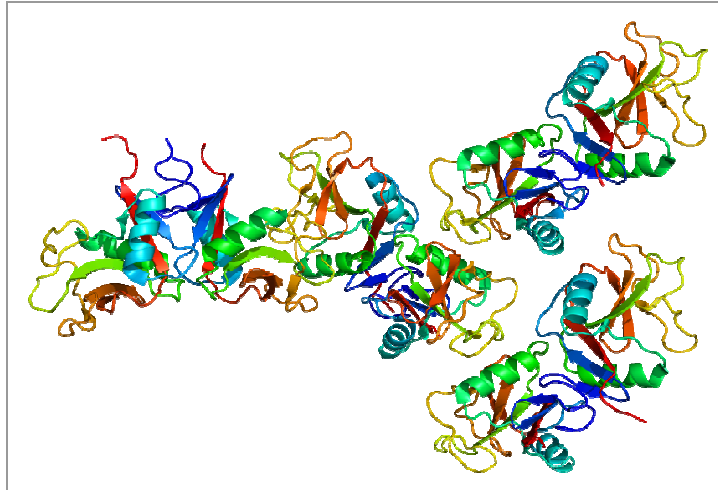


Figura 8: struttura tridimensionale della proteina OLR1

OLR1 è un recettore di membrana, abbondantemente presente nel tessuto cerebrale, che lega, internalizza e degrada la proteina LDL ossidata; la sua espressione è indotta dalla presenza di citochine e chemochine infiammatorie e dallo stress ossidativo presente nel cervello di soggetti affetti da AD. Infatti mutazioni presenti in questo gene sono state correlate all'AD, ma anche a malattie cardiovascolari quali, l'aterosclerosi e l'infarto del miocardio.

In particolare uno SNP, presente nella regione 3'UTR di questo gene (+1073 rs1050283 C/T) è stato considerato un possibile fattore di suscettibilità per l'AD[151].

Una predizione di tipo informatico ha mostrato inoltre che tale polimorfismo sembra essere situato in un sito di binding di un miRNA (hsa-miR369-3p) suggerendo un possibile legame tra la de-regolazione dell'espressione del gene *OLR1* e l'insorgenza dell'AD.

1.2.8 MicroRNA e AD

L'AD è considerata la più comune forma di demenza nella popolazione con più di

65 anni di età. Questa malattia è caratterizzata dalla progressiva degenerazione di cellule neuronali e dalla presenza di infiammazione che conducono a una perdita via via sempre più severa della memoria e a decadimento cognitivo. Dal punto di vista neuropatologico l'AD è caratterizzato da un anormale accumulo nel cervello di aggregati proteici chiamati placche senili e grovigli neurofibrillari. Per questo motivo sembra essere importante nella patogenesi dell'AD il legame tra dosaggio genico e de-regolazione dell'espressione proteica.

Attualmente a sostegno di questa ipotesi diversi studi hanno dimostrato che sia l'attività sia i livelli di BACE1 risultano essere elevati in cervelli di soggetti affetti da AD, suggerendo che un aumento dell'espressione di tale enzima potrebbe iniziare o almeno accelerare la fisiopatologia dell'AD[152]. La comprensione di come questo o altri geni vengano regolati potrebbe aiutare a migliorare la conoscenza delle basi molecolari dell'insorgenza dell'AD a aprire la strada verso nuovi approcci terapeutici.

I microRNA sono una importante classe di regolatori dell'espressione genica.

Essi sono una classe di piccoli RNA non codificanti (circa 22 nucleotici) molto conservati tra le specie animali e sono prodotti a partire dal genoma. Nei mammiferi sono stati identificati circa un migliaio di miRNA (www.mirbase.org) e più di un centinaio sono tradotti a partire da sequenze di RNA messenger che portano alla produzione di proteine, mentre altrettanti geni codificanti per miRNA sono localizzati in porzioni intergeniche. Il processamento di molecole precursori porta alla produzione di miRNA maturi a singolo filamento capaci di legare sequenze complementari presenti nel 3'UTR di determinati geni target. Il legame tra miRNA regolatore e gene target porta alla successiva degradazione del RNA messaggero. Molti miRNA possono avere come target lo stesso gene in quanto presentano la medesima sequenza consenso formata da circa 8 nucleotidi. Allo stesso modo un miRNA può regolare l'espressione di più di un centinaio di geni target, e può quindi essere coinvolto in diversi pathways biologici. Diversi miRNA sono espressi in maniera specifica nelle cellule neuronali dove potrebbero avere un ruolo fondamentale in diverse funzioni cellulari come la crescita neuritica o nella formazione delle sinapsi[153]. Diversi studi hanno dimostrato che un'eliminazione genetica di Dicer, l'enzima chiave nel processo di maturazione dei miRNA, porterebbe a una perdita di cellule neuronali e a un aumento dello stato infiammatorio. Inoltre è stato messo in evidenza in diversi modelli knockout per Dicer che vi è una modificazione dei livelli di APP e un cambiamento nella fosforilazione della proteina Tau. Tutti questi dati mostrano un possibile ruolo dei miRNA nella regolazione di tali geni.

Nel 2007 è stato pubblicato uno studio da Walter J. Lukiw e collaboratori, che mette per la prima volta in relazione l'AD con i miRNA[154]. Successivamente sono stati condotti da diversi gruppi studi GWA su larga scala che dimostrano come i patterns di espressione dei miRNA siano alterati, non solo nel cervello di soggetti affetti da AD, ma anche in altri fluidi biologici come il CSF e il plasma[152]. Ovviamente rimane difficile poter comprendere se tali modificazioni siano causa o conseguenza dell'insorgenza di demenza e dei processi neurodegenerativi, e sono quindi necessari ulteriori studi che chiariscano tale aspetto. Nonostante ciò le considerazioni fatte fino a ora aprono la strada all'utilizzo di nuovi strumenti diagnostici e alla identificazione di nuove strategie terapeutiche per l'AD.

Recentemente è stato identificato un gruppo di miRNA la cui espressione è specificatamente alterata nel cervello di soggetti affetti da AD. Questo set specifico di miRNA comprende il miR-29, miR-15, miR-107, miR-181, miR-146, miR-9, miR-101 e miR-106, che sono stati identificati e validati in più di due studi indipendenti. Nella tabella seguente (Tabella 2) sono elencati i miRNA coinvolti nello sviluppo dell'AD e il loro potenziale ruolo in questa malattia[152].

MicroRNA	Expression alterations in AD	Target genes	Related pathways to AD	Possible consequence on AD development
miR-29	Downregulated	BIM, BMF, HRK, Puma	Apoptosis	Increased # of apoptotic markers
miR-15	Downregulated	BACE1	APP processing	Increased A β production
		Bcl-2	Apoptosis	Increased # of apoptotic markers
miR-107	Downregulated	ERK1	Tau posttranslational modification	Increased Tau pathology
		BACE1	APP processing	Increased A β production
		Cofilin	Actin processing	Increased # of rod like structures
		CDK6	Cell cycle arrest	Increased cell cycle re-entry
miR-181	Downregulated	Dicer	MicroRNA processing	Altered microRNA processing
		ATM	Defense against DNA damage	Increased DNA damage
miR-146	Up/downregulated	RANTES, IRAK1	Inflammation	Altered inflammation response
miR-9	Up/downregulated	Neurofilament H	Axonal conduction	Altered axonal conduction
		SIRT1	Tau posttranslational modification	Increased Tau pathology
miR-101	Downregulated	APP	APP expression regulation	Increased APP expression/increased A β production
		COX2	Inflammation	Altered inflammation response
		MAG2	Tau posttranslational modification	Increased Tau pathology
miR-106	Downregulated	Rb1, p21	Cell cycle regulation	Altered cell cycle regulation
		APP	APP expression regulation	Increased APP expression/increased A β production
		p73	Tau posttranslational modification/apoptosis	Increased Tau pathology/increased # of apoptotic markers
		p62	Autophagy	Altered A β clearance

Tabella 2: elenco dei miRNA coinvolti nell'AD e loro possibile ruolo.

È interessante considerare che diversi di questi candidati potrebbero essere implicati nel processamento e nella regolazione di geni chiave per l'AD come *APP*, *BACE1* e *MAPT* (Figura 9).

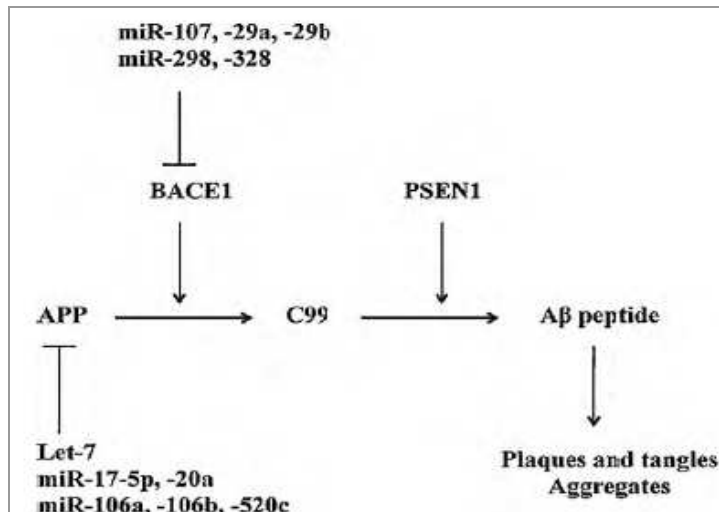


Figura 9: schema del possibile ruolo dei miRNA nella regolazione di geni chiave nello sviluppo dell'AD

Diversi studi hanno evidenziato una riduzione dei livelli di espressione di miR-29 nel cervello di pazienti affetti da AD, e tale diminuzione è stata anche riscontrata nella corteccia cerebrale di topi portatori di mutazioni nei geni *APP* e *PSEN1* responsabili dell'insorgenza della forma familiare di AD[155]. La famiglia miR-15 è

composta da diversi membri tra cui, miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-195, miR-424, miR-497, miR-503 e miR-646. Il miR-15a è frequentemente down-regolato in soggetti affetti da AD, mentre i livelli di espressione del miR-15b sembrano essere down-regolati nel CSF, ma non nel tessuto cerebrale di pazienti AD[156]. Come il miR-29 anche il miR-15 potrebbe essere implicato nella regolazione di markers pro-apoptotici presenti nel cervello e collegati all'AD; infatti uno dei geni target del miR-15 è *Bcl-2*, un gene che codifica per una proteina i cui livelli di espressione risultano alterati nell'AD[156]. Inoltre alcuni membri della famiglia miR-15 hanno come target il gene *ERK1*, che codifica per una chinasi specifica della proteina tau. La diminuzione dei livelli di miR-15 potrebbe giocare un ruolo chiave nella iperfosforilazione della proteina Tau *in vivo*.

Dato che l'anormale fosforilazione della Tau è associata all'AD, si potrebbe ipotizzare che un cambiamento dei livelli di miR-15, osservati nel cervello di soggetti affetti da AD, potrebbe essere causa dell'iperfosforilazione della Tau e quindi essere coinvolto nella patogenesi di tale malattia.

Per quanto riguarda il miR-107 diversi studi dimostrano una diminuzione dei livelli non solo nel cervello di soggetti affetti da AD, ma anche in soggetti MCI. Questo miRNA è responsabile della regolazione di un gene chiave come *BACE1*, ma è anche implicato nell'arresto del ciclo cellulare, un evento presente fin dall'inizio della patogenesi della malattia di Alzheimer, dato che precede l'accumulo della β -amiloide e la formazione dei grovigli neurofibrillari[157].

La famiglia miR-181 è composta da quattro membri: miR-181a, miR-181b, miR-181c e miR-181d. Numerosi studi attestano che vi è una diminuzione dei livelli di espressione del miR-181d nella corteccia e nel CSF di soggetti affetti da AD. È interessante notare che vi è una diminuzione dei livelli di espressione di tale miRNA in neuroni primari trattati con peptidi A β 42 esogeni; questo dato potrebbe far pensare che una de-regolazione dell'espressione di miR-181d dipenda dalla formazione delle placche senili[152,158].

Sempre più evidenze corroborate da numerosi studi pubblicati negli ultimi anni dimostrerebbero che una variazione genetica nel 3'UTR di geni target porterebbe alla eliminazione del sito di binding dei miRNA con un conseguente aumento del rischio di sviluppare la malattia. Questa ipotesi è supportata, per esempio, da uno studio condotto da Wang e collaboratori nel 2008 in cui la presenza di un SNP nel 3'UTR del gene *Fibroblast Growth Factor 20 (FGF20)* conferirebbe un aumento del rischio di sviluppare la malattia di Parkinson attraverso la modificazione del sito di binding del miR-433[159]. Inoltre Rademakers e collaboratori (2008) dimostrano che un aumento del legame del miR-659 al 3'UTR del gene di progranulina (*GRN*) potrebbe portare a un maggiore sviluppo della FTLD con inclusioni di TDP-43[160]. Molto recentemente sono stati scoperti diversi polimorfismi AD specifici, i PolymiRTS, presenti nel sito di binding di numerosi miRNA a livello del 3'UTR di *APP* e *BACE1*. Tutte queste osservazioni supporterebbero l'idea che tali PolymiRTS presenti in geni specifici potrebbero essere considerati dei potenziali fattori di rischio di sviluppo di diverse malattie neurodegenerative, tra cui l'AD[161]. Inoltre la presenza di tali polimorfismi spingerebbe a considerare importanti anche mutazioni presenti in regioni non codificanti di geni chiave[152]. Ovviamente sono necessari ulteriori e numerosi studi funzionali che dimostrino l'attendibilità di queste ipotesi.

1.3 La Degenerazione Lobare Frontotemporale

Con il termine Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD) s'intende una varietà di sindromi cliniche, associate alla presenza di alterazioni in senso degenerativo-atrofico di alcune aree cerebrali, quali i lobi frontali e temporali. Si tratta di una patologia caratterizzata da disturbi del comportamento, del linguaggio e da un progressivo deterioramento delle capacità intellettive. Talvolta possono manifestarsi anche rigidità e disturbi del movimento, simili a quelli del morbo di Parkinson. Si tratta della demenza più comune nella popolazione con età inferiore a 65 anni.

L'atrofia delle aree cerebrali maggiormente coinvolte, spesso può interessare entrambi gli emisferi ma in modo asimmetrico [162]. La FTLD comprende tre sindromi cliniche, per cui si distinguono: la variante comportamentale della demenza frontotemporale (bvFTD), l'afasia primaria progressiva non fluente (PNFA) e la demenza semantica (SD) [163]. I loro criteri diagnostici sono stati recentemente revisionati, includendo i dati che si possono raccogliere con le moderne tecniche di neuro-immagine e in base alle cause genetiche associate alla malattia, che sono state scoperte negli ultimi anni [164,165]. Inoltre, sono stati descritti altri fenotipi clinici tra le tante forme di FTLD, come la Paralisi sopranucleare progressiva (PSP), la sindrome corticobasale (CBS) e la bvFTD con disordine del motoneurone (bvFTD-MND). Complessivamente l'insieme di tutti questi differenti fenotipi, riflette adeguatamente l'estrema eterogeneità clinica della FTLD e dei suoi aspetti clinico-patologici.

La sindrome più comune è la bvFTD, caratterizzata da una profonda alterazione della personalità e del carattere, associata ad un'atrofia bilaterale dei lobi frontali e anteriori temporali. I pazienti mostrano precocemente difficoltà nella gestione delle emozioni, per cui risultano disinibiti e mostrano comportamenti socialmente non appropriati al contesto, eccessiva giovialità, deficit di critica/giudizio ed iperoralità. I principali deficit cognitivi riguardano l'attenzione, le capacità astratte, la pianificazione e la risoluzione di problemi, mentre linguaggio, percezione e orientamento spazio-temporale sono conservati. Nonostante i pazienti non abbiano deficit amnesici, i test di memoria possono risultare deficitari a causa di disturbi di tipo frontale, quali mancanza di attenzione [166].

La PNFA è un disordine progressivo del linguaggio che, benché s'inquadri nell'ambito delle FTLD, differisce dalle altre per la più grave afasia e per l'assenza di disturbi della personalità, del comportamento, anche se la demenza sopraggiunge negli stadi tardivi di malattia. La malattia colpisce prevalentemente il linguaggio e il modo di esprimersi dei pazienti, che sono caratterizzati da atrofia asimmetrica dell'emisfero sinistro, soprattutto a livello della regione in prossimità alla scissura di Silvio (area di Broca), tradizionalmente adibita al linguaggio [163]. La progressiva perdita delle capacità dialettiche, porta alcuni pazienti alla cosiddetta Afasia non fluente primaria (PNFA), un sottotipo patologico [167] caratterizzato da una scarsa produzione verbale spontanea, da una ridotta produzione orale, con soltanto parole isolate o frasi molto brevi ed in alcuni casi da un'espressione stereotipata. Un altro sottotipo è stato recentemente descritto come la variante logopenica (LPA), caratterizzata da disturbi fonologici, da difetti nel recupero delle parole e da deficit nella ripetizione di frasi [168]. La PNFA sembra essere associata, nella maggior parte dei casi, con l'AD [169].

Infine, la SD è un disordine multi-modale con afasia di grado moderato, in cui non è compromessa la fluenza o la capacità di reperimento delle parole. Piuttosto, vi è una progressiva perdita del significato delle stesse, per cui i soggetti che ne sono colpiti non riescono ad associare alle parole la loro accezione. Il quadro anatomo-patologico è associato ad atrofia bilaterale ed asimmetrica della corteccia temporale.

Nonostante la suddivisione delle varie forme patologiche, molti pazienti sviluppano nel corso del tempo, caratteristiche cliniche appartenenti a più di una sindrome, che potrebbero perciò sovrapporsi.

Ad esempio, durante la SD i pazienti presentano spesso disturbi comportamentali in sovrapposizione con quelli dei pazienti bvFTD [162], soprattutto a causa dell'interessamento della corteccia prefrontale e a danni del sistema limbico [170,171]. Al contrario, pazienti PNFA di solito non mostrano cambiamenti comportamentali. Inoltre, è possibile che una porzione di pazienti con bvFTD, nel tempo sviluppino anche MND, mentre nei soggetti a cui è stata diagnosticata PNFA o SD questo fatto è molto meno frequente [172].

Ad oggi, come per l'AD, non esistono terapie risolutive; la cura è unicamente rivolta ad attenuare, con farmaci o altre terapie specifiche, i disturbi del comportamento e del linguaggio.

1.3.1 Epidemiologia e clinica

Recenti studi epidemiologici indicano la demenza frontotemporale come la seconda più frequente causa di demenza ad esordio precoce dopo la Malattia di Alzheimer con un'incidenza di circa 20-30 casi per 100.000 abitanti l'anno (casistica inglese), anche se mancano studi epidemiologici su larga scala.

Inoltre, diversamente dall'AD la curva di incidenza della demenza frontotemporale raggiunge un picco più precoce (45-65 anni) per diventare una causa rara di demenza nella popolazione oltre i 65 anni [173]. Ciononostante è importante tener presente che raramente individui appartenenti a questa fascia di età vengono sottoposti a test mirati, indispensabili per porre una diagnosi probabile o anche solo possibile di demenza frontotemporale e, quindi, esiste la possibilità che la reale incidenza della patologia risulti sotto diagnosticata, come dimostrato in alcune casistiche autoptiche.

I criteri clinici per la diagnosi della FTLD furono originariamente sviluppati nel 1994 [174]. Nonostante il fatto che gli aspetti clinici presi in esame mostravano una buona capacità di escludere la presenza di AD, questi criteri non davano nessuna indicazioni sul numero di caratteristiche cliniche necessarie per porre diagnosi né tanto meno la relativa importanza di ciascun sintomo. Dopo la loro pubblicazione, è risultato chiaro che questi criteri non erano in grado di distinguere tra le varie sindromi che rientrano nella tanto complessa FTLD. Successivamente nel 1998 Neary e collaboratori hanno proposto dei criteri [163], attraverso i quali diventava possibile distinguere tra i tre principali tipi di FTLD. Ulteriori aggiornamenti dei criteri per la diagnosi di FTLD sono stati posti prima nel 2007 [175], grazie ai quali vengono individuati tre possibili stati clinici nella sindrome bvFTD (possibile, probabile e/o certa) e poi recentemente nel 2011 [164,165].

Clinicamente la FTLD può essere suddivisa in due sottotipi che presentano delle

caratteristiche predominanti; da un lato vi sono degli evidenti cambiamenti comportamentali e di personalità, dall'altro emergono importanti disturbi del linguaggio.

La variante comportamentale di FTLD (bvFTD), che si manifesta nel 50% dei casi di FTLD, è caratterizzata da un esordio insidioso in cui cambiamenti di personalità, fluttuazioni emotive e alterazioni del comportamento nei rapporti interpersonali testimoniano la progressiva degenerazione dei circuiti neurali coinvolti nel controllo della vita sociale, nella regolazione emozionale e nei processi decisionali [176]. Tipicamente è molto difficile ricostruire retrospettivamente l'epoca di esordio; i pazienti sono anosognosici e ciò rende indispensabile la raccolta anamnestica dai parenti o da "caregiver" che si occupano del paziente. A questo scopo risultano sicuramente utili questionari ad hoc che mirano ad evidenziare le caratteristiche salienti dei primi stadi della patologia (Neuropsychiatric Inventory, Cambridge Behavioural Inventory, Frontal Behavioural Inventory) [177; 178;179].

Un tratto estremamente comune è l'apatia che si manifesta come inerzia, ridotta motivazione, mancanza di interesse nelle attività precedentemente svolte dal paziente e progressivo isolamento sociale. Spesso la disinibizione coesiste con l'apatia, determinando azioni impulsive e comportamenti inappropriati al contesto sociale. Gioco d'azzardo patologico, iperreligiosità, disinibizione sociale, cleptomania, etc. possono tutte essere modalità di presentazione della malattia [180]. Comportamenti ripetitivi o stereotipati possono manifestarsi con perseverazione e tendenza alla ripetizione di frasi e/o comportamenti. Frequentemente viene riferita dai familiari la tendenza ad accumulare oggetti. La mancanza di empatia è un tratto costante e molti pazienti presentano reazioni di afflizione eccessive ai rimproveri fin dall'esordio [181].

Un'altra caratteristica fondamentale è la rigidità mentale per cui i pazienti faticano ad adattarsi a situazioni ed ambienti nuovi. Inoltre, in alcuni casi, si può osservare uno stato simil-ipomaniacale o francamente depressivo. Cambiamenti nelle abitudini alimentari sono costantemente descritti in ogni popolazione e sembrerebbero essere correlati a cambiamenti patologici nei circuiti neuronali ipotalamici deputati al buon controllo metabolico [182].

Sintomi psicotici, quali ideazione paranoide e allucinazioni sono rare nella FTLD. Fanno eccezione i pazienti con FTLD associata a malattia del motoneurone, pazienti con FTLD-FUS e FTLD-TDP in cui la prevalenza di tali disturbi raggiunge anche il 50% [183].

In letteratura viene ampiamente documentata variabilità della sintomatologia durante l'evoluzione della malattia; in particolare sintomi quali agitazione, disinibizione e irritabilità sono ritenuti maggiormente frequenti negli stadi precoci, mentre agitazione e iperoralità sarebbero presenti lungo tutta la durata di malattia. Infine alcuni studi riportano l'apatia come sintomo maggiormente frequente in pazienti con esordio tardivo [184].

I sintomi più rilevanti per discriminare FTD da AD sono: disinibizione sociale, euforia, comportamenti stereotipati e/o aberranti e cambiamenti delle abitudini alimentari.

Nella tabella sotto riportata sono riassunte le principali caratteristiche cliniche della Degenerazione Lobare Frontotemporale a confronto con i tratti più salienti della malattia di Alzheimer (Tab. 3).

	AD	FTLD
Storia	Aumenta con l'età Memoria > Comportamento Indifferenza	Presenile Comportamento > Memoria Disinibizione
Patologia	Placche senili Groigli neurofibrillari Perdita di Neuroni Attivazione della Microglia	Degenerazione del lobo frontale: microvacuolazione, gliosi, perdita neuronale
Esame dello Stato Mentale	Disfunzioni esecutive minori Amnesia, Disfunzioni visuospatiali, Acalculia	Disfunzioni esecutive maggiori, capacità di fare i calcoli intatta, azione visuospatiali intatta
Giudizio Neuropsicologico	Severa perdita di memoria, deficit di memoria peggiore rispetto alle capacità esecutive	Capacità esecutive peggiori rispetto alla perdita di memoria
Linguaggio	Afasia sensoriale transcorticale, Anomia	Afasia semantica, Progressiva afasia non fluente
Caratteristiche Neuropsichiatriche	Psicosi nel 50%, disinibizione limitata, rara euforia e comportamento stereotipato	Psicosi nel 25%, severa disinibizione, euforia in un 1/3, carattere stereotipato comune

Tabella 3: Confronto delle caratteristiche cliniche di AD e FTLD.

La prima descrizione di una patologia progressiva caratterizzata dal coinvolgimento precoce delle capacità linguistiche dell'individuo e da atrofia delle regioni frontali e temporali dell'emisfero viene storicamente attribuita a Pick e Serieux negli anni 90 del secolo XIX [185;186]. Nel secolo scorso fu Mesulam a descrivere compiutamente una serie di casi di "afasia lentamente progressiva", termine successivamente sostituito da "afasia primaria progressiva" (PPA) [187;188]. La variante demenza semantica fu descritta per la prima volta da Warrington nel 1975 e definita compiutamente negli anni 90 da Hodges e colleghi [189]. Successivamente, Grossmann e colleghi descrissero una forma alternativa di disordine del linguaggio, in seguito ribattezzato afasia non fluente [190].

Attualmente distinguiamo tre differenti forme cliniche di afasia primaria progressiva l'afasia agrammatica, la demenza semantica e la variante logopenica [168]. Le tre forme sono caratterizzate da un precoce e prominente coinvolgimento delle abilità linguistiche che determina un importante impatto ecologico in aree della vita quotidiana che richiedono la comunicazione linguistica (per esempio parlare al telefono); le altre funzioni cognitive si dimostrano relativamente ben conservate

almeno nella prima parte della malattia [191]. La variante non fluente o agrammatica è caratterizzata da importante agrammatismo con conseguente linguaggio interciso ed errori nella strutturazione della frase; sono evidenti alterazioni della prosodia e del ritmo del discorso; la comprensione è coinvolta precocemente ed è evidentemente influenzata dalla complessità grammaticale della frase (aprassia del linguaggio) [192]. I pazienti affetti da demenza semantica, invece, dimostrano una precoce importante compromissione della comprensione di singole parole, espressione di un deficit diffuso della memoria semantica che coinvolge il riconoscimento di forme, oggetti, volti e quindi persone anche quando vengono presentate attraverso input sensoriali diversi [193]. Difficoltà nel rievocare i nomi e nella ripetizione di frasi sono, invece, le caratteristiche principali della variante logopenica; in questi pazienti l'eloquio spontaneo è povero, difficoltoso e continuamente interrotto; diversamente dai pazienti affetti dalla variante non fluente non si riscontra un franco agrammatismo e, diversamente dai pazienti affetti dalla variante semantica si osservano soprattutto errori di natura fonologica e un risparmio della comprensione di singole parole [168].

Nell'evolversi della malattia può avvenire una sovrapposizione tra le tre sindromi cliniche comportando una difficile distinzione soprattutto negli stadi più avanzati della malattia. Mediamente l'aspettativa di vita è di circa 6-11 anni dall'inizio dei sintomi, indipendentemente dall'età d'insorgenza e dal sesso.

Fin dall'inizio del XX secolo è stata documentata una comorbidità della SLA con le alterazioni del comportamento, declino cognitivo e demenza. La FTLD può coincidere o emergere successivamente all'insorgenza di sintomi motori [194].

In un grande numero di studi è stato riportato che circa il 47% di pazienti affetti da SLA presenta una degenerazione a livello dei lobi frontali; al contrario il 40% di pazienti con diagnosi clinica di FTLD mostra una disfunzione del motoneurone e i criteri clinici per la SLA identificano questo sottotipo di malattia come FTLD-SLA. Pazienti affetti da FTLD-SLA hanno una prognosi molto negativa con un'aspettativa di sopravvivenza di circa 2-3 anni dall'inizio dei primi sintomi e la presenza di una storia familiare positiva circa nel 50% dei casi.

Il termine FTDP-17 è stato coniato per la prima volta nel 1997 quando sono state descritte 13 famiglie che presentavano una sindrome clinica caratterizzata da disinibizione, demenza e parkinsonismo e mostravano un linkage genetico sul cromosoma 17. Successivamente è stato possibile correlare queste caratteristiche cliniche con mutazioni nei geni *MAPT* e *GRN* localizzati appunto sul cromosoma 17.

1.3.2 Aspetti Neuropsicologici

Agli stadi iniziali di malattia, i pazienti affetti dalla variante comportamentale, possono ottenere risultati praticamente normali ai test neuropsicologici nonostante la presenza di importanti cambiamenti comportamentali e di personalità [184]. Ovviamente il MMSE non è considerato un test attendibile, mentre il test di Addenbrooke sembrerebbe in grado di individuare almeno il 90% dei pazienti affetti. Il profilo cognitivo tipico di questi pazienti è caratterizzato da un relativo risparmio delle abilità linguistiche e visuospaziali; nonostante il risparmio della memoria episodica sia indispensabile per poter porre diagnosi per bvFTD, recenti dati in letteratura indicherebbero un coinvolgimento di tale settore in una

percentuale variabile dal 10 al 15% dei pazienti [195].

Allo stato attuale sembrerebbe non esistere un profilo cognitivo deficitario universalmente valido per i pazienti affetti da bvFTD, anche se uno scrupoloso screening neuropsicologico dovrebbe indicare agli stadi precoci di malattia compromissione delle funzioni esecutive [182]; successivamente, con la progressione della malattia e l'estendersi dell'atrofia anche ai lobi temporali anteriori, il quadro deficitario diventa più sfumato con sovrapposizione con altri sottotipi di FTLD, in particolare la demenza semantica [179].

Proprio questa mancanza di un profilo neurocognitivo tipico ha spostato l'attenzione sui test in grado di indagare giudizio sociale, riconoscimento di emozioni e risoluzione di problemi complessi. È noto che la corteccia orbitomesiale riveste un ruolo cruciale nel controllo di tutte queste abilità ed effettivamente i pazienti affetti da bvFTD mostrano prestazioni deficitarie in test specifici (es: lowa gambling tasks).

I domini linguistici fondamentali presi in considerazione nell'inquadramento dei pazienti affetti da PNFA sono la produzione linguistica, la ripetizione, la comprensione sintattica e di singole parole, la denominazione, le abilità semantiche, la lettura e la compitazione.

Per quanto riguarda la produzione linguistica viene valutata soprattutto la presenza di agrammatismo e di deficit di tipo motorio, caratteristiche entrambe della variante non fluente. La denominazione è fortemente compromessa nella demenza semantica, moderatamente compromessa nella variante logopenica; nel primo gruppo di pazienti, inoltre, sono presenti numerosi errori di tipo semantico, mentre nel secondo gruppo sono riscontrabili errori fonemici. La difficoltà nella ripetizione è caratteristica della variante logopenica, mentre la comprensione di singole parole e il riconoscimento di persone e/o oggetti risultano deficitarie nella demenza semantica. Prestazioni al di sotto dei valori soglia nella comprensione di frasi è riscontrabile sia nella variante non fluente che in quella logopenica, con un importante impatto della difficoltà grammaticale nel primo caso e della lunghezza del periodo nel secondo. Infine possiamo osservare disturbi nella lettura e nella compitazione nelle varianti semantica e logopenica [196].

1.3.3 Caratteristiche Neuropatologiche

Attualmente col termine degenerazione lobare frontotemporale si indicano tutti i cambiamenti patologici macroscopici e microscopici riscontrabili all'esame istologico di campioni autoptici prelevati da pazienti affetti da FTLD [188].

Il cervello di soggetti affetti da FTLD è caratterizzato dalla presenza di diversi patterns di atrofia dei lobi temporali e frontali anteriori. Sono stati descritti differenti patterns di atrofia che sono correlabili con particolari fenotipi clinici; ad esempio un'atrofia relativamente simmetrica dei lobi frontali e dei lobi temporali anteriore è associata prevalentemente con la bvFTD. La presenza di atrofia asimmetrica del lobo temporale anteriore inferiore di sinistra è associata alla SD.

Grazie al progredire delle tecniche di immunostochimica è stato possibile identificare le categorie di FTLD, poiché classificate in base alle lesioni e al tipo d'inclusione patologica, che si deposita all'interno delle cellule nervose.

Circa il 40% dei pazienti, mostra all'esame immunostologico, inclusioni tau-positive; questi includono quei casi di malattia associati a mutazioni che cadono nel

gene *MAPT* [197] e si possono distinguere pazienti con predominanza di 3R tau e pazienti con predominanza 4R tau. I pazienti che presentano queste caratteristiche istologiche rientrano nella categoria definita di FTLD-T (FTLD associata a depositi di tau). I depositi di filamenti citoplasmatici composti dalla proteina anomala tau iperfosforilata, caratterizzano una percentuale di casi FTLD che includono anche la malattia di Pick (corpi di Pick) ed altre tauopatie. In casi molto rari è possibile che i neuroni degenerino anche in assenza di lesioni evidenti.

Negli ultimi anni è parso evidente che circa il 50% dei casi di FTLD risultano tau-negativi e sono caratterizzati dalla presenza di depositi di ubiquitina, per cui vengono definiti FTLD-U.

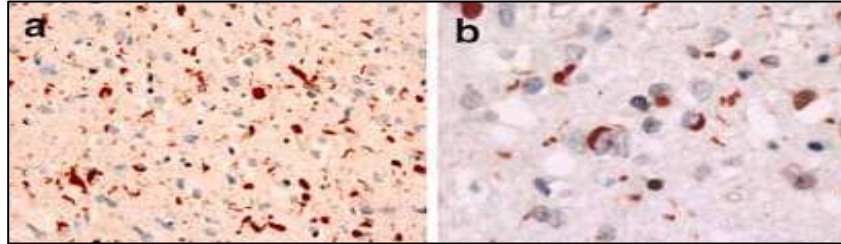


Figura 10: inclusioni di ubiquitina nei neuriti immunoreattivi (a) e nelle inclusioni citoplasmatiche neuronali (b)

Questo implica che all'esame istologico risultano aggregati proteici costituiti dalla proteina *TDP-43* (*TAR DNA-binding protein 43*) e quindi TDP-43 positivi. Il segnale immunoistochimico si localizza nel citoplasma dei neuroni appartenenti alle aree normalmente interessate dalla malattia. Risultano colpiti inoltre anche i neuroni del giro dentato dell'ippocampo. Recentemente sono stati descritti anche casi di malattia con positività verso depositi della proteina FUS (Fused in sarcoma) in pazienti che presentano SLA o FTLD. Sia TDP-43 che FUS sono proteine coinvolte nella regolazione della processazione dell'RNA, tramite legame all'acido nucleico; purtroppo i meccanismi patogenetici scatenati da un loro accumulo nella cellula non sono ancora stati pienamente compresi.

Comunque in un numero esiguo di casi FTLD-U le inclusioni proteiche rimangono ancora oggi sconosciute e sono stati classificati come FTLD legati al sistema del proteosoma (FTLD-UPS).

L'ubiquitina è un peptide di 76 aminoacidi che funge da marcatore di proteine da degradare nella via proteasomiale (modificazione post-traduzionale delle proteine) mentre la proteina *FUS* è implicata nel processo di maturazione dei trascritti genici e in quello dello splicing alternativo.

Differentemente dalla PNFA non esiste un'associazione preferenziale tra un determinato quadro neuropatologico e uno specifico spettro di manifestazioni cliniche della variante comportamentale. I pazienti affetti da bvFTD mostrano inclusioni taupositive o TDP-43-positivo in circa la totalità dei casi, con una distribuzione abbastanza equa, mentre una piccola percentuale di pazienti mostra inclusioni FUS-positivo [198].

Come anticipato le varianti cliniche comprese sotto il termine di PNFA sono state statisticamente associate a differenti quadri neuropatologici. La variante non

fluente mostra una significativa associazione con inclusioni tau-positive [200]. La demenza semantica risulta associata a inclusioni TDP-43 positive [199]. Infine, i pazienti affetti dalla forma logopenica sembrerebbero presentare un profilo neuropatologico compatibile con AD [191]. È, tuttavia, importante precisare come la corrispondenza tra sindrome clinica e quadro neuropatologico non sia assoluta con notevoli casi di sovrapposizione.

Nella figura 10 è mostrato un diagramma in cui vengono mostrate le correlazioni genetiche, neuropatologiche e cliniche nella FTLD.

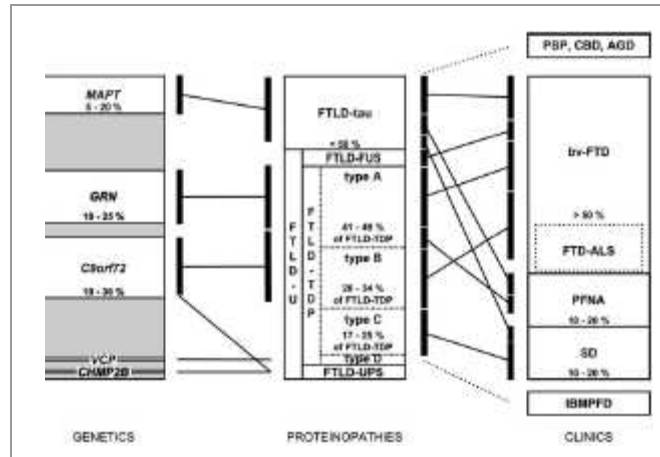


Figura 10: diagramma di correlazione tra caratteristiche genetiche, cliniche e neuropatologiche nella FTLD.

1.3.4 Genetica della FTLD

Nella maggior parte dei casi le FTLD si manifestano in modo sporadico, senza cioè che sia stato identificato alcun difetto genetico. Esistono tuttavia anche forme di FTLD ereditarie, suggerendo pertanto una causa genetica che interviene nell'insorgenza e nella progressione della malattia [201-203]. Una storia familiare positiva per la demenza è stata riscontrata nel 40%-50% dei soggetti affetti da FTLD [202,204,205] che viene trasmessa come una patologia autosomica dominante, documentabile però solo nel 13.4% dei casi totali secondo Goldman e collaboratori [201].

Quando vengono considerate separatamente le varie manifestazioni cliniche della FTLD, si riscontra che vi è un aumento della presenza di familiarità; nella bvFTD è stata documentata un'incidenza di familiarità nel 45% dei casi che aumenta quando si presentano anche sintomi di malattia del motoneurone (60%). La demenza semantica appare invece la meno interessata da casi di trasmissione autosomica dominante con circa il 20% dei casi d'incidenza.

I nuovi criteri diagnostici per la bvFTD proposti da Rascovsky e collaboratori nel 2011, includono la presenza di una mutazione nota come biomarcatore di tale malattia. La dimostrazione della presenza di una mutazione autosomica dominante è richiesta per la diagnosi di bvFTD certo ed è anche l'unico mezzo per definire una diagnosi precisa attualmente utilizzabile durante la vita del paziente[164].

Le conoscenze acquisite sino ad oggi sulla genetica delle FTLD, sono state recentemente ampliate con l'identificazione di vari difetti genetici in più loci cromosomici. In particolare i geni che sono stati associati con la patologia sono *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau gene), *GRN*), *VCP-1* (Valosin-Containing Protein), *CHMP2B* (Chromatin-Modifying 2B), *TARBDP* (TAR-DNA binding protein 43 encoding gene).

Nel corso del 2012 è stata scoperta una nuova causa genetica in forme familiari di FTD-MND, ed è stata riscontrata in un gene situato sul cromosoma 9 [206,207]. Tale gene, chiamato *C9orf72*, presenta, in una grande percentuale di casi di soggetti affetti da FTD-MND, un'anormale ripetizione di un'espansione esanuclotidica (GGGGCC).

La frequenza relativa delle mutazioni presenti in questi geni varia sostanzialmente nelle diverse popolazioni, dimostrando la presenza di un effetto fondatore che comporta l'elevata incidenza di determinate mutazioni a seconda della regione presa in considerazione per l'analisi.

Comunque in generale le mutazioni nei geni *C9orf72*, *MAPT* e *GRN* sono più frequenti e insieme chiariscono il 17% dei casi di FTLD familiare. In due numerose coorti di pazienti affetti da FTLD, le mutazioni in *C9orf72*, *MAPT* e *GRN* presentano un'incidenza più elevata rispettivamente del 32 e del 40%. Mutazioni nei geni *VCP* e *CHMP2B* sono molto più rare con un'incidenza di circa l'1% dei casi familiari di FTLD.

Come detto in precedenza la maggior parte dei casi di FTLD si manifesta in modo sporadico e lo studio di geni candidati che possano agire da fattori di suscettibilità per questa malattia risulta essere molto importante.

Ad oggi sono pochi gli studi che documentino un'associazione positiva tra geni e aumento dell'insorgenza della FTLD. A questo proposito Van Deerlin e collaboratori nel 2010 hanno pubblicato il primo studio GWA che ha analizzato il DNA di 513 individui affetti da FTLD-TDP43 positivi. In tale studio è stata riscontrata una forte associazione tra un nuovo gene presente sul cromosoma 7p21, *TMEM106b*, e un aumento del rischio d'insorgenza della FTLD[208].

1.3.4.1 MAPT

La prima evidenza della presenza di una causa genetica per le forme FTLD familiari, è venuta dalla dimostrazione di un legame tra il cromosoma 17q21.2 e forme autosomiche dominanti di FTD associate a Parkinsonismo [209], da cui è derivato il nome di "Demenza Frontotemporale e Parkinsonismo legato al cromosoma 17 (FTDP-17)".

Il gene responsabile di questa associazione, chiamato *MAPT*, è stato identificato da pochi anni [210-212] e codifica per la proteina tau associata ai microtubuli, la cui funzione è quella di stabilizzarli e favorire il loro assemblamento.

Ad oggi sono state descritte più di 44 mutazioni in 134 differenti famiglie (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>) e classificate in base alla regione genica colpita, al loro effetto sulla trascrizione del gene stesso e al tipo di taupatia che determinano.

Le mutazioni in *MAPT* possono essere missenso, delezioni o mutazioni introniche che si posizionano vicino al sito donatore di splicing dell'introne successivo all'esone 10, il quale viene, a causa di questa mutazione, trascritto, ma eliminato

durante il processo di splicing dell'RNA messaggero. Tutte le mutazioni sono concentrate tra l'esone 9 e l'esone 13 tranne due che sono state identificate recentemente e che si trovano nell'esone 1 [213]. I possibili effetti provocati sulla proteina tau si ripercuotono su differenti meccanismi associati alla proteina stessa, per cui dipendono dal tipo e dalla localizzazione della mutazione. Ad ogni modo, un numero considerevole di mutazioni ne promuovono l'aggregazione, mentre altre ne incrementano la fosforilazione, per cui risulta danneggiata la stabilizzazione dei microtubuli e del citoscheletro [214,215]. Molte altre sono invece implicate in un processo di splicing anomalo [216] che porta alla produzione di differenti isoforme della proteina e ad un'alterazione dei loro rapporti (3R/4R). Alcune mutazioni presenti in porzioni codificanti del gene *MAPT* mostrano un aumento della tendenza della proteina tau a formare aggregati neurotossici.

All'autopsia, i pazienti con mutazioni in *MAPT* mostrano inclusioni tau-positive. Inoltre, la manifestazione clinica nei portatori della mutazione *MAPT* si evidenzia soprattutto nei pazienti con bvFTD ad esordio intorno alla quinta decade di vita. Tuttavia, anche casi di PNFA sono stati segnalati, con un esordio precoce intorno alla sesta decade di vita [217]. Anche se la presentazione clinica è eterogenea sia in termini di sintomi sia in termini d'esordio, i soggetti portatori di mutazioni *MAPT* di solito presentano una grave atrofia del lobo temporale, per lo più lateralizzato a destra.

1.3.4.2 *GRN*

Dopo la scoperta di *MAPT* come gene causale per la FTLD-17, rimanevano ancora numerose famiglie affette da FTLD di tipo autosomico dominante geneticamente correlate con la regione cromosomica 17q21, ma che non presentavano nessuna mutazione patogenetica sul gene *MAPT*. Grazie al sequenziamento di circa 80 geni, contenuti nella regione che causa questo tipo di malattia, è stata così identificata la prima mutazione (c.90-91insCTGC) sul gene *GRN*.

Essa consiste in un'inserzione di 4 paia di basi (CTGC) tra i nucleotidi 90 e 91 della regione codificante nell'esone 1. Tale mutazione causa un frameshift e una prematura terminazione della trascrizione della proteina Progranulina (C31LfsX34) [218].

Il gene *GRN* codifica per un fattore di crescita che appartiene ad una famiglia di proteine coinvolte in numerose funzioni biologiche tra cui lo sviluppo, la riparazione delle ferite e l'infiammazione (attivando specifiche cascate del segnale), la progressione del ciclo cellulare e la motilità cellulare [219]. Progranulina è una proteina di 593 aminoacidi, ricca di cisteine e con un peso molecolare di 68,5 kDa, il cui ruolo nella sopravvivenza neuronale e la cui funzione non è ancora stata chiarita. Tale proteina è espressa non solo nei neuroni, ma è anche nella microglia attivata [218], in particolare durante il corso di molte malattie neurodegenerative.

Dalla prima mutazione individuata ad oggi, sono state descritte 69 diverse mutazioni (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>) in 231 famiglie FTLD. È interessante notare che tutte le mutazioni identificate creano alleli non funzionali che, nella maggior parte dei casi, portano ad una terminazione prematura della trascrizione del gene, a seguito della formazione di un codone di stop. L'mRNA prodotto risulta pertanto aberrante, viene tenuto nel nucleo e degradato, determinando così un fenomeno di aploinsufficienza [220], al contrario di come

invece accade per la proteina tau, la quale una volta mutata tende a depositarsi nei neuroni.

Le mutazioni in *GRN* sono distribuite uniformemente lungo tutta la porzione codificante e nei siti di splicing del gene. Tali mutazioni comportano, come detto in precedenza, aploinsufficienza, ma è stata identificata anche una delezione totale del gene che comporta la mancata produzione della proteina.

Attualmente, non si conosce ancora il legame tra *GRN* e *MAPT* e nonostante la loro sorprendente vicinanza sul cromosoma 17, si tende a considerarla ancora come una semplice coincidenza.

Da un punto di vista clinico, le mutazioni nel *GRN* sono associate con fenotipi estremamente eterogenei, tra cui, oltre alla presentazione classica di FTLD, troviamo anche casi di AD [221] e MCI. L'età di esordio della malattia è estremamente ampia, anche all'interno della stessa famiglia e va dai 47 ai 79 anni.

Un importante contributo per ottenere una corretta diagnosi indipendente della presentazione fenotipica spesso così variabile, è la dimostrazione che i livelli plasmatici di progranulina sono estremamente bassi nei portatori della mutazione *GRN* ed anche in soggetti asintomatici [221].

Il fenotipo neuropatologico in famiglie FTLD con mutazioni in *GRN*, è simile a quello osservato nella maggior parte dei casi idiopatici (a causa ignota) di FTLD-U: all'esame neuropatologico si evidenziano infatti delle inclusioni intranucleari e citoplasmatiche immunoreattive per l'ubiquitina. In particolare, tra i principali componenti di queste inclusioni di ubiquitina è stata individuata la proteina *TDP-43* sia in famiglie FTLD con mutazioni in *GRN* sia in altri casi di SLA.

Nonostante quanto detto, ad oggi non è ancora chiara, però, la relazione tra l'aploinsufficienza di *GRN* e l'accumulo di *TDP-43* nel citoplasma.

1.3.4.3 C9orf72

Una delle scoperte più interessanti che riguardano la genetica della FTLD è arrivata da uno studio di linkage di famiglie affette da FTD-MND ed ha portato all'identificazione di un potenziale locus di suscettibilità sul cromosoma 9p21-22[194].

La prima evidenza scientifica di un linkage con questo locus genetico è emersa nel 2000 da uno studio pubblicato da Hosler e collaboratori condotto su famiglie affette da FTD-MND. Dopo questo, numerosi lavori hanno confermato tale linkage presente sul cromosoma 9p21-22. Nel corso dell'ultima parte del 2011, due gruppi di ricerca hanno identificato in maniera indipendente la presenza di un'espansione di una ripetizione esanucleotidica (GGGGCC) presente in una porzione non codificante del gene *C9orf72* che è proprio posizionato sul cromosoma 9p21[206,207]. Tale espansione sembra essere responsabile di un elevato numero di casi familiari di SLA, ma anche casi di FTD-MND e FTD-TDP.

Nella popolazione normale la dimensione della ripetizione oscilla tra le 3 e le 25 unità, mentre nei pazienti vi è un aumento delle unità presenti che sono sicuramente superiori a 60.

Purtroppo non è ancora possibile attuare una stima precisa delle unità ripetute presenti nei pazienti, dato che il metodo di analisi attualmente utilizzato, che si basa su una *repeat-primed PCR*, non riesce a discriminare la presenza di espansioni superiori a 60 ripetizioni. In uno dei primi due lavori pubblicati

sull'argomento sono riportati anche i risultati ottenuti da un esperimento condotto [206] con il metodo Southern blot, grazie al quale è stato possibile stimare in un numero limitato di portatori dell'espansione che il numero delle unità ripetute oscilla tra le 700 e le 1600 unità.

Ad oggi non è ancora chiaro se esiste un numero minimo critico di ripetizioni che possa determinare l'insorgenza della malattia o se ci sia un qualche fenomeno di anticipazione nell'età d'insorgenza, dovuto all'aumento delle ripetizioni nella progenie.

I dati ottenuti da uno studio longitudinale in cui vengono analizzati 1381 pazienti con FTLD di origine Europea, dimostrano che la frequenza dell'espansione patologica si aggira intorno al 11.4% raggiungendo il 24,8% nei casi di malattia a origine familiare. Lo stesso studio riporta che la frequenza nei casi sporadici di FTLD si aggira intorno al 6%. Se questa elevata frequenza di mutazione presente nei casi sporadici sia determinata da un aumento *de novo* dell'espansione deve essere ancora chiarito, ma uno studio preliminare suggerisce che potrebbe essere coinvolto un fenomeno di penetranza incompleta.

Il gene *C9orf72* codifica per una proteina espressa in maniera ubiquitaria nell'organismo, la cui funzione non è stata ancora chiarita.

E' noto che, attraverso complicati processi di splicing alternativo, a partire dalla sequenza genica d'interesse, vengono prodotte tre trascritti differenti (Figura 11), che possono portare alla sintesi di due isoforme proteiche non ancora caratterizzate.

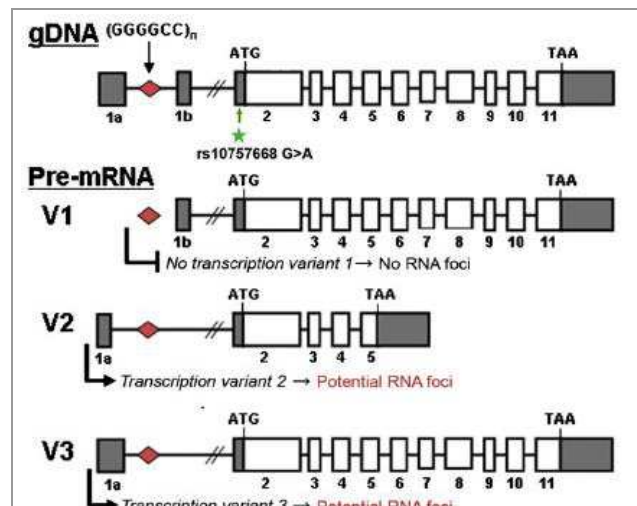


Figura 11: Struttura del locus genico *C9orf72* e le possibili varianti di pre-mRNA che si possono generare per splicing alternativo.

E' stato descritto che le varianti V1 e V3 dei trascritti codificano per una proteina di 481 aminoacidi, poiché viene tradotta la regione compresa tra l'esone 2 e l'esone 11, generando l'isoforma proteica A. La variante V2 invece codifica per un'isoforma proteica B composta da 222 aminoacidi, poiché viene tradotta solo la regione compresa tra l'esone 2 e l'esone 5. L'analisi in RT-PCR ha dimostrato che tutte le

isoforme trascrizionali di *C9orf72* sono presenti in una varietà di tessuti e l'analisi immunoistochimica su preparati istologici cerebrali, ha evidenziato la loro presenza anche nel citoplasma dei neuroni.

Nei pre-mRNA la ripetizione esanucleotidica espansa si può localizzare in due siti: a livello della regione promotrice (V1) oppure nel primo introne (V2 e V3).

Il meccanismo attraverso il quale questa ripetizione determina il fenotipo FTD-MND, sembra essere associato ad un'interferenza con i normali processi di espressione della proteina *C9orf72*, ossia in modo trascrizionale-specifico. Mediante analisi quantitativa degli mRNA è stato verificato che nell'allele mutato, l'espansione delle ripetizioni, abolisce l'espressione della variante V1, portando così anche a una drastica diminuzione dei livelli proteici dell'isoforma A, i cui effetti sono però ancora da determinare. Alle proteine *C9orf72* infatti, oltre che non essere state ancora caratterizzate, non è stata attribuita nemmeno una funzione nota. Quel che è certo è che si tratta di proteine altamente conservate in diverse specie [206].

Foci neurotossici costituiti dalle varianti descritte, sono state individuate con anticorpi commerciali, nel 25% dei nuclei di cellule nervose sia della regione corticale frontale sia nel midollo spinale, appartenenti a pazienti portatori dell'espansione. Al contrario lo stesso segnale è stato rilevato solo nell'1% di cellule ottenute da pazienti non portatori. Per queste ragioni è stata ipotizzata anche un effetto dell'espansione nel promuovere l'aggregazione degli mRNA. È doveroso sottolineare che poiché non esiste ancora una buona conoscenza della struttura molecolare della proteina, nelle analisi svolte sono stati utilizzati anticorpi non ancora altamente specifici. I risultati fin qui raggiunti, permettono l'inserimento dei casi di FTD-MND alla sempre crescente classe di malattie, associate all'espansione di ripetizioni non codificanti, come la Distrofia miotonica (DM1 e DM2), la Sindrome dell'X-fragile associata a tremori ed atassia (FXTAS) e a molte sindromi di atassia cerebrosinali (SCA8, SCA10, SCA31, SCA36) [206]. Tutte queste patologie sono accomunate da un medesimo meccanismo patologico secondo cui: la mutazione presente sugli mRNA determina un loro accumulo in foci a livello nel nucleo e/o del citoplasma delle cellule interessate. Tali depositi a loro volta, sequestrano varie RNA-binding proteins, portando così ad una disregolazione dei normali processi di splicing alternativo.

Dal punto di vista clinico i portatori dell'espansione patologica in *C9orf72* presentano una grandissima variabilità fenotipica che comprende pazienti affetti da FTLN, SLA o FTLN-SLA. Con una frequenza di circa il 30% nei pazienti FTLN-SLA questa mutazione è sicuramente l'unico difetto genico comune a due patologie ad oggi conosciuto. Indipendentemente dalla presenza di SLA, il fenotipo clinico di FTLN maggiormente coinvolto è quello comportamentale, ma sono stati descritti anche casi di PPA.

Inoltre negli ultimi mesi sono stati pubblicati lavori che hanno messo in evidenza la presenza di sintomi psicotici e disordini ossessivo - compulsivi in pazienti affetti da FTLN e portatori dell'espansione esanucleotidica [222].

La media dell'età d'insorgenza si aggira intorno ai 55-58 anni posizionandosi vicino alla media dell'età d'insorgenza dei casi di FTLN con mutazione in *MAPT* e *GRN*.

Come in questi casi vi è però una grande variabilità nell'età d'insorgenza, anche tra individui della stessa famiglia. Come in tutte le malattie causate da un'espansione

genica l'età d'insorgenza diminuisce con il progredire delle generazioni; infatti nelle generazioni più giovani la malattia può insorgere fino a sette anni prima.

1.3.4.4 VCP-1

Mutazioni autosomiche dominanti nel gene *VCP-1*, posizionato sul braccio lungo del cromosoma 9p21-12, sono state identificate tramite un'analisi di linkage in famiglie affette da una rara sindrome familiare di miopatia a corpi inclusi (IBM), dal Morbo di Paget oltre che da FTLD.

Ad oggi sono state riportate 17 mutazioni causali di malattia in 41 famiglie indipendenti. E' stato osservato un fenomeno di penetranza incompleta per tutte e tre le manifestazioni cliniche interessate.

Il gene *VC-1P* codifica per una proteina espressa in maniera ubiquitaria che funziona da chaperone molecolare in una varietà di attività cellulari, tra cui la degradazione delle proteine, l'apoptosi, il ciclo cellulare, la riparazione del DNA ed il rimodellamento delle membrane cellulari.

L'ipotesi più accreditata del meccanismo patogenetico delle mutazioni in *VCP-1* risiede nella capacità di interferire con il sistema del proteosoma legato all'ubiquitina che porta a una diminuzione della degradazione proteica e a un danneggiamento del sistema autofagico.

I pazienti con mutazioni in questo gene presentano anche inclusioni della proteina TDP-43 soprattutto in regioni neocorticali, comunque tali varianti patologiche sono molto rare; infatti sono state riscontrate in meno del 1% dei casi familiari di FTLD, e più frequentemente nella bvFTD e nella SD. E' interessante ricordare che un unico studio ha segnalato la presenza di mutazioni in *VCP-1* nel 1-2% di casi affetti da SLA senza sintomi di demenza[194]

1.3.4.5 CHMP2B

Un'analisi di linkage su una famiglia danese molto ampia affetta da FTLD ha identificato una mutazione nel gene *CHMP2B* che è localizzato sul cromosoma 3p11.2.

In letteratura solo 4 differenti mutazioni sono state riportate, tutte individuate tra o dentro gli esoni 5 e 6 e descritte in 5 famiglie totali (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>) [194].

CHMP2B codifica per una proteina facente parte del complesso ESCRT III, che è coinvolto nella formazione dell'endosoma tardivo, il quale si deve fondere con il lisosoma al fine di riciclare o degradare le proteine. Tale gene è espresso nei neuroni presenti nella maggior parte del cervello, e le mutazioni responsabili della patologia sono state tutte identificate nella parte di gene che codifica per la porzione C-terminale della proteina, portando a un processo di splicing aberrante. Si ottengono così neuroni che presentano vacuoli enormi che impediscono la fusione dell'endosoma con il lisosoma.

Dal punto di vista neuropatologico pazienti con queste mutazioni si presentano come FTLD-U ossia positivi per l'ubiquitina, ma negativi per le inclusioni *TDP-43* [223]. Clinicamente invece i pazienti presentano una diagnosi di bvFTD in cui si hanno cambiamenti della personalità molto precoci. Spesso è stata diagnosticata anche la presenza di afasia anche se non è mai stata fatta una diagnosi precisa di PNFA, SA o LPA. L'afasia è caratterizzata prevalentemente da una riduzione

drastica dell'eloquio spontaneo che porta addirittura al mutismo. La media dell'età d'insorgenza nei pazienti affetti è di circa 58 anni con un range di età che va dai 45 ai 65 anni.

1.3.4.6 TARDBP e FUS

Mutazioni nei geni *TARDBP* (cromosoma 1) e *FUS* (cromosoma 16) sono state prevalentemente riscontrate in pazienti affetti da SLA. Inizialmente le mutazioni nel gene *TARDBP* sono state considerate diretta conseguenza degli aggregati della proteina TDP-43 presenti nei motoneuroni di pazienti affetti da SLA senza mutazioni nel gene *SOD-1* e in pazienti FTLD-U.

La più comune manifestazione fenotipica associata con le mutazioni in *TARDBP* risulta nel 5% delle forme familiari di SLA, ma sono noti anche casi di parkinsonismo con disfunzioni del motoneurone; più raramente sono state descritte anche in pazienti FTD e FTD-MND.

TDP-43 è una proteina che lega l'RNA a formare il complesso eterogeneo ribonucleoproteico (hnRNP), il quale è coinvolto in diverse attività di processazione del RNA tra cui la trascrizione, lo splicing e il processo di maturazione dei miRNA.

Le mutazioni riportate in letteratura tendono a colpire soprattutto la regione C-terminale della proteina, normalmente ricca in glicina e responsabile delle interazioni proteina-proteina.

Come *TARDBP* anche *FUS* è un membro della famiglia hnRNP; è localizzato sul cromosoma 16p11.2 e tale posizione fa di lui un eccellente gene candidato a spiegare il linkage genetico di questo cromosoma con numerose famiglie di pazienti affetti da SLA. Anche se *FUS* rappresenta un gene coinvolto nella patogenesi della SLA, un'analisi mutazionale che ha riguardato 122 pazienti con FTLD ha portato all'identificazione di una nuova mutazione (p.Met254Val) in un paziente con diagnosi clinica di bvFTD. Successivamente Analisi in silico hanno predetto che tale variante missenso potrebbe avere un ruolo patogenetico nell'insorgenza della malattia anche se la rilevanza biologica di tale scoperta rimane elusiva[194].

1.3.4.7 Fattori di rischio genetico

A differenza di altre malattie neurodegenerative complesse come per esempio l'AD, poco si conosce sui fattori di suscettibilità che potrebbero aumentare il rischio di insorgenza della FTLD[194].

Questo è sicuramente dovuto al fatto che in questa malattia è presente una forte componente ereditaria familiare e che quindi molti studi pubblicati hanno avuto come obiettivo primario l'identificazione di geni causali di malattia. E' importante ricordare che l'elevata eterogeneità clinica della FTLD non aiuta di certo lo svolgimento di studi genetici su larga scala i quali hanno invece bisogno di una popolazione campione molto omogenea.

Un'eccezione a questo tipo d'impostazione è stato sicuramente il primo studio GWA pubblicato nel 2010 che ha coinvolto una serie di 515 pazienti affetti da FTLD-TDP e che ha portato all'identificazione del gene *TMEM106b* posizionato sul cromosoma 7p21. In particolare tre SNPs sono stati correlati con un aumento del rischio di insorgenza della FTLD e tale risultato è stato replicato in una serie meno ampia e più selezionata di soggetti[208].

Inoltre è stato osservato che *TMEM106b* potrebbe aumentare il rischio soprattutto in quei pazienti portatori di mutazioni in *GRN* probabilmente modulando i livelli di secrezione di tale proteina[224]. È interessante ricordare che *TMEM106b* è stato anche recentemente associato a declino cognitivo in alcuni casi di SLA.

TMEM106b è una proteina integrale di membrana di tipo 2 a funzione ancora ignota, localizzata nei lisosomi e negli endosomi tardivi.

Gli aplotipi associati all'aumento del rischio d'insorgenza di FTLD potrebbero agire attraverso l'alterazione dell'espressione del gene nel cervello anche se sono necessari ulteriori studi che confermino tale dato.

È stato osservato che un aumento dei livelli di espressione di *TMEM106b* è correlato all'inibizione di un enzima presente nei vacuoli cellulari, H⁺-ATPase. Questo dato potrebbe fornire un link molecolare tra *TMEM106b* e *GRN*, dato che un aumento dei livelli di espressione di quest'ultima sono correlati all'inibizione della H⁺-ATPase[225].

Nel corso degli ultimi anni sono stati svolti moltissimi studi di associazione su geni candidati che hanno dimostrato la presenza di un'associazione genetica tra la FTLD e altri geni. Ad esempio in una serie di pazienti affetti da FTLD-U non portatori di mutazioni in *GRN* è stata localizzata una variante presente nel 3'UTR del gene, all'interno del sito di binding del miR-659; tale SNP, rs5848, ha dimostrato di essere il maggior fattore di rischio d'insorgenza della FTLD-U. In vivo i portatori omozigoti per l'allele T presentano una drastica riduzione dei livelli di *GRN*, suggerendo la presenza di un meccanismo patogenetico simile ai soggetti portatori di mutazioni[160].

ApoE4 è il fattore di rischio meglio conosciuto nei casi di AD sporadico a tarda età d'insorgenza, ma esistono dati contrastanti anche riguardo a un suo possibile ruolo nell'insorgenza della FTLD. Infatti numerosi studi hanno suggerito un'associazione tra FTLD e *ApoE4* [226], anche se altri autori non hanno invece confermato questi dati [227]. Questa diversità tra le informazioni riportate in letteratura, potrebbe essere spiegata grazie a una recente scoperta che mette in relazione la FTLD ed *ApoE4* nei maschi, ma non nelle femmine. Tuttavia in tutti gli studi finora condotti, il rischio conferito dalla presenza dell'allele *ε4* nei soggetti affetti da FTLD sembra essere più basso rispetto al rischio di sviluppare AD.

Per quanto riguarda il ruolo dell'allele *ApoE2*, Bernardi e collaboratori nel 2006 hanno mostrato un suo effetto protettivo verso la FTLD [228], mentre altri autori non hanno confermato questi dati.

Da quanto emerso in letteratura, altri possibili fattori di rischio per le FTLD sono stati individuati in alcuni polimorfismi presenti in *MAPT* [228], nel gene che codifica per la *NOS3* e in quello per la *NOS1*; nel gene *BAG1* (BCL2-associated athanogene 1), un fattore anti-apoptotico che interagisce con la proteina tau e regola la sua degradazione mediante proteasoma. Al contrario è noto un polimorfismo nel gene *MCP-1* (Monocyte Chemoattractant-1 gene) che costituisce un fattore protettivo.

2 SCOPO DELLA RICERCA

L'AD e la FTLD sono due patologie multifattoriali ad eziologia complessa, caratterizzate dal punto di vista neuropatologico da un'importante perdita neuronale che comporta la comparsa di gravi deficit cognitivi; tali malattie presentano anche un elevato livelli di infiammazione che promuove la formazione di radicali liberi e l'insorgenza di uno stato di stress ossidativo.

Entrambe le patologie riconoscono casi familiari, ereditati con modalità autosomica dominante e in cui è frequentemente identificabile la presenza di una mutazione causale a livello di specifici geni (*APP*, *PSEN1* e *PSEN2* per AD; principalmente *MAPT*, *GRN* e *C9orf72* per FTLD).

Nei restanti casi, denominati sporadici e che costituiscono la maggioranza dei pazienti, non è identificabile un unico fattore eziopatogenetico, ma un insieme di fattori, genetici e ambientali, che contribuiscono in misura differente al determinismo della patologia.

Recenti studi di Genome Wide Association (GWAS) hanno permesso di identificare una regione di linkage sul cromosoma 12 come una delle più attendibili per la suscettibilità di sviluppo dell'AD[150]. Alcuni SNPs in differenti geni localizzati sul cromosoma 12 (*A2M*, *LRP1*, *CP2* e *OLR1*) potrebbero avere un ruolo come markers biologici per un aumentato rischio di sviluppo di tale patologia.

Tra questi, il recettore della lipoproteina a bassa densità (LDL) ossidata (*OLR1*) è presente abbondantemente nel cervello e la sua espressione è favorita da citochine infiammatorie, stress ossidativo o patologie diffuse come l'ipertensione e il diabete. Lo SNP rs1050283 (C/T) è situato nella regione 3'UTR del gene e in particolare è localizzato nel sito di binding di un miRNA, l' hsa-miR-369-3p.

I miRNA sono piccoli RNA (circa 22 nucleotidi) non codificanti a funzione regolatoria. Essi legano la porzione 3' UTR di geni target e inibiscono la traduzione di mRNA che vengono successivamente degradati. Recentemente molti lavori hanno dimostrato che i miRNA giocano un ruolo importante nello sviluppo del sistema nervoso centrale dei mammiferi e in particolare sono implicati nella formazione delle sinapsi e nel mantenimento della plasticità neuronale.

Inoltre sono coinvolti nella risposta allo stress neuronale ed in molte altre importanti funzioni neurobiologiche.

Per questo motivo una perdita nella regolazione dell'espressione dei miRNA potrebbe contribuire alla formazione di fenomeni neurodegenerativi e alla progressione di patologie quali l'AD.

Nel 2010 il primo GWAS effettuato su 515 soggetti affetti da FTLD con patologia TDP-43 positiva, ha evidenziato un'associazione significativa con tre SNPs, localizzati a livello di un unico blocco di linkage disequilibrium presente sul cromosoma 7p21[208]. In questa porzione cromosomica è situato il gene *TMEM106b*, che potrebbe essere coinvolto nell'aumento del rischio di sviluppo della malattia attraverso un'alterazione dell'espressione di *GRM*[224,225].

Date queste premesse, gli obiettivi di questo lavoro sono stati:

1. Effettuare uno screening genetico sulla popolazione di pazienti affetti da AD e da FTLD, al fine di identificare le forme a trasmissione autosomica dominante. A tal proposito sono stati selezionati e analizzati i più frequenti geni causali noti

2. in letteratura, che sono *PSEN1*, *PSEN2* e *APP* per quanto riguarda l'AD e *MAPT*, *GRN* e *C9orf72* per i soggetti affetti da FTLD.
3. In seguito, analizzare e studiare l'eterogeneità fenotipica associata a delle mutazioni identificate per alcuni dei pazienti risultati portatori e di cui è stato possibile ricostruire la storia familiare raccogliendo anche il materiale genetico di diversi membri della famiglia d'origine.
4. Eseguire, sulla restante popolazione sporadica di pazienti affetti da FTLD e AD, studi di associazione di tipo caso-controllo utilizzando l'approccio del gene candidato posizionale e funzionale. Pertanto è stato scelto di studiare la variabilità genetica associata al gene *GRN* sia nella popolazione FTLD sporadica sia nei pazienti affetti da AD. Inoltre per quest'ultimo gruppo di soggetti è stato valutato il contributo, come fattori di suscettibilità genetici, di altri due geni risultati interessanti in base alla letteratura, che sono *OLR1* e *TMEM106b*. Per quanto riguarda il primo candidato è stata effettuata anche un'analisi dei livelli di espressione nelle PBMC del suo miRNA regolatore, hsa-miR-369-3p, al fine di correlarli con i livelli di espressione del mRNA di *OLR1* stratificando i risultati in base alla presenza dell'allele C dello SNP rs1050283. La possibile rilevanza funzionale della variabilità genetica presente nel gene *TMEM206b* è stata determinata mediante dosaggio ELISA di molecole come GRN, potenzialmente influenzate da tale variabilità.

A tal fine sono state reclutate le seguenti popolazioni:

- ✓ 443 pazienti con diagnosi clinica di AD probabile diagnosticati secondo i criteri NINCDS-ADRDA [11].
- ✓ 300 pazienti con diagnosi clinica di FTLD secondo i criteri proposti da Neary e collaboratori e pubblicati nel 1998 [163]. Per quanto riguarda lo screening genetico di *C9orf72* nella FTLD, è stato possibile reclutare una casistica molto più ampia raccogliendo materiale genetico proveniente da diversi Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale per un totale di 651 pazienti. Inoltre sono stati inclusi nello screening anche 21 pazienti affetti da CBS e 31 pazienti affetti da PSP diagnosticati secondo i criteri correnti[164].
- ✓ una popolazione controllo costituita da 393 volontari di pari età i quali non presentavano nessun disturbo neurologico o psichiatrico.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Arruolamento della popolazione oggetto dello studio

E' stata reclutata una popolazione composta da 443 pazienti con diagnosi di AD, 300 pazienti con diagnosi di FTLD e 393 volontari sani di pari età e genere i quali non presentavano nessun tipo di disordine neurologico o psichiatrico. Per quanto riguarda lo screening genetico di *C9orf72* nella FTLD, è stato possibile reclutare una casistica molto più ampia raccogliendo materiale genetico proveniente da diversi Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale per un totale di 651 pazienti. Inoltre sono stati inclusi nello screening anche 21 pazienti affetti da CBS e 31 pazienti affetti da PSP diagnosticati secondo i criteri correnti.

Tutti i dati relativi a pazienti e controlli sono riassunti nella Tabella 4.

	Controlli sani	AD	FTLD	CBD	PSP
Numero dei Soggetti	393	443	651	21	31
Genere (M : F)	155:238	152:291	311:340	7:14	16:15
Età media d'esordio (anni ± SEM)		74 ± 0,4	66,2±8,6	64±7,4	61±7,9
Durata media di malattia (anni ± SEM)		3,21± 0,22			
Portatori allele ApoE ε4 (%)	68(17,3)	199(50,6)*			

$p < 0,001$ (OR: 4,1; CI: 2,56-6,57)

Tabella 4: Caratteristiche dei pazienti e dei controlli inclusi nello studio

Tutti i soggetti afferiti all'Unità Valutativa Alzheimer dell'Ospedale Maggiore, dell'Ospedale S. Raffaele (Milano), dell'Ospedale L. Sacco (Milano), dell'Azienda Regionale di Neurogenetica (Lamezia Terme, Catanzaro), della Casa di Cura Santa Maria (Castellanza, Varese) e dell'Università di Firenze, Torino, Roma e Padova, hanno seguito un iter diagnostico costituito da: accurata anamnesi familiare, esame obiettivo neurologico, test laboratoristici di routine, valutazione neurocognitiva (per valutare memoria, linguaggio e prassia), risonanza magnetica (MRI: Magnetic Resonance Imaging) oppure tomografia computerizzata (TC) e, all'occorrenza, tomografia computerizzata ad emissione di positroni (PET: Positron Emission Tomography). Il grado del deficit cognitivo è stato valutato con il Clinical Dementia Rating (CDR) e il punteggio del MMSE. La durata di malattia è stata definita come il tempo (in anni) intercorso fra i primi sintomi, riportati sia dal paziente sia dai familiari, e la diagnosi clinica. La presenza di un danno vascolare è stata esclusa (Hachinsky Ischemic Score <4).

La diagnosi di AD è stata fatta secondo i criteri NINCDS-ADRDA [11].

La diagnosi di FTLD è stata effettuata seguendo i criteri proposti da Neary e collaboratori [163] e le successive revisioni [164,165,166]. Il grado del deficit

cognitivo è stato valutato con il Clinical Dementia Rating (CDR), il Mini Mental State Examination (MMSE), il Frontal Assessment Battery (FAB), il Wisconsin Card Sorting Test (WCST), e il Tower of London test.

Nello stesso periodo sono stati reclutati anche 393 controlli, fra cui volontari (parenti non consanguinei dei pazienti) e soggetti che avevano seguito lo stesso iter diagnostico dei pazienti e per i quali, dalle analisi effettuate, erano state escluse malattie dementigene. Inoltre, anche dopo follow-up di 12 mesi, questi soggetti erano risultati cognitivamente normali. Soggetti con depressione e/o problemi di tipo psichiatrico sono stati esclusi dallo studio. Inoltre sono stati scelti in modo che non differiscano significativamente dai pazienti per etnia, età e sesso ($p > 0.05$). Il consenso informato per partecipare allo studio è stato dato a tutti i soggetti reclutati o dai loro parenti.

3.2 Purificazione del DNA genomico da sangue intero

Il DNA è stato estratto a partire da un prelievo di sangue venoso di circa 7ml, raccolto in provette vacutainer contenenti EDTA. Prima dell'estrazione, i campioni sono stati congelati per diversi giorni ad una temperatura di -30°C , in modo da facilitare la lisi dei leucociti. In seguito, il DNA genomico è stato estratto impiegando il kit FlexiGene (Qiagen). Il protocollo, fornito dalla casa produttrice, prevede nel dettaglio i seguenti passaggi:

- Si pipetta il Buffer FG1 (di lisi) in una falcon da 50 ml. Si aggiungono i 7 ml di sangue intero e si vortexano per miscelare il tutto.
- Si centrifuga per 30 minuti a 2500 rpm a 10°C . La centrifugazione permette la separazione delle proteine (ed anche altre macromolecole e strutture subcellulari) in base alle loro dimensioni (e alla loro forma), sottoponendole ad alti campi gravitazionali all'interno di una provetta posta in un'ultracentrifuga.
- Dopo aver eliminato il sovrantante, si aggiunge il Buffer FG2 Protease (Buffer di denaturazione) e si vortexa immediatamente; si suddivide quindi il volume totale della miscela in eppendorf da 1,5 ml.
- Si incuba a 65°C per 10 minuti in bagnetto termico: il colore del campione vira da rosso a verde oliva, a indicare l'avvenuta digestione delle proteine.
- Si aggiunge l'isopropanolo (100%), si mescola finché il DNA precipita e diviene visibile in forma di grovigli o di un blocchetto.
- Si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm a temperatura ambiente.
- Si elimina il sovrantante.
- Si aggiunge l'etanolo 95 % e si vortexa per 5 secondi.
- Si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm a temperatura ambiente.
- Si elimina il sovrantante.
- Si lascia asciugare all'aria il pellet di DNA finché tutto il liquido sia evaporato (almeno 5 minuti).
- Si aggiunge il Buffer FG3 (buffer di idratazione), si vortexa per 5 secondi a bassa velocità e si risospende il DNA incubandolo per un'ora a 65°C in bagnetto termico.

La quantità di DNA per ogni campione è stata determinata misurando la densità ottica con uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm.

I campioni di DNA sono stati aliquotati e congelati a -20°C .

3.3 Sequenziamento diretto dei geni *MAPT*, *GRN* e *PSEN1*

Le sequenze dell'esone 1 e dal 9 al 13 del gene *MAPT* sono amplificate e sequenziate attraverso l'utilizzo di specifici primers, come descritto in precedenti lavori [229,230].

Per il gene *GRN*, invece, le regioni codificanti dall'esone 1 all'esone 12, le regioni introniche adiacenti, l'esone 0 e la parte non codificante della regione non tradotta del 3'UTR sono state amplificate utilizzando primers specifici descritti in altri lavori precedenti [231] e sequenziati in entrambe le direzioni.

Per il gene *PSEN1* sono stati amplificati tutti i 12 esoni che lo costituiscono, tramite l'utilizzo di primers specifici come descritto precedentemente [232].

Oggi è possibile sequenziare un frammento di DNA target, dopo la sua amplificazione mediante reazione di PCR. L'approccio più utilizzato per la ricerca di mutazioni specifiche, dopo l'avvento delle nuove tecnologie Illumina, è quello secondo il metodo di Sanger, il quale si basa sul processo di terminazione della catena neo-sintetizzata con i di-deossi nucleotidi (ddNTP). Tale variazione è conosciuta col nome di cycle-sequencing. I ddNTPs sono molecole molto simili a deossiribonucleotidi (dNTPs) ma mancano dell'ossidrile nel carbonio 3', per cui possono essere incorporati in una catena di DNA durante la fase di sintesi, ma ad essi non possono essere legati altri dNTP. Quindi se un "di-deossi" viene per caso incorporato nella catena nascente di DNA, l'ulteriore allungamento (generalmente per esterificazione dell'ossidrile 3') viene bloccato e la reazione termina. Ecco perchè i di-deossi sono chiamati anche "terminatori di catena".

Nella pratica vengono allestite contemporaneamente 4 reazioni in parallelo, ciascuna contenente una delle 4 basi sotto forma di di-deossi marcati con fluorofori, in concentrazione molto debole; la miscela di reazione comprende anche: il template, la DNA polimerasi, i dNTP e un primer di sequenza che funge da innesco per la polimerasi. La polimerasi genera, a partire dal primer, un filamento complementare allo stampo, che si estende per una lunghezza indefinita a valle del primer. Se nel frammento amplificato viene inserito un ddNTP, la reazione di allungamento non può procedere e la sintesi si arresta. Dal momento che questo nucleotide è presente in una concentrazione molto bassa esso verrà incorporato molto raramente e in modo casuale. Statisticamente si otterranno così tanti frammenti abortivi quante sono le volte in cui le basi corrispondenti sono rappresentate nel pezzo di DNA in questione.

Una volta terminata la reazione di PCR, la dimensione dei frammenti viene stimata attraverso un processo di elettroforesi capillare del DNA, marcato con molecole fluorescenti. Infatti lo strumento di sequenziamento è provvisto di:

- un sistema di 4 capillari, entro i quali un particolare polimero funziona da matrice per la separazione elettroforetica di singoli frammenti;
- di un laser che eccita continuamente e per tutta la lunghezza del capillare i vari cromofori legati ai prodotti di PCR ed ai frammenti dello standard;
- una camera CCD (charge-coupled device) che registra i segnali di emissione;
- un fotomoltiplicatore che converte i segnali luminosi in segnali elettrici (digitali);
- un pacchetto di softwares che opera la raccolta, il processamento, l'estrazione e la conversione in elettroferogramma. Il dato in uscita è quindi rappresentato da una serie di picchi ciascuno dei quali corrisponde ad un frammento di lunghezza diversa.

Come anticipato, per il primo passaggio di lavoro ci si è dedicati all'amplificazione del DNA genomico d'interesse, isolato da sangue periferico. Le miscele di reazione vengono preparate per ciascun campione aggiungendo: 1 μ l di DNA genomico, 5 μ l di buffer, 4 μ l di dNTPs (mix), 37.3 μ l di H₂O, 0.2 μ l di Taq polimerasi e 2.5 μ l di primers specifici per l'esone di ciascun gene (forward e reverse) per un totale di 50 μ l. Le reazioni di amplificazione vengono condotte utilizzando il protocollo di PCR touchdown. Questo protocollo di PCR prevede la denaturazione del doppio filamento di DNA a 94°C per 5 minuti e la ripetizione di 35 cicli di reazione, divisi in due parti. La prima parte viene ripetuta per 10 cicli ciascuno composta da: 30 secondi a 94°, 30 secondi a 50°-60° e 40 secondi a 72°C. La seconda parte della reazione consiste nella ripetizione di 25 cicli ciascuno composto da: 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C, 40 secondi a 72°C e infine 10 minuti a 72°C. Il protocollo di PCR touchdown costituisce un modo per aumentare la specificità della reazione di amplificazione. La maggior parte dei termociclatori può essere programmata per effettuare cicli in cui la temperatura di appaiamento venga abbassata progressivamente durante le varie fasi della PCR. Mantenendo inizialmente molto alta la stringenza dell'ibridazione (per le alte temperature di appaiamento), si scoraggia la formazione di aspecifici, consentendo alla sequenza desiderata di predominare poiché man mano che si abbassano le temperature come previsto dal protocollo termico scelto, viene amplificato massivamente ciò che si è legato al primer. Contemporaneamente tali condizioni favoriscono il fatto che diverse regioni, che pertanto potrebbero avere diverse temperature ottimali di annealing dei primer, possano essere amplificate tutte nella stessa seduta di analisi.

I frammenti amplificati vengono poi purificati impiegando il kit ExoSAP-IT (usb, USA) secondo le specifiche indicate dal produttore e successivamente viene allestita la reazione di terminazione che impiega il kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (kit Applied Biosystem, Warrington, UK). In dettaglio la miscela di reazione viene preparata aggiungendo 3 μ l di Buffer, 0.8 μ l di Big Dye Terminator v 3.1, 0.8 μ l di ciascun primer e 9.3 μ l di H₂O per un volume totale di 20 μ l. Il protocollo di reazione di PCR prevede la ripetizione di 25 cicli. Ciascuno di questi è composto da 30 secondi a 96°C, 20 secondi a 50°C e 3 minuti a 60°C.

Successivamente è stata eseguita la fase di precipitazione mediante sodio acetato 3M (vengono aggiunti 55 μ l a ciascun campione), il tutto viene centrifugato per 20 minuti a 12000 rpm dopo aver lasciato il tempo al sodio acetato di agire (10 minuti a temperatura ambiente). Infine per la fase di lavaggio sono stati aggiunti 150 μ l di etanolo che vengono eliminati subito. Dopo l'aggiunta di formamide i campioni vengono caricati nel sequenziatore (ABI PRISM 3130 gene analyzer, Applied Biosystems), per l'analisi genica.

La presenza di varianti alleliche e le sequenze ottenute sono state determinate utilizzando il software SeqScape versione 2.5 (Applied Biosystems).

3.4 Genotipizzazione delle ripetizioni esanucleotidiche in C9orf72

Per fornire una valutazione qualitativa sulla presenza o meno di un'estesa regione espansa ripetuta (GGGGCC) in C9orf72, abbiamo eseguito una reazione di PCR, secondo il protocollo descritto in precedenza [206,233]. I primers utilizzati sono:

- ✓ GGGGCC forward: 5-CAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC-3
- ✓ GGGGCC reverse: 3-GCAGGCACCGCAACCGCAG-5.

La reazione è stata svolta in un volume finale di 25 μ L, così costituiti:

Buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L

GC-Rich 5 μ L

Mix (oligo: A,T e C) 2.5 μ L

7-Deaza -2-desossi GTP (2.5 mM) 2.5 μ L

Primer (20pM) 2.5 μ L

DMSO 1 μ L

Taq polimerasi 0.2 μ L

DNA (concentrazione madre) 1.5 μ L

H₂O 7.3 μ L

I prodotti separati sono stati separati su gel di agarosio al 3.5%.

Le bande visualizzate vengono interpretate come segue:

- se si ottengono 2 bande con P.M di 138bp, il paziente è ritenuto verosimilmente sano, contiene cioè un numero limitato di espansioni non superiori a 30 ripetizioni (come descritto da DeJesus-Hernandez e collaboratori), su entrambi gli alleli;

- se si ottiene un'unica banda con P.M di 138 pb, si presume che durante il crossing-over meiotico si sia generato un allele wt (con un numero di ripetizioni inferiori a 30) mentre l'altro sia costituito da un numero di ripetizioni talmente ampio da non essere neppure amplificato durante la PCR di pre-screening e quindi conseguentemente non visualizzato su gel. In altre parole è possibile che il campione in analisi presenti una quantità patologica di espansioni. In tali circostanze, si sceglie perciò di procedere con il sequenziamento [206].

3.5 Repeat Primed PCR ed analisi dei frammenti per la rilevazione dell'espansione in C9orf72

Questa metodica prevede l'amplificazione dell'espansione GGGGCC, mediante l'utilizzo di una miscela di tre primers, secondo quanto descritto in precedenti studi [234]:

1. P1, primer forward marcato in 5' con un fluoroforo (FAM), di 41pb;
2. P2 e P3, entrambi primer reverse, rispettivamente di 54pb e 18pb. P2 e P3 condividono una coda in 5' la cui sequenza viene definita di ancoraggio, poiché non complementare all'espansione. In più P2 dispone alla sua estremità 3' di una sequenza ripetuta per 4 volte, complementare all'espansione in studio [206]. Questo ha l'effetto di favorire il suo legame a siti di ripetizione interni alla regione genomica considerata.

Nella miscela di reazione P2 è in concentrazioni limitanti rispetto a P3 (1:10 molare); per cui durante i primi cicli di amplificazione tutto il primer P2 presente,

tenderà a legarsi stocasticamente in siti espansi multipli e potenzialmente differenti, presenti nella regione d'interesse. Viene perciò generata una miscela di ampliconi con lunghezze differenti, successivamente rilevabili per la presenza della fluorescenza emessa da P1. Il fatto che P2 si esaurisca velocemente nei primi cicli di PCR, permette che nei cicli successivi non vengano amplificati frammenti più corti rispetto a quelli realmente presentati dal paziente in analisi. Dopo le prime fasi di PCR interviene perciò solo l'attività di P3, che grazie alla sua sequenza tende a legarsi all'estremità 3' degli ampliconi precedentemente ottenuti. Inoltre, per favorire le fasi di allungamento dei frammenti (che possono essere potenzialmente molto grandi) viene utilizzato un profilo termico capace di favorire la fase di estensione del primer.

La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 μ L, così costituiti:

Buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L

GC-Rich 5 μ L

Mix (oligo: A, T e C) 2.5 μ L

7-Deaza -2-desossi GTP (2.5 mM) 2.5 μ L

Primer mix 2.5 μ L

Taq Fast Start 0.2 μ L

DNA (concentrazione madre) 1.5 μ L

H₂O 8.3 μ L

Successivamente gli ampliconi ottenuti vengono sottoposti all'analisi dei frammenti. Tale analisi viene effettuata mediante l'utilizzo del sequenziatore (ABI PRISM 3130 gene analyzer, Applied Biosystems) e i dati ottenuti analizzati tramite il software Peak Scanner (ABI). In presenza di un elevato numero di espansioni esanucleotidiche, si ottiene un profilo tipico definito a "dente di sega", dove sono evidenziati i frammenti caratterizzati in ordinata dall'intensità del loro segnale fluorescente ed in ascissa dalla loro lunghezza in bps. I frammenti si ripetono con una periodicità di 6 bps. E' doveroso sottolineare comunque, che la metodologia descritta non è abbastanza sensibile da discriminare più di 60 ripetizioni. Poiché la soglia di patogenicità è stata fissata a 30 ripetizioni (ma ve ne possono essere fino a 1700), il limite metodologico consente allo sperimentatore solo di poter discriminare tra pazienti sani e pazienti portatori di un numero patologico di ripetizioni.

3.6 Analisi mutazionale tramite High Resolution Melting (HRM)

Tale metodica è utilizzata per determinare mutazioni nel gene *MAPT*; la metodica caratterizza i campioni di DNA in base al loro comportamento di dissociazione nella fase di transizione da DNA a doppia elica a quello a singola elica aumentando la temperatura.

La curva di melting osservata è specifica e caratteristica di un particolare campione di DNA, poiché dipende dalla sua sequenza nucleotidica.

3.7 *Analisi in Silico*

I metodi in silico sono stati sviluppati per predire il potenziale impatto di una sostituzione aminoacidica su struttura e attività proteica.

L'analisi della conservazione evolutiva è stata effettuata usando SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), che permette di stimare la gravità della variazione aminoacidica causata dalla mutazione nucleotidica confrontando sequenze omologhe evolutivamente conservate.

È stato applicato l'algoritmo PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) che tiene conto, oltre che della conservazione evolutiva e dell'impatto della mutazione a livello di sequenza aminoacidica anche della eventuale localizzazione a livello di domini funzionali o strutturali noti. Permette, quindi, di valutare l'impatto strutturale e funzionale della mutazione, ottenendo quello che viene definito "punteggio di tolleranza".

3.8 *Discriminazione della variante allelica mediante tecnologia TaqMan*

Per gli studi di associazione di tipo caso-controllo è stata condotta un'analisi di discriminazione allelica (TaqMan Applied Biosystems 7500 fast) che si basa sull'uso di sonde marcate e fluorescenti e come template DNA a una concentrazione di 50 ng/μl.

In particolare per la genotipizzazione o caratterizzazione delle varianti alleliche sono state utilizzate sonde specifiche e già validate (Assay-on-demand; ABI assay).

Le reazioni sono state eseguite utilizzando 1 μL di DNA in un volume finale di 20μL in piastre da 96 pozzetti con lo strumento ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems).

La miscela di reazione del volume complessivo di 25 μl è stata ottenuta unendo:

DNA genomico 1 μL

Master Mix 12.5 μL

Sonda 1 μL (diluita 1:2 con T.E)

H₂O 10.5 μL

Questa metodica prevede 3 fasi:

1. Pre-read: fase in cui viene analizzato ed eliminato il segnale di fondo determinato dalle componenti della mix di reazione preparata.

2. Amplificazione: si allestisce una reazione di PCR che ha lo scopo di amplificare un frammento contenente lo SNP da analizzare. Si utilizzano i seguenti reagenti: DNA del campione da discriminare, master mix, primers e due sonde fluorescenti appositamente disegnate per discriminare le varianti dello SNP studiato. Queste sonde sono marcate con i fluorofori VIC e FAM, ciascuno associato ad una delle due varianti che costituiscono lo SNP. Il saggio è stato ottimizzato utilizzando DNA alla concentrazione di 25 ng/μl in un volume finale di reazione di 20 μl, in piastre da 96 pozzetti. È stato applicato il seguente profilo termico:

- un ciclo di 10 minuti a 95°C (fase di attivazione)
- 40 cicli di 15 secondi a 95°C (fase di denaturazione del DNA) e 1 minuto a 60°C (fase di annealing/estensione).

Dal punto di vista biochimico, durante la reazione di RT-PCR, le sonde fluorescenti si appaiano specificamente alle sequenze complementari dei frammenti di DNA che si stanno amplificando, precisamente in posizione dello SNP d'interesse. Quindi, durante l'allungamento, la polimerasi sintetizzando il filamento complementare, incontra la sonda appaiata e grazie alla sua attività esonucleasica (5-3) incomincia a degradarla. L'allontanamento di ciascuna sonda appaiata provoca l'emissione di segnale da parte del fluoroforo. La fluorescenza emessa viene quindi rilevata dal sistema ABI prism 700 (Applied Biosystem).

3. Post-read: terminata la fase di amplificazione i campioni vengono analizzati. Attraverso la quantificazione e confronto dell'intensità del segnale fluorescente rilevato in ciascun pozzetto e mediante l'impiego del software in dotazione è possibile determinare l'assetto allelico di ciascun campione nella piastra. All'interno di ciascun pozzetto il software può analizzare 3 situazioni differenti: se è presente un allele wild type, soltanto la sonda con l'allele non mutato è in grado di appaiarsi e quindi di emettere un solo segnale (VIC). Stessa cosa succede nel caso in cui ci sia un allele in omozigosi (in questo caso il segnale emesso è singolo e appartiene all'altro fluoroforo (FAM). Nel caso di una situazione di eterozigosi entrambe le sonde si appaieranno emettendo due segnali. I risultati vengono visualizzati come cluster in base all'intensità del segnale emesso, ciascuno dei quali rappresenterà uno specifico genotipo (Figura 12).

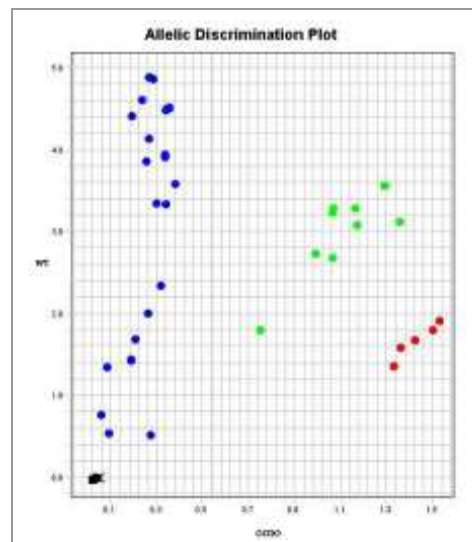


Figura 12: Esempio di visualizzazione dei cluster risultanti dalla discriminazione allelica mediante Tecnologia TaqMan con lo strumento ABI PRISM 7500 Fast

3.9 Genotipizzazione di ApoE

La genotipizzazione per il gene ApoE è stata effettuata in tutti i soggetti reclutati nello studio, utilizzando la tecnica Polymerase Chain reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP).

In breve, tale metodica prevede l'amplificazione del frammento genico nel quale è contenuta la variante nucleotidica da discriminare, la quale deve far parte di un sito di restrizione che successivamente viene riconosciuto da uno specifico enzima. In particolare nel presente studio, 100 ng di DNA sono stati amplificati tramite PCR utilizzando specifici primers di seguito riportati:

- ApoE forward: 5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA-3'
- ApoE reverse: 5'-ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACTACTGCCA-3'.

I cicli di PCR effettuati sono stati i seguenti:

- Step di denaturazione: 95°C per 30"
- Step di annealing: T_m per 30"
- Step di allungamento: 72° per 30"

Questa sequenza è stata ripetuta per 38 volte in un apposito termociclatore (PCR Express, Biorad), utilizzando l'enzima Taq polimerasi del batterio *Thermus aquaticus*, che ha la proprietà di non inattivarsi all'elevata temperatura usata per denaturare le eliche del DNA.

Il prodotto di PCR di 227 bp è stato successivamente sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione *HhaI* (Promega). Infine, i frammenti ottenuti sono stati visualizzati su gel di agarosio al 4%, adeguatamente addizionato di bromuro d'etidio, e le bande visualizzate tramite transilluminatore UV.

3.10 Estrazione RNA totale e Analisi trascrizionale quantitativa

Per lo studio riguardante il gene *OLR1* sono stati prelevati 14 ml di sangue intero in specifiche Vacutainer contenenti Ficoll di 15 controlli e 20 pazienti affetti da AD.

In particolare, dopo una centrifugazione iniziale di 25' a 2500 rpm e due successivi lavaggi di 8' ciascuno in PBS 1%, le PBMC isolate sono state conservate in Trizol (Invitrogen) a -80°C.

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata tramite utilizzo di cloroformio e successivi passaggi di precipitazione con isopropanolo ed etanolo.

La purezza dell'RNA è stata misurata mediante densità ottica, utilizzando spettrofotometro Nanodrop® e solamente campioni con un punteggio OD 260/280 compreso tra 1.8 e 2 ed un OD 260/230 di 1.8 o superiore sono stati usati per lo studio.

L'RNA ottenuto è stato retrotrascritto mediante il kit Ready-To-Go (USB, USA). Per cui una volta estratto l'RNA totale viene retrotrascritto ed arricchito nella quota mRNA presenti.

Successivamente i relativi livelli di espressione sono stati misurati mediante Real Time - PCR con tecnologia TaqMan. Durante l'analisi in RT-PCR verrà isolata solo la componente di mRNA, convertito a cDNA, che è stata precedentemente trascritta utilizzando come stampo la sequenza genica d'interesse, poiché nella miscela di reazione viene inserita la sonda specifica per *OLR1*.

Per l'analisi in RT-PCR (Taqman, Applied Biosystems), il livello di mRNA è stato ricavato mediante confronto tra l'emissione di fluorescenza della sonda relativa al gene d'interesse *OLR1* (Hs234028_m1, Applied Biosystems) e due geni housekeeping quali *18sRNA* e *GADPH* (Hs99999901_s1, Hs99999905_m1, Applied Biosystems). Quindi in questa metodica si può effettuare una quantificazione relativa rapportando la quantità del cDNA d'interesse rispetto a quella di un gene di controllo. Tali risultati possono essere ottenuti grazie all'inserimento nella miscela di reazione di un "reporter" fluorescente il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di amplificazione. A tal proposito viene disegnata la sonda gene-specifica che si appaia nella zona compresa fra i due primer (forward e reverse). La sonda contiene un colorante fluorescente (Reporter) all'estremità 5' ed un colorante spegnitore (Quencher) all'estremità 3'. In condizioni di normale appaiamento sonda-DNA stampo, se il campione viene irradiato, l'energia fluorescente emessa dal colorante ad alta energia in 5' viene assorbita totalmente dal quencher a bassa energia. Per cui fino a quando la sonda resta intatta, la vicinanza tra reporter fluorescente e quencher annulla l'emissione del segnale di fluorescenza perché si verifica un trasferimento di energia dal primo al secondo. Nel momento in cui la DNA-polimerasi, replicando lo stampo, incontra la sonda appaiata al suo interno, grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3', comincia a degradarla. L'allontanamento tra il reporter ed il quencher pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il reporter inizi ad emettere fluorescenza. Quest'ultima incrementerà a ogni ciclo proporzionalmente al tasso di degradazione della sonda. L'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando l'incremento di fluorescenza del reporter e determina la registrazione di una curva con andamento sigmoide. E' possibile quantificare il prodotto ottenuto solo durante la fase esponenziale (fase di amplificazione) della curva di fluorescenza ottenuta, nella quale il primo incremento significativo di prodotti neo-sintetizzati è collegato alla concentrazione iniziale di stampo nel campione. Infatti, maggiore è il numero di copie iniziali dell'acido nucleico, prima si osserverà un incremento significativo della fluorescenza. Il punto della curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare è chiamato ciclo soglia (Ct).

È la sua determinazione a permettere di calcolare la concentrazione del gene d'interesse tramite il metodo $\Delta\Delta CT$, dove (Figura 13):

$$Ct = Ct (\text{gene d'interesse}) - Ct (\text{housekeeping})$$

Le correzioni sui valori di quantificazione sono state eseguite, di volta in volta, amplificando simultaneamente 18s come riferimento e misurando in doppio il cDNA di ciascun campione. Ogni reazione è avvenuta in un volume finale di 20 μ l, usando Master Mix TaqMan universale contenente dNTPs e Taq Gold polimerasi.

I parametri utilizzati sono:

- step attivazione dell'enzima amperasi (UNG) 2' a 50°C per 1 ciclo,
- step attivazione Taq Gold 10' a 95°C 1 per 1 ciclo,
- step di denaturazione 15" a 95°C e 1' a 60°C per annealing ed espansione.

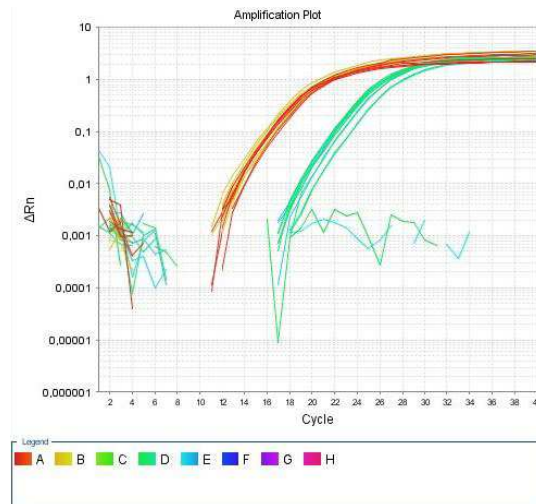


Figura 13: Profilo di espressione dei cDNA analizzati mediante Tecnologia TaqMan.

3.11 Estrazione di hsa-miR369-3p e relativa analisi trascrizionale quantitativa

L'RNA totale arricchito dei microRNA è stato isolato utilizzando il Kit mirVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems) e la concentrazione determinata con NanoDrop ND-3300®.

La retrotrascrizione è stata effettuata mediante utilizzo del Kit TaqMan-MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

In breve la miscela di reazione è composta da: 10 ng di RNA, 0,15 µl di 100mM dNTPs, 1ml di MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/Ml), 1,5 µl di 10X Reverse Transcription buffer, 3 µl di 1X stem-loop RT primer, 0,19 µL di RNase inhibitor 20U/µl, 4,16 µl di acqua nuclease-free in un volume totale di 15 µl. L'incubazione viene effettuata a 16°C per 30 minuti, a 42°C per 30 minuti e a 85°C per 5 minuti in un termociclatore.

L'analisi trascrizionale quantitativa è stata effettuata mediante Real-Time PCR (ABI 7500 FAST) e l'hsa-miR369-3p studiato con un saggio specifico (Applied Biosystems). Come controllo endogeno è stato scelto l'RNU48.

3.12 Dosaggio di GRN plasmatica

I campioni raccolti sono stati inizialmente congelati e mantenuti a -30° fino al loro utilizzo.

Il dosaggio plasmatico di GRN è stato eseguito mediante saggio immunoenzimatico (ELISA) utilizzando un kit commerciale secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice (AdipoGene).

In breve, i campioni vengono dispensati in piastre da 96 pozzetti e incubati con un anticorpo monoclonale specifico per la molecola di cui si vuole determinare la

concentrazione. In seguito, viene aggiunto un secondo anticorpo, rivolto verso un epitopo diverso dal primo. Questo complesso antigene-anticorpo viene poi rilevato da streptavidina legata alla perossidasi. All'anticorpo secondario, infatti, viene aggiunta una molecola in grado di generare una reazione colorimetrica proporzionale alla quantità di GRN presente. Infine viene effettuata una lettura spettrofotometrica a 450 nm che consente di risalire alla concentrazione della molecola per confronto con una curva standard.

3.13 **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Sigma Stat 3.1. Le frequenze alleliche e genotipiche sono state ottenute per conteggio diretto.

Il test Chi Quadro è stato utilizzato per testare l'equilibrio di Hardy-Weinberg e le differenze nella distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche. Lo scopo del test χ^2 è quello di conoscere se le frequenze osservate differiscono significativamente dalle frequenze teoriche.

L'associazione genotipica è stata ottenuta mediante analisi di regressione logistica multivariata corretta per genere ed età tramite SPSS software 13.0, grazie a cui viene calcolato anche l'odds ratio (OR) che rappresenta l'indice del rischio relativo di sviluppare la patologia ed è stato calcolato con il relativo intervallo (CI) del 95%.

Il test Anova è stato applicato per ricercare una differenza statisticamente significativa dell'espressione del gene *OLR1* e *hsa-miR369-3p* tra le popolazioni prese in analisi. In particolare l'analisi della varianza permette di confrontare due o più gruppi di dati confrontando la "variabilità interna" a questi gruppi con la "variabilità tra" i gruppi. La correlazione presente tra i livelli di espressione di *OLR1* e *hsa-miR369-3p* è stata analizzata mediante test di Pearson.

4 RISULTATI

4.1 Screening di mutazioni autosomiche dominanti

La popolazione di pazienti reclutata, composta da 443 pazienti diagnosticati clinicamente con AD e 300 pazienti diagnosticati clinicamente con FTLD, è stata in prima istanza analizzata al fine di individuare la presenza di eventuali mutazioni geniche note, che cadono nei geni tipicamente coinvolti nella AD e nella FTLD. Nel caso particolare dell'AD i geni generalmente associati alle forme familiari della malattia, come *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*, sono causa di malattia ad esordio estremamente precoce (30-50 anni). Al contrario le forme di AD sporadico risultano più tardive, seppur divise in forme EOAD (esordio <65 anni) e LOAD (esordio ≥65 anni).

Nel caso dei pazienti FTLD si è resa necessaria una più attenta analisi, a causa della grande variabilità genetica e fenotipica, associata alle forme familiari di questa malattia. Infatti, come risulta evidente in letteratura, diversi sono i geni candidati causali di malattia, come *MAPT* e *GRN* e di recente scoperta anche l'espansione esanucleotidica in *C9orf72*. Inoltre, il fenotipo clinico è estremamente eterogeneo, così come l'età d'esordio (40-80 anni).

In particolare, tramite sequenziamento diretto, sono stati individuati i seguenti portatori di mutazioni:

- 1 paziente con diagnosi clinica di AD, portatore della mutazione Ala260Val (g.49964C>T) nell'esone 8 di *PSEN1* (età d'esordio 36 anni);
- 16 pazienti portatori di una mutazione in *GRN*:
 - ✓ 14 portatori della mutazione Thr272fs (g.1977_1980CACT) nell'esone 8 (9 diagnosticati clinicamente come bvFTD, 4 con PPA e 1 con FTD/MND); nelle Figure 13 e 14 che seguono, viene confrontata la sequenza genica d'interesse, in un paziente sano ed uno portatore della delezione.

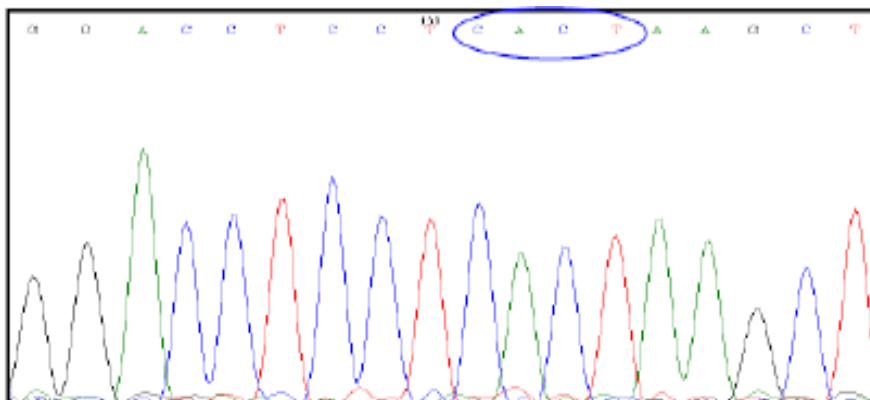


Figura 13: Immagine elettroferografica della sequenza wt.

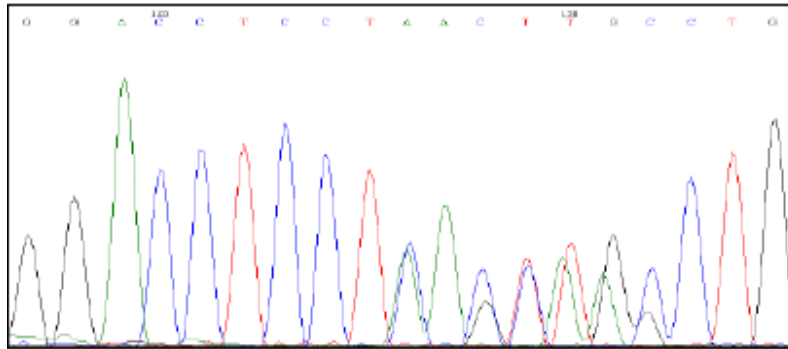


Figura 14: Immagine elettroferografica della sequenza con la delezione c.813-816delCACT

- ✓ 1 portatore della mutazione Asp22fs (g.63_64insC) nell'esone 2 (diagnosticato clinicamente come FTD);
- ✓ 1 portatore della mutazione Arg177His (g.1345G>A) nell'esone 6 (diagnosticato clinicamente con FTD);
- 1 paziente diagnosticato clinicamente come PNFA con normali livelli di GRN plasmatica, portatore di una nuova mutazione Gly304Ser (g123789 G>A) a livello dell'esone 10 di MAPT. Per quanto riportato fino a oggi in letteratura questa è la prima descrizione di tale mutazione missenso la quale comporta una sostituzione aminoacidica da Gly (GGC) a Ser (AGC) a livello del codone 304 (p.Gly304Ser). Tale codone è localizzato in un dominio di legame ai microtubuli. Nelle figure 15 e 16 sono descritte le curve di melting relative alla presenza della mutazione (Figura 15) e la sua localizzazione a livello della proteina (figura16).

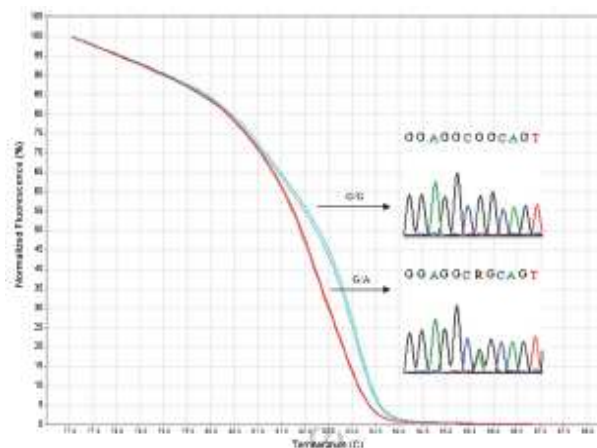


Figura 15. curva di melting normalizzata generata dal software HRM v2.0. L'immagine mostra i due differenti profili termici a seconda della presenza della mutazione Gly304Ser (G/A) o della forma wild type.

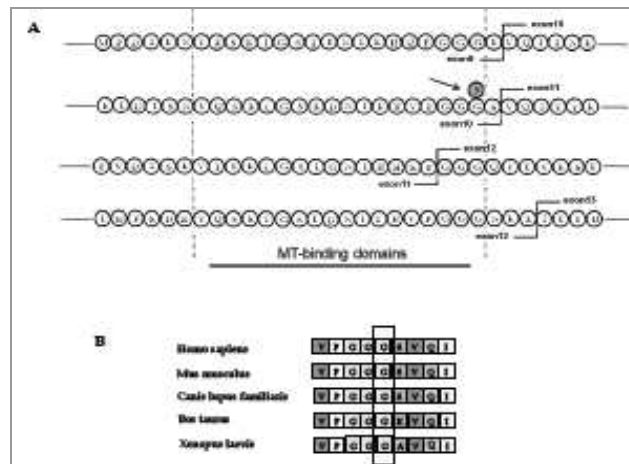


Figura 16. A) Rappresentazione schematica dei 4 domini leganti i microtubuli della proteina tau codificati dagli esoni 9-13. Ogni cerchio rappresenta un aminoacido. Il cerchio grigio rappresenta la mutazione Gly304Ser. B) Allineamento di geni omologhi a MAPT che dimostra la conservazione evolutiva dei residui in questione.

Per escludere che questa variante rappresenti un polimorfismo raro, sono stati analizzati altri 167 pazienti con diagnosi clinica di FTLD e 179 controlli sani mediante analisi HRM; nessuno è risultato portatore della variante allelica descritta. L'effetto della mutazione missenso p.Gly304Ser è stato indagato in silico. Allineamenti multipli di geni *MAPT* omologhi appartenenti a specie differenti hanno indicato che la sostituzione di singola base G>A g.123798 determina l'alterazione di un residuo aminoacidico altamente conservato (Gly, Figura 16B).

L'analisi SIFT ha predetto che la sostituzione aminoacidica di Gly in Ser alla posizione 304 determina conseguenze sulla funzione della proteina (output=0.03;< 0.05 predice una mutazione patologica) e l'analisi Polyphen ha dimostrato come questa sostituzione potrebbe danneggiare sia la funzione che la struttura proteica (PSIC score difference: 1.722).

4.2 Analisi dell'eterogeneità clinica in famiglie portatrici di mutazioni autosomiche dominanti

Come precedentemente descritto nel paragrafo 4.1, un paziente è risultato essere portatore della mutazione Asp22fs (g.63_64insC) dell'esone 2 di *GRN*, una delle numerose mutazioni legate al meccanismo dell'aploinsufficienza. Nonostante questa mutazione sia già stata descritta in un paziente di 65 anni con diagnosi clinica di FTD, non sono disponibili ulteriori dati circa fenotipo clinico, progressione di malattia e distribuzione familiare dei casi. A questo proposito è stato possibile studiare una numerosa famiglia portatrice di tale variante. Nella Figura 17 è rappresentato l'albero genealogico riguardante la famiglia portatrice della variante.

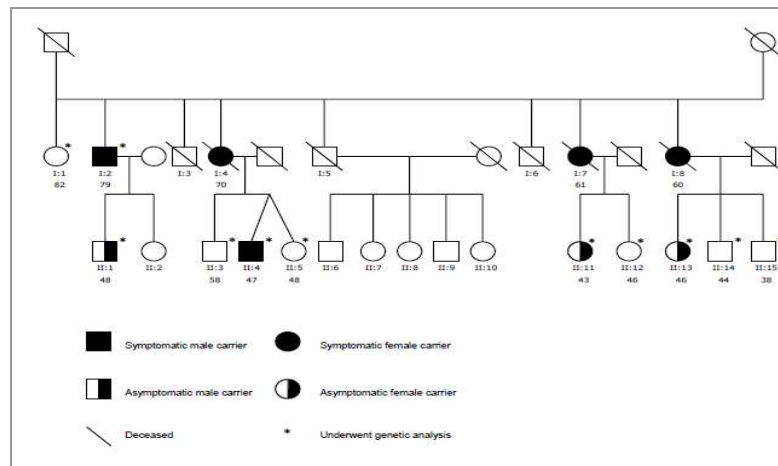


Figura 17: Albero genealogico della famiglia portatrice della mutazione *Asp22fs(g.63_64insC)*

Il probando (II:4) si è presentato all'attenzione del Centro U.V.A. di riferimento all'età di 47 anni lamentando deficit cognitivo da circa un anno. In particolare riferiva difficoltà nei calcoli e frequenti dimenticanze in ambito lavorativo, senza importante impatto ecologico. Da circa due mesi, inoltre, aveva presentato cambiamento di personalità, caratterizzato soprattutto da apatia, impulsività e iperfagia. Non venivano riferite allucinazioni né dispercezioni. L'esame obiettivo neurologico mostrava soltanto lieve bradicinesia senza ulteriori segni di parkinsonismo e un lieve deficit di memoria. I test neuropsicologici rilevavano un profilo cognitivo caratterizzato da un lieve quadro amnesico di tipo visuo-spaziale con moderato interessamento dei meccanismi frontali.

Una PET ha rilevato un ridotto metabolismo glucidico a livello dei talami bilateralmente e dell'emisfero destro. I livelli di β -amiloide, tau e P-tau nei liquor sono risultati nella norma (873 pg/ml, 343 pg/ml e 31 ng/ml rispettivamente). I livelli di Progranulina nel plasma risultavano diminuiti (31 ng/ml) rispetto al valore di normalità (>70 pg/ml). Il genotipo *ApoE* è risultato essere $\epsilon 3/\epsilon 3$, quello di *MAPT* H1/H2. Come anticipato l'anamnesi familiare era positiva per decadimento cognitivo.

La madre (I:4) e una zia materna (I:7) erano esordite all'età di 70 e 61 anni rispettivamente, con deficit mnesici e successivo sviluppo di disturbo del linguaggio; entrambe avevano poi sviluppato disturbo della deambulazione caratterizzato da rigidità agli arti e spasticità ed erano decedute dopo circa 10 anni di storia. Una seconda zia materna (I:8) era esordita all'età di 60 anni con disturbo del linguaggio e alterazione del comportamento, caratterizzato soprattutto da iperfagia e apatia.

Purtroppo non è stato possibile ottenere campioni biologici per l'analisi genetica di queste tre pazienti per cui la presenza della mutazione è solo ipotizzabile.

Uno zio materno del probando (I:2) è giunto all'attenzione del Centro U.V.A. di riferimento all'età di 79 anni lamentando un calo soggettivo di memoria. L'esame obiettivo neurologico era nella norma. I test neuropsicologici hanno dimostrato un

decadimento cognitivo di grado lieve coinvolgente principalmente la memoria e il linguaggio, con punteggi al limite nelle prove di attenzione e di abilità visuospatiale. I livelli liquorali di β -amiloide, tau-totale e tau-fosforilata sono risultati essere nella norma mentre i livelli plasmatici di Prgranulina marcatamente ridotti (13 ng/ml). Anche questo soggetto è risultato essere portatore della mutazione Asp22fs (g.63_64insC). Il genotipo *ApoE* era $\epsilon 3/\epsilon 3$, quello di *MAPT* H1/H1. Nella tabella 5 sono riportate in maniera schematica le caratteristiche dei pazienti sintomatici e portatori della variante descritta.

SOGGETTO	ETÀ D'ESORDIO	MMSE	SEGNI E SINTOMI
<i>II:4</i>	47	24/30	acalculia, deficit di memoria e di attenzione
<i>I:2</i>	79	23/30	deficit di memoria, di attenzione e delle abilità visuospatiali
<i>I:4</i>	70	-	deficit di memoria e di linguaggio
<i>I:7</i>	61	-	deficit di memoria e di linguaggio
<i>I:8</i>	60	-	deficit di linguaggio e cambiamenti comportamentali (iperoralità)

Tabella 5: dettaglio delle caratteristiche dei pazienti sintomatici e portatori della mutazione.

Inoltre è stato possibile studiare anche altri 9 membri asintomatici della famiglia. Tre di questi, con bassi livelli di Progranulina plasmatici, sono risultati portatori della mutazione (*II:1*, *II:11* e *II:13*). Tutti sono più giovani rispetto al probando *II:4*. La variante missenso Gly304Ser nel gene *MAPT* è stata riscontrata in una paziente di 67 anni di età che si era presentata al centro U.V.A. di riferimento lamentando un disturbo del linguaggio caratterizzato da deficit di produzione verbale e di articolazione della parola esordito circa 2 anni prima; negli ultimi tre mesi i familiari avevano notato un rapido peggioramento clinico associato a deflessione del tono dell'umore e isolamento sociale. Al Mini Mental Status Examination (MMSE) somministrato in ambulatorio la paziente otteneva un punteggio grezzo di 23/30 mostrando deficit soprattutto nelle prove di denominazione, e ripetizione di frasi. L'anamnesi familiare era positiva (Figura 18).

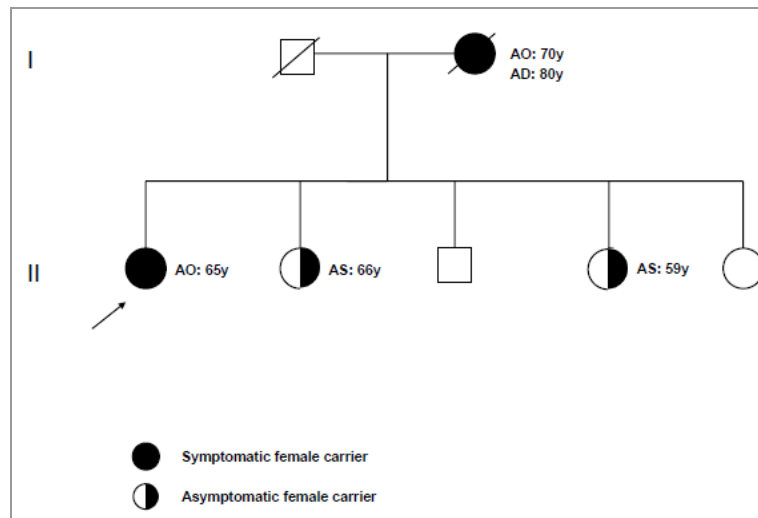


Figura 18: Rappresentazione dell'albero genealogico della famiglia portatrice della mutazione Gly304Ser.

La madre della paziente era stata affetta da demenza; aveva esordito con disturbo del linguaggio all'età di 70 anni; il deficit era in seguito progredito fino all'afasia completa. L'anamnesi patologica remota evidenziava esclusivamente ipertensione arteriosa in terapia dal 2005.

Nel 2008 la paziente è stata ricoverata in regime di Day-Hospital presso la U.O. di Neurologia e sottoposta a un esame neurologico completo, esami ematochimici comprensivi di funzionalità tiroidea e dosaggio di vitamina B12 e folati, test neuropsicologici, TC encefalo e rachicentesi per la titolazione delle proteine Tau, fosfo-Tau e β -amiloide. L'esame neurologico è risultato nella norma, così come gli esami ematochimici. La valutazione neuropsicologica completa, comprendente prove di attenzione, calcolo, ragionamento logico, linguaggio, memoria, prassia e funzioni visuo-spaziali, ha evidenziato un deficit cognitivo multidominio. I domini più compromessi comprendevano l'attenzione, la memoria, il ragionamento deduttivo, le fluenze verbali, la comprensione e la prassia. Il punteggio MMSE corretto per età e scolarità è risultato 22/30. L'impatto ecologico era moderato. L'analisi del liquor ha mostrato livelli limite di A β -amiloide (492 pg/ml; v.n. > 500 pg/ml) e livelli normali di proteina Tau (402 pg/ml; v.n. < 450 pg/ml) e fosfo-Tau (61 pg/ml; v.n. < 61 pg/ml). A seguito di tali risultati venne posta diagnosi di PNFA secondo i criteri diagnostici correnti.

In gennaio 2010 la paziente ha sviluppato disfagia per solidi e liquidi. L'esame obiettivo neurologico ha messo in evidenza un importante deficit di linguaggio con parafrasie e utilizzo di parole passe-partout; non erano presenti segni di malattia del motoneurone. L'ultima visita ambulatoriale, eseguita in settembre 2010, riportava afasia espressiva completa senza altri segni neurologici. Sono stati, infine, studiati quattro membri della famiglia asintomatici. Due sono risultati portatori di mutazione. Contattati, nessuno dei due ha riferito sintomi analoghi al probando, ma entrambi sono molto più giovani dell'età di esordio della paziente (Figura 18).

4.3 Screening delle ripetizioni esanucleotide in C9orf72 in pazienti affetti da FTLD

Come detto in precedenza, l'espansione di una ripetizione esanucleotidica situata nel primo introne del gene *C9orf72* è stata studiata come possibile causa patogenetica di un numero elevato di pazienti affetti da SLA, FTLD con o senza concomitante presenza di MND.

In questo studio lo screening del gene *C9orf72* è stato condotto su una casistica molto ampia di pazienti diagnosticati clinicamente come FTLD. Sono stati infatti reclutati 651 pazienti con FTLD, 21 con CBD e 31 con PSP provenienti da diversi Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale. Inoltre sono stati analizzati anche 222 controlli sani che non presentavano alcun segno di disordine neurologico o psichiatrico. E' importante ricordare che 168 pazienti presentavano una documentata familiarità per demenza.

In particolare tramite *Primed-Repeat PCR* e relativa analisi dei frammenti è stato possibile individuare 39 pazienti con FTLD (17 maschi e 22 femmine) portatori dell'espansione patologica per una frequenza di circa il 6%, mentre nessun paziente con CBD o PSP è risultato essere portatore di tale espansione. Lo screening dei 222 controlli non ha mostrato nessun risultato positivo.

Nella figure 19 e 20 vengono messi a confronto i plots ottenuti tramite l'analisi dei frammenti di un paziente sano e di uno portatore dell'espansione esanucleotidica che presenta, come si può notare, il tipico profilo a dente di sega.

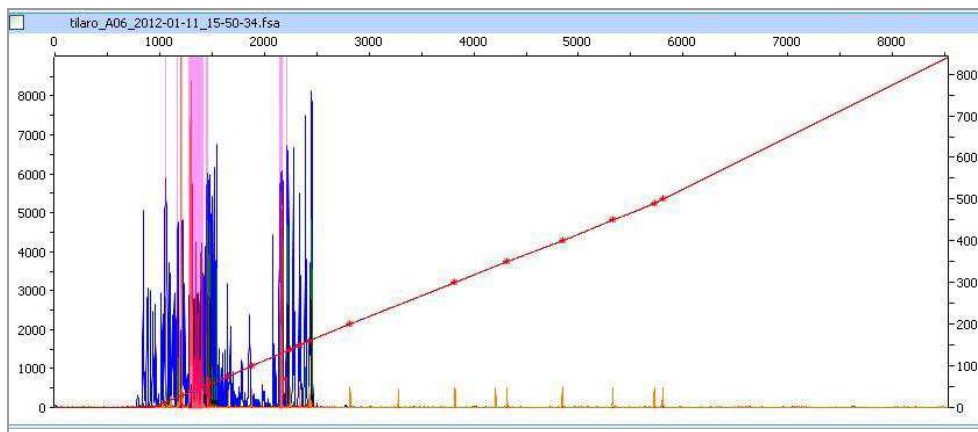


Figura 19: Analisi dei frammenti ottenuta da un paziente privo di un'espansione patologica in *C9orf72*.

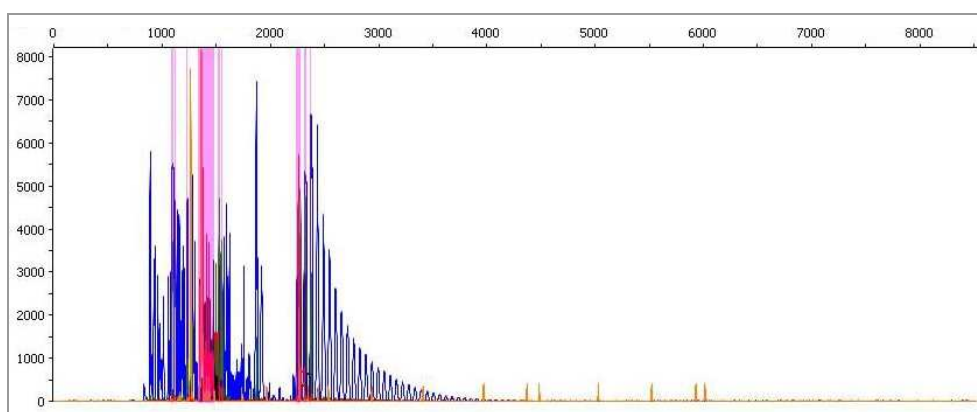


Figura 20: Analisi dei frammenti ottenuta da un paziente con un numero patologico di unità ripetute in C9orf72.

L'età media d'esordio della malattia non risulta essere statisticamente differente tra portatori e non portatori dell'espansione ($63,9 \pm 8,1$ anni; range 48-77 versus $66 \pm 8,6$ anni; range 32-85, $P > 0.05$), così come non sono state individuate differenze significative per quanto riguarda il genere ($P > 0.05$).

La frequenza della presenza dei portatori è risultata essere equamente distribuita in tutte le regioni d'Italia (Nord, Centro e Sud del Paese).

23 pazienti dei 39 portatori presentava una storia familiare positiva per demenza e/o SLA (59%), mentre solo 145 dei 612 non portatori presentava familiarità (23.7%, $P > 0.0001$). La presenza di sintomi psicotici è risultata essere più frequente nei portatori (8/24) rispetto ai non portatori (3/37; 33.3% versus 8.1%, $P = 0.018$) così come la presenza di declino cognitivo all'esordio (10/24 versus 5/37; 41.6% vs 13.5%, $P = 0.017$).

Nella Tabella seguente sono riassunte tutte le caratteristiche cliniche dei pazienti portatori e dei non portatori dell'espansione esanucleotidica (Tabella 6).

	Portatori dell'espansione in C9orf72	C9orf72 non portatori
Numero di pazienti	39/651	612/651
Genere (M:F)	17:22	162:450
Età d'esordio (anni \pm SD)	$63,9 \pm 8,1$ range: 48-77	$66,3 \pm 8,6$ range: 32-85
Familiarità positiva	23/39*	145/612
Psicosi	8/24(33,3%)**	3/37 (8,1%)
Declino cognitivo	10/24(41,6%***)	5/37 (13,5%)

* $P < 0.0001$, ** $P = 0.018$, *** $P = 0.017$

Tabella 6: Riassunto delle caratteristiche cliniche dei pazienti portatori e non portatori dell'espansione esanucleotidica in C9orf72

Dal punto di vista del fenotipo clinico invece i portatori dell'espansione presentavano un'elevata eterogeneità; infatti 29 pazienti erano stati diagnosticati come bvFTD, 8 come bvFTD/MND, 2 come SD, ma nessuno è risultato essere affetto da PNFA.

Nella Figura 21 è mostrata la distribuzione dei fenotipi clinici dei portatori.

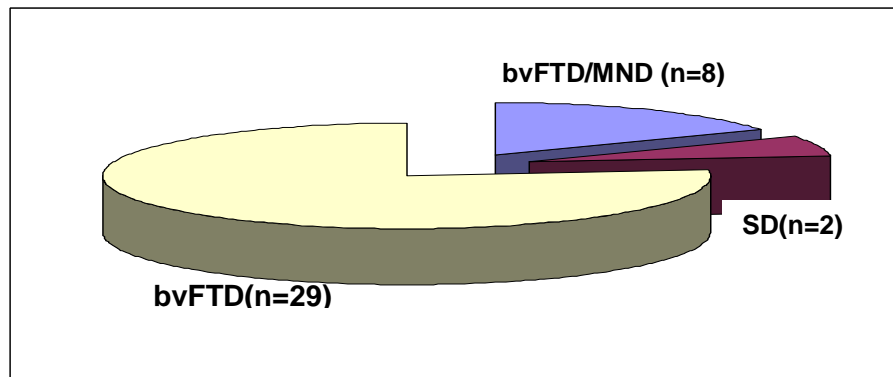


Figura 21: Fenotipi clinici dei portatori dell'espansione esanucleotidica in C9orf72

4.4 Studi di associazione caso-controllo condotti secondo l'approccio del gene candidato posizionale e funzionale

L'AD e la FTLD sono due patologie multifattoriali ad eziologia complessa. Entrambe riconoscono casi familiari, ereditati con modalità autosomica dominante e casi, denominati sporadici e che costituiscono la maggioranza dei pazienti, in cui non è identificabile un unico fattore eziopatogenetico, ma un insieme di cause, genetiche e ambientali, che contribuiscono in misura differente al determinismo della malattia.

Pertanto è stato scelto di effettuare studi associazione caso-controllo per indagare un possibile ruolo della variabilità genetica presente in particolari geni nel determinare l'insorgenza di AD e di FTLD.

In particolare è stato scelto di analizzare i seguenti geni scelti secondo l'approccio del gene candidato posizionale e funzionale: *GRN*, *TMEM106b* e *OLR1*.

4.4.1 GRN e AD

Per questo studio è stato scelto di focalizzare l'attenzione in particolare su due SNPs, rs9897526G>A e rs5848C>T, che presentano una MAF >10% e che per tale motivo avrebbero potuto giocare un ruolo come fattori di suscettibilità per l'insorgenza dell'AD. Il primo SNP è situato dopo 21 bp dal sito donatore di splicing presente nell'introne 2 del gene, mentre rs5848 è situato nel 3'UTR.

L'analisi è stata condotta su 355 pazienti affetti da AD e diagnosticati secondo i criteri di NINCDS-ADRDA e 377 controlli sani.

Nella tabella seguente sono riportate le caratteristiche della popolazione oggetto di questo studio (Tabella 7).

	Controlli	AD
Numero di pazienti	377	355
Genere (M:F)	121:256	105:250
Età media (anni± SD)	73,56± 0.58	76,50± 0.35
Età media d'esordio (anni ± SD)		73,03± 0.58
Durata media di malattia		3,17± 0.22
Portatori ApoE ε4 (%)	57(15%)	147 (41%)*

* $P < 0.001$ AD versus CON (OR 4.35, CI: 3.06-6.19)

Tabella7: Caratteristiche cliniche dei controlli e dei pazienti

Entrambe le popolazioni di casi e controlli sono risultate essere in equilibrio di Hardy-Weinberg. E' stata osservata una tendenza all'aumento della frequenza dell'allele rs5848T nei pazienti AD rispetto ai controlli sani, anche se non è stata raggiunta la significatività statistica secondo la correzione di Bonferroni (rs5848 MAF:34.% versus 29.0%, $P=0,025$).

Per quanto riguarda lo SNP rs9897526 non state osservate differenze statisticamente significative né per quanto riguarda le frequenze alleliche né per le frequenze genotipiche (MAF:14.4% versus 12.2% nei pazienti rispetto ai controlli, $P > 0.05$). Per entrambi gli SNPs non state osservate associazioni significative per quanto riguarda il genere e la presenza dell'allele ε4 del gene ApoE.

Per quanto riguarda lo SNP rs9897526 stratificando i risultati in base all'età d'esordio della malattia (LOAD/EOAD) è stato osservato che per il gruppo di pazienti AD non portatori di alcun allele polimorfico (A- n=173) l'età d'esordio è di 74±0.69 anni, mentre per il gruppo di malati che hanno almeno un allele polimorfico (A+, n=71) è di 70,12±1.18 anni ($P=0.002$).

Nella Tabella 8 sono riportate le frequenze alleliche e genotipiche dei pazienti e dei controlli per gli SNPs rs9897526 e rs5848 (Tabella 8).

SNP	n	Genotipo (%)			Allele (%)		P
		GG	GA	AA	G	A	
Rs9897526							
Controlli	377	77.7(293)	20.2(76)	2.1(8)	87.8(662)	12.2(92)	0.10
AD	355	72.7(258)	25.9(92)	1.4(5)	85.6(608)	14.4(102)	
Rs5848							
Controlli	377	51.0(194)	39.0(147)	10.0(36)	71.0(535)	29.0(219)	0.025
AD	355	43.1(153)	44.9(136)	12.0(43)	65.5(465)	34.4(245)	

Tabella8: Frequenze alleliche e genotipiche(%) degli SNP rs9897526 e rs5848 nei pazienti AD rispetto ai controlli sani.

4.4.2 GRN e FTLD

Per indagare il contributo della variabilità genetica presente nel gene *GRN* nello sviluppo della FTLD è stato eseguito uno studio di associazione caso-controllo utilizzando una popolazione composta da 265 pazienti affetti da FTLD (genere M:F 121:144, età media \pm S.E.M., 67.5 \pm 0.70 anni) non portatori di mutazioni causali di malattia, e 375 controlli sani (genere M:F 141:234, età media \pm S.E.M., 61.1 \pm 0.52 anni) di pari età.

Sono stati analizzati 4 Tagging SNP scelti in modo da coprire tutta la sequenza del gene (rs2879096, rs3785817, rs4792938 e rs9897526); inoltre è stato analizzato anche lo SNP rs5848, localizzato nel 3'UTR del gene e già associato a una variazione della trascrizione del mRNA mediante la regolazione del miR-659[160]. Entrambe le popolazioni di casi e controlli sono risultate essere in equilibrio di Hardy-Weinberg per tutti gli SNP analizzati.

Considerando separatamente ciascuno SNP, non è stata osservata alcuna differenza significativa tra pazienti FTLD e controlli sani per quanto riguarda le frequenze alleliche. Non state riscontrate differenze significative stratificando i risultati in base al genere e alla storia familiare per demenza (positiva o negativa). E' stata osservata un'aumentata frequenza statisticamente significativa del genotipo CC nel caso dello SNP rs4792938 nei pazienti FTLD rispetto ai controlli (17.4% versus 10.4%, $P=0.01$, OR:1.81,95%CI:1.15-2.85). Nella Tabella 10 sono riportate le frequenze alleliche e genotipiche dei pazienti FTLD rispetto ai controlli sani.

SNP	n°	Genotype % (n)			Allele % (n)	
		CC	CT	TT	C	T
rs2879096						
Controls	375	59.7 (224)	35.7 (134)	4.6 (17)	77.6 (582)	22.4 (168)
Cases	265	55.5 (147)	37.7 (100)	6.8 (18)	74.3 (394)	25.7 (136)
rs3785817						
Controls	375	55.5 (208)	37.3 (140)	7.2 (27)	74.9 (556)	25.9 (194)
Cases	265	52.4 (139)	40.8 (108)	6.8 (18)	72.8 (386)	27.2 (144)
rs4792938						
Controls	375	47.5 (178)	42.1 (158)	10.4 (39)	68.5 (514)	31.5 (236)
Cases	265	40.8 (108)	41.9 (111)	17.4 (46)*	61.7 (327)	38.3 (203)
rs9897526						
Controls	375	76.8 (288)	21.3 (80)	1.9 (7)	87.5 (656)	12.5 (94)
Cases	265	75.8 (201)	23.0 (61)	1.1 (3)	87.4 (463)	12.6 (67)
rs5848						
Controls	375	52.0 (195)	38.1 (143)	9.8 (37)	71.1 (533)	28.9 (217)
Cases	265	53.6 (142)	38.1 (101)	8.3 (22)	72.6 (385)	27.4 (145)

* $P = 0.01$, OR: 1.81, 95%CI: 1.15–2.85

Tabella 10: Frequenze alleliche e genotipiche espresse come n(%) dei pazienti FTLD rispetto ai controlli sani

L'utilizzo del software Haplowiev4.1 ha mostrato la presenza di un unico blocco di LD che contiene rs2879096 e rs3785817, ma non rs4792938. L'analisi degli aplotipi non ha riportato nessun aplotipo associato alla malattia (Figura 22)

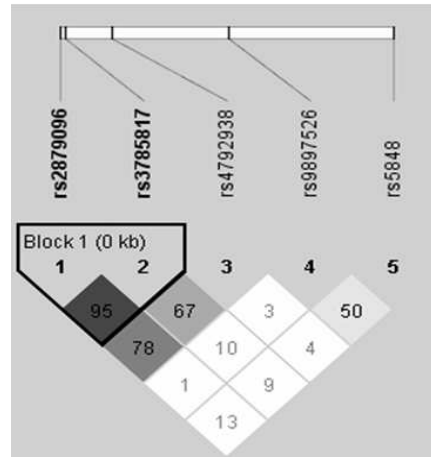


Figura22: Analisi della struttura dei blocchi di LD per il gene GRN

4.4.3 TMEM106b e AD

Per studiare un possibile ruolo del gene *TMEM106b* nell'AD, è stato condotto uno studio di associazione caso-controllo su tre SNPs, rs1020004 A/G, rs6966915 C/T e rs1990622 A/G analizzando una popolazione composta da 300 pazienti affetti da AD (genere M:F 104:196, età media d'esordio, anni, 73.3± 8.9) e 323 controlli sani (genere M:F 132:191, età media, anni, 67.6 ± 0.6) di pari età.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa né per quanto riguarda le frequenze alleliche né per quelle genotipiche ($P>0.05$, Tabella11), anche stratificando i risultati in base al genere, al genotipo del gene *ApoE* e all'età d'esordio della malattia ($P>0.05$). L'analisi degli aplotipi non ha mostrato nessuna associazione significativa ($P>0.05$).

SNP	n	Genotipo (%)			Allele (%)	
Rs102004		AA	AG	GG	A	G
AD	300	53(161)	38(113)	9(26)	72(435)	28(165)
Controlli	323	50(159)	41(133)	9(31)	70(451)	30(195)
rs6966915		CC	CT	TT	C	T
AD	300	42(136)	34(110)	24(54)	64(382)	36(218)
Controlli	323	36(115)	47(152)	17(56)	59(382)	41(264)
Rs1990622		AA	AG	GG	A	G
AD	300	38(113)	46(139)	16(48)	61(365)	39(235)
Controlli	323	32(104)	51(165)	17(54)	58(373)	42(273)

Tabella 11: Frequenze alleliche e genotipiche espresse come n(%) degli SNPs rs1020004; rs6966915; rs1990622

Inoltre sono stati analizzati i livelli plasmatici di GRN in 80 pazienti affetti da AD. I

risultati ottenuti sono stati stratificati in base al genotipo dello SNP rs1990622. Il confronto tra il genotipo dello SNP rs1990622 e i livelli di GRN non ha mostrato nessun risultato significativo (portatori dell'allele A: 176.02 ± 3.2 ng/ml versus portatori dell'allele G: 180.55 ± 4.1 ng/ml, Figura 23)

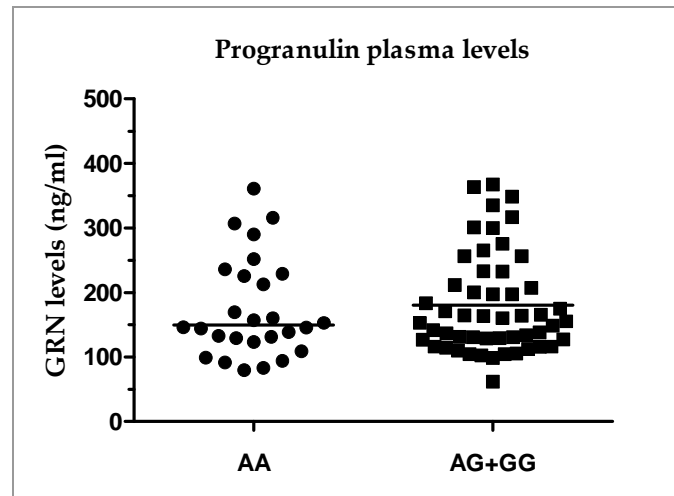


Figura 23: Scatter plot della distribuzione dei livelli plasmatici di GRN in 80 pazienti AD stratificando i risultati in base al genotipo dello SNP (portatori A: 176.02 ± 3.2 ng/ml versus portatori G: 180.55 ± 4.1 ng/ml, $P > 0.05$)

4.4.4 OLR1 e AD

Lo SNP rs1050283 T/C, posizionato nel 3'UTR del gene *OLR1*, è stato recentemente associato a un aumentato rischio di sviluppare AD[151]. Esso è anche situato all'interno di un predetto sito di binding di un miRNA, hsa-miR369-3p (Figura 24). In questo caso è stato condotto uno studio di associazione caso controllo al fine di confermare il risultato precedentemente riportato in letteratura analizzando una popolazione di 443 pazienti affetti da AD sporadico e 393 controlli sani di pari età.

	predicted pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 173-200 of <i>OLR1</i> 3' UTR	5' . . . UUUUUGAUUCUAGCUACCUAGUAUUUU . . .	7mer-m8
hsa-miR-369-3p	3' UUUUCUAG--UUGGU--ACAUAUAA	

Figura24: allineamento delle sequenze geniche di *OLR1* e hsa-miR369-3p (www.targetscan.com)

L'analisi di regressione logistica lineare, corretta per genere e per genotipo *ApoE*, ha evidenziato la presenza di un'associazione statisticamente significativa dello SNP rs1050283 T/C, sia ipotizzando un modello dominante (CC+TT versus TT: $P=0.014$, OR:1.50, 95%CI:1.08-2.08) sia ipotizzando un modello genotipico (TC vs

TT: $P=0.002$, OR:1.61, 95%CI:1.14-2.26). Nella seguente tabella (Tabella 12) sono riportate le frequenze alleliche e genotipiche dei pazienti rispetto ai controlli sani.

<i>OLR1</i> rs1050283 frequencies	Controls (n=393)	AD patients (n=443)	<i>p</i>	OR [95% CI]
Allele				
<i>T</i>	448 (57.0)	477 (53.8)		
<i>C</i>	338 (43.0)	409 (46.2)	0.19	1.14 [0.93-1.18]
Genotype (genotypic model)				
<i>TT</i>	134 (34.1)	114 (25.7)		1.0
<i>TC</i>	180 (45.8)	249 (56.2)	0.002	1.61 [1.14-2.26]
<i>CC</i>	79 (20.1)	80 (18.1)	0.29	1.26 [0.81-1.95]
Genotype (additive model)				
<i>TT</i>	134 (34.1)	114 (25.7)		1.0
At least one <i>C</i> allele (<i>CT+CC</i>)	259 (65.9)	329 (74.3)	0.014	1.50 [1.08-2.08]

Tabella 12: dati relativi alle frequenze alleliche e genotipiche corrette per età, genere e genotipo ApoE nei paziente e nei controlli

4.5 Analisi trascrizionale quantitativa di *OLR1* e di *hsa-miR369-3p*

A livello preliminare sono stati, inoltre, analizzati i livelli di espressione di *hsa-miR369-3p* nelle PBMC confrontando pazienti affetti da AD e controlli sani. I risultati ottenuti sono stati correlati con i livelli del mRNA di *OLR1* stratificandoli in base alla presenza dell'allele rs1050283 *C*. A tal fine è stato utilizzato materiale genetico proveniente da 15 controlli sani e 20 pazienti affetti da AD. Considerando i livelli di espressione di *OLR1* e *hsa-miR369-3p* non sono state riscontrate differenze significative ($P>0.05$, Figura 25).

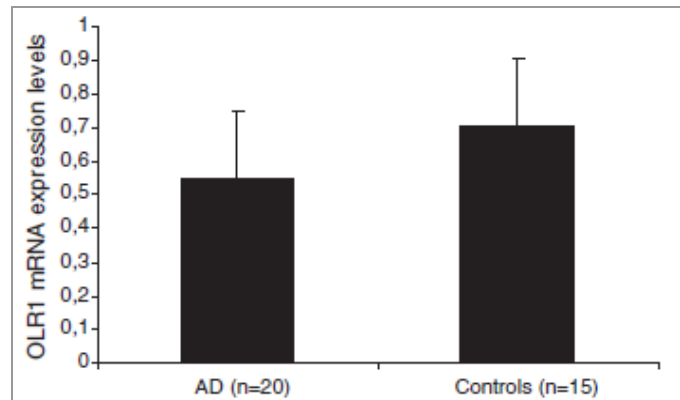
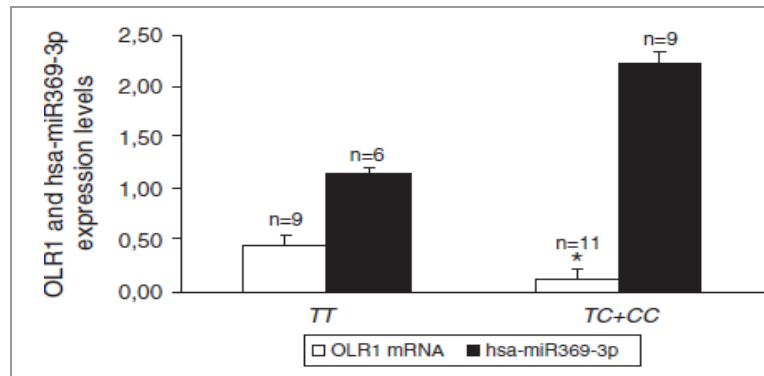


Figura 25: Livelli di espressione relativa di *OLR1* nei pazienti e nei controlli sani, $P>0.05$, *t*-test

Stratificando, però, i risultati in base alla presenza dell'allele rs1050283 *C* (*CC+CT* versus *TT*) è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di espressione di *OLR1* nei portatori di almeno un allele *C* rispetto ai non portatori

(CC+CT versus TT, 0.13 ± 0.013 versus 0.46 ± 0.028 , $P= 0.022$), mentre non sono state evidenziate differenze nei livelli di espressione relativa di hsa-miR369-3p ($P>0.05$, Figura 26).



* $P=0.022$

Figura 26: livelli di espressione di OLR1 e hsa-miR-369-3p nei pazienti AD TC+CC vs TT. I valori sono espressi come media \pm SEM (ANOVA).

L'effetto osservato non sembra essere influenzato dalla presenza dell'allele $\epsilon 4$ del gene ApoE, come strato nella figura seguente ($P>0.05$, Figura 27).

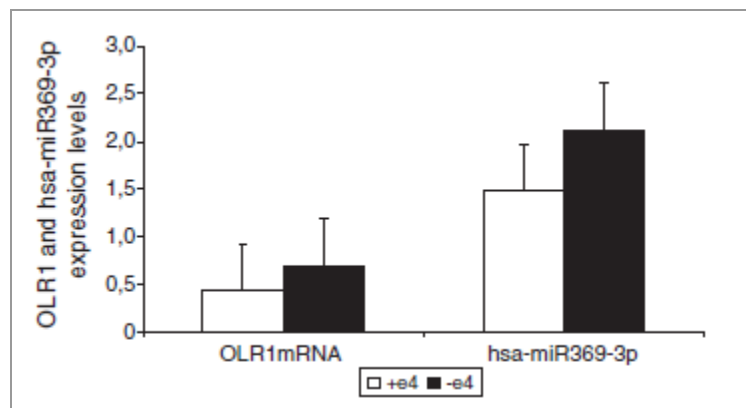


Figura 27:livelli di espressione relativa di OLR1 e hsa-miR369-3p stratificando i risultati in base all'allele $\epsilon 4$ del gene ApoE, i valori sono espressi come media \pm S.E.M., t-test, $P>0.05$)

Inoltre è stata osservata una correlazione negativa tra l'espressione di OLR1 e hsa-miR369-3p nei pazienti affetti da AD portatori di almeno un allele rs1050283 C (CC+CT) anche se non è stata raggiunta la significatività statistica ($\rho=-0.313$, $P=0.05$, Figura 28).

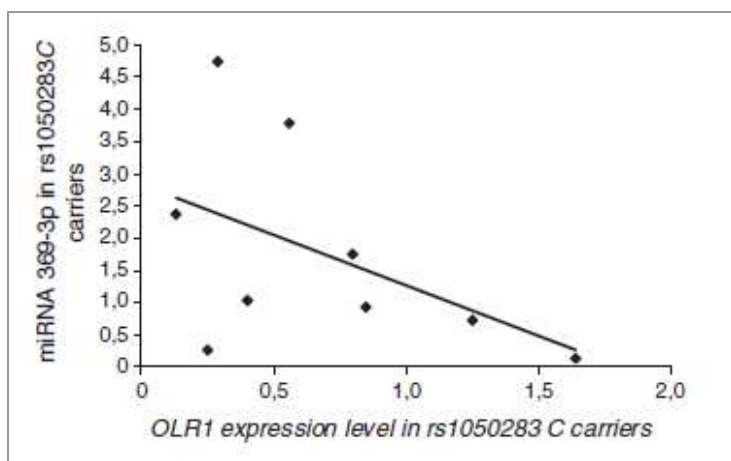


Figura 28: Correlazione negativa tra i livelli di espressione di OLR1 e hsa-miR369-3p nei pazienti stratificando i risultati in base all'allele rs1050283C ($\rho=-0.313$, $P=0.05$).

5 DISCUSSIONE

La Malattia di Alzheimer (AD) e la Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD) rappresentano le forme più comuni di demenza ad esordio senile e presenile, e sono due patologie neurodegenerative multifattoriali complesse nella cui eziopatogenesi giocano un ruolo sia fattori ambientali che fattori genetici. In una piccola percentuale di pazienti è presente familiarità positiva per demenza ed è possibile identificare un pattern di trasmissione autosomico dominante e la presenza di singole mutazioni geniche come fattore causale di malattia.

Lo screening genetico condotto sulla popolazione reclutata, costituita rispettivamente da 443 soggetti affetti da AD e 300 con diagnosi clinica di FTLD, ha confermato la presenza di mutazioni causali nei geni *PSEN1*, *GRN* e *MAPT*, per un totale di 18 pazienti.

Una mutazione è stata riscontrata a livello dell'esone 8 del gene *PSEN1* in un paziente con diagnosi clinica di AD e con un'età d'esordio di 36 anni, mentre gli altri 17 pazienti presentavano tutti una diagnosi clinica di FTLD; tale dato suggerisce che la presenza di un pattern di trasmissione autosomico dominante sia maggiormente riscontrabile nei pazienti affetti da FTLD e che per l'AD mutazioni causali siano molto più rare. Quasi il 100% dei pazienti risultati portatori di mutazioni (16 pazienti) e il 5% dell'intera popolazione, risultano portatori di mutazioni a livello del gene *GRN*; la seconda percentuale risulta in accordo con quanto riportato in letteratura [235], in cui la frequenza delle mutazioni in *GRN* si aggira intorno al 6%. Invece, l'alta prevalenza di mutazioni in *GRN* risente probabilmente della facilità con cui tali pazienti vengono identificati grazie al dosaggio dei livelli plasmatici di Progranulina. Tutte le mutazioni identificate a livello del gene *GRN* erano state descritte in precedenza; tuttavia la descrizione dei pazienti portatori della mutazione nell'esone 2 Asp22fs (g.63_64insC) in *GRN* dimostra come questa mutazione sia associata ad un'ampia variabilità fenotipica anche all'interno della medesima famiglia in termini di 'età, sintomi all'esordio, durata, gravità di malattia e distribuzione dell'atrofia corticale. Per quanto riguarda l'età d'esordio tutti i membri affetti della prima generazione hanno sviluppato i sintomi tra i 60 e i 80 anni, mentre il probando ha esordito a 47 anni. Tutti gli altri portatori della mutazione sono più giovani e quindi non possiamo sapere se e a che età svilupperanno la malattia. La variabilità del fenotipo clinico potrebbe essere parzialmente spiegata dall'influenza di fattori genetici o ambientali non ancora identificati. L'aplotipo del gene *MAPT* potrebbe aver influenzato l'età di presentazione così come il fenotipo clinico dato che i soggetti studiati sono risultati portatori di differenti combinazioni alleliche. Purtroppo due casi sono pochi per trarre conclusioni certe. In accordo con quanto descritto fino ad oggi in diversi pazienti portatori di mutazioni in *GRN* determinanti aploinsufficienza anche i nostri pazienti hanno sviluppato nel tempo disordini del movimento, in particolare parkinsonismo e aprassia della marcia. Per quanto riguarda la presentazione clinica è degno di nota il fatto che la maggior parte dei pazienti sintomatici abbiamo lamentato deficit di memoria all'esordio e che tutti i soggetti per cui è disponibile un'indagine di RMN presentino multiple alterazioni iperintense in T2 nella sostanza bianca del lobo frontale in assenza di fattori di rischio cardiovascolare noti. Anche questo dato è stato descritto in precedenza in pazienti portatori di mutazione in *GRN*[236]. Anche il pattern di atrofia corticale risulta insolito in relazione alla

sintomatologia clinica; in particolare per quanto riguarda il probando che presenta atrofia asimmetrica maggiore a destra. Un'atrofia lateralizzata a destra è stata comunque descritta in precedenza in pazienti portatori di mutazioni in *GRN* [236]. Infine i dati presentati confermano come il dosaggio dei livelli plasmatici di Progranulina sia un marcatore biologico sensibile e specifico per identificare i portatori di mutazione in *GRN*, anche se la conferma tramite sequenziamento è sempre necessaria, mentre i dati liquorali siano poco sensibili e specifici per rilevare un processo di degenerazione neuronale in pazienti portatori di mutazioni. Per questo motivo sembra risultare praticamente necessario effettuare l'analisi dei livelli plasmatici di Progranulina soprattutto per quei pazienti con storia familiare positiva per demenza e con livelli dei marcatori liquorali nella norma.

Concludendo, la descrizione di questa famiglia amplia lo spettro delle presentazioni cliniche della FTLD causata da mutazioni a livello del gene *GRN*, sottolineando l'importanza di mantenere alto il sospetto diagnostico anche il pazienti con presentazioni atipiche ed inusuali.

Una paziente con diagnosi clinica di PNFA è risultata portatrice di una nuova mutazione a livello dell'esone 10 del gene *MAPT* (g.123798 G>A), determinante una sostituzione di Gly in Ser in posizione 304 della sequenza aminoacidica. L'effetto patogenetico della variante Gly304Ser è supportato da diverse prove. In primo luogo, la variante segrega con la malattia e l'analisi di altri 1342 cromosomi ha dimostrato l'assoluta assenza della stessa. In secondo luogo, la variante causa una sostituzione aminoacidica in un dominio altamente conservato necessario per il legame di tau coi microtubuli, dominio che contiene già numerose mutazioni patogenetiche [237]. Infine, l'analisi in silico supporta l'ipotesi che la mutazione influenzi negativamente il corretto funzionamento della proteina.

Per quanto riguarda la storia familiare, la madre della probanda ha presentato una sintomatologia analoga con un'età di esordio superiore di circa 5 anni; ciò suggerisce un'anticipazione della patologia nelle generazioni successive, come già osservato [237]; gli altri due membri della famiglia portatori asintomatici della mutazione sono più giovani dell'età di esordio della probanda, per cui non è possibile escludere un futuro sviluppo di malattia.

Inoltre, è stata presa in considerazione l'ipotesi che fattori addizionali, quali l'aplotipo *ApoE* e rs9897526 di *GRN* abbiano influenzato l'età d'esordio, il fenotipo clinico e la progressione di malattia.

Per quanto è a nostra conoscenza, fino ad ora c'è un solo caso descritto di PNFA associata a una mutazione in *MAPT* (V363I) [238]. In analogia con il nostro caso, il soggetto descritto da Munoz e collaboratori ha sviluppato i primi sintomi tra i 60 e i 70 anni, in alcuni anni il disturbo è progredito fino all'afasia globale, nonostante il paziente sia rimasto in grado di comprendere ed eseguire ordini complessi, orientato nel tempo e nello spazio e l'impatto ecologico fosse limitato ai compiti che richiedono l'uso del linguaggio. Oltre a mutazioni in *MAPT*, anche mutazioni in *GRN* sono state associate a PNFA [218]. Nonostante la nostra paziente, nel corso della patologia abbia riferito disfagia e si siano osservate fascicolazioni linguali, il follow-up mediante EMG ha escluso la presenza di malattia del motoneurone.

Curiosamente i livelli liquorali di tau totale, il cui aumento è considerato un marcatore di neurodegenerazione, erano normali. Nonostante si tratti di un dato inaspettato, precedenti studi hanno dimostrato che i livelli di tau e P-tau possono non essere elevati in pazienti portatori di mutazioni patogenetiche in *MAPT* [239],

suggerendo l'ipotesi che il meccanismo patogenetico in pazienti affetti da FTLD portatori di mutazioni in questo gene possa essere differente rispetto ai casi sporadici.

Il fatto che non ci siano altre mutazioni missenso note localizzate a livello della regione legante i microtubuli supporta l'ipotesi che la mutazione da noi descritta sia patogenetica. È stato precedentemente dimostrato che mutazioni in questa regione determinano un'alterazione significativa della capacità di tau di regolare il processo dinamico di assemblaggio dei microtubuli [240]. Queste mutazioni determinano una riduzione della capacità di tau di legare i microtubuli con conseguente aumento del pool di proteina libera, disponibile per la formazione di aggregati patologici. Questa diminuzione della stabilità dei microtubuli potrebbe non avere un effetto immediato sullo sviluppo e sulla funzione neuronale, ma determinare, nel tempo, un danno cumulativo che porta alla degenerazione neuronale [240].

Abbiamo, in conclusione, descritto una nuova mutazione in *MAPT* (g.123798G>A), determinante una sostituzione aminoacidica (p.Gly304Ser) a livello del secondo sito legante i microtubuli, in una paziente con diagnosi clinica di PNFA. Questa mutazione potrebbe influenzare negativamente il corretto funzionamento della proteina e potrebbe avere un ruolo fondamentale nel processo di aggregazione di tau.

Come detto in precedenza, l'espansione di una ripetizione esanucleotidica situata nel primo introne del gene *C9orf72* è stata studiata come possibile causa patogenetica di un numero elevato di pazienti affetti da SLA, FTLD con o senza concomitante presenza di MND.

In questo studio lo screening del gene *C9orf72* è stato condotto su una casistica molto ampia di pazienti diagnosticati clinicamente come FTLD. Sono stati infatti reclutati 651 pazienti con FTLD, 21 con CBD e 31 con PSP provenienti da diversi Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale. Inoltre sono stati analizzati anche 222 controlli sani che non presentavano alcun segno di disordine neurologico o psichiatrico.

È stato dimostrato che tale espansione esanucleotidica può essere considerata una causa comune d'insorgenza di FTLD nella popolazione italiana, con una frequenza di circa il 6% molto simile a quella delle mutazioni in *GRN* e *MAPT*. Nella coorte di soggetti analizzati in questo studio tale espansione è risultata essere più frequente in pazienti con diagnosi clinica di bvFTD/MND (32%), mentre è stata associata a un fenotipo clinico di bvFTD nel 5.2% di tutti i pazienti che hanno ricevuto questo tipo di diagnosi. È sicuramente da chiarire se la presenza di questa mutazione possa essere prognostica per lo sviluppo di MND in quei soggetti con diagnosi clinica di bvFTD; per questa ragione sarebbe opportuno effettuare un follow up dei pazienti a tempi prestabiliti al fine di verificare l'insorgenza di disturbi del motoneurone.

È da notare che nell'analisi di quest'ampia casistica, l'espansione è stata individuata per la prima volta in due pazienti con diagnosi clinica di SD, mentre nessun paziente portatore aveva una diagnosi di PNFA. Questi dati sono in leggero contrasto con quelli riportati in letteratura, dato che sia nella casistica analizzata da Boeve et al sia in quella di Sha et al [241,242] non si sono riscontrati portatori con disturbi del linguaggio, mentre un portatore descritto nello studio di Gijssels et al aveva una diagnosi clinica di PNFA [243]. Come era aspettarsi

nessun paziente affetto da PSP o CBD, così come nessuno dei 222 controlli sani analizzati, è risultato essere portatore dell'espansione esanucleotidica in *C9orf72*. Per quanto riguarda i sintomi all'esordio, è da notare la presenza di manifestazioni atipiche della malattia, che includono sintomi psicotici e declino cognitivo. In accordo con i dati già riportati in letteratura i risultati ottenuti in questo studio supportano l'ipotesi di come la presenza di disturbi psicotici sia associata all'espansione esanucleotidica nel gene *C9orf72*[222].

Il deficit di memoria rappresenta un'altra caratteristica atipica dei portatori della mutazioni in *C9orf72* (10/24) che potrebbe indurre gli operatori a effettuare una diagnosi di MCI o AD come confermato dai dati precedentemente riportati da Murray e collaboratori; essi hanno infatti individuato 3 pazienti portatori di tale variante che erano stati clinicamente classificati come AD. Inoltre, altri studi in popolazioni molto ampie di pazienti portatori di differenti mutazioni hanno dimostrato come il deficit di memoria sia una caratteristica prominente nei portatori dell'espansione in *C9orf72* comprendendo infatti circa i due terzi dei casi. E' da ricordare che manifestazioni di deficit di memoria sono caratteristiche dei portatori di mutazioni in *GRN*, ma non sono mai state associate alle varianti presenti nel gene *MAPT*[244].

Solo due pazienti portatori dell'espansione e riscontrati in questa popolazione oggetto di studio presentavano sintomi extrapiramidali e atassia. A questo proposito è utile ricordare che sono stati già riportati disturbi atipici del movimento nei portatori dell'espansione, che includono aprassia, movimenti involontari delle mani, bradicinesia e parkinsonismo [245].

L'età media d'esordio della malattia è risultata essere simile tra i portatori e i non portatori dell'espansione, in accordo con quanto già riportato in letteratura [242]. Contrariamente, però, a quanto riscontrato da Sha e collaboratori, che non hanno individuato nessun portatore che all'esordio avesse più di 65 anni di età, nella coorte analizzata in questo studio, 17 dei 39 portatori avevano, invece, sviluppato i primi sintomi dopo i 65 anni. Bisogna però riconoscere che tali sintomi sono spesso molto poco evidenti e che potrebbe essere necessaria un'indagine psicologica molto accurata per poter far insorgere il dubbio della presenza di una malattia come la FTLT. Ecco perché è possibile che vi sia stata una mancata identificazione o una sottostima dei primi sintomi sia da parte dei membri della famiglia sia da parte degli operatori.

In accordo con quanto riportato in letteratura[246], la presenza dell'espansione esanucleotidica nel gene *C9orf72* è associata con una storia familiare positiva per demenza e/o SLA. Inoltre 3 dei 39 portatori, così come precedentemente riportato per i portatori di mutazioni in *GRN*, presentavano un profilo liquorale nella norma. Tale osservazione dimostrerebbe come la proteina tau sia un marcatore non specifico di neurodegenerazione.

In conclusione la descrizione di questi casi allarga lo spettro delle manifestazioni cliniche della FLTD a causa della presenza di questa nuova espansione esanucleotidica riscontrata nel gene *C9orf72*. Inoltre potrebbe essere opportuno allargare lo screening genetico per tale variante anche a quei pazienti che presentano solo puri sintomi psichiatrici e che hanno un profilo liquorale nella norma.

Come si può notare, la percentuale dei casi a trasmissione autosomica dominante è di circa il 5%, mentre la restante porzione di popolazione è rappresentata da

forme sporadiche in cui diversi fattori genetici e ambientali, per lo più ancora sconosciuti, possono concorrere all'insorgenza della FTLD e dell'AD. In questo contesto, sono stati condotti diversi studi di associazione caso-controllo utilizzando l'approccio del gene candidato posizionale e funzionale.

In particolare è stato analizzato il ruolo che la variabilità genetica presente nel gene *GRN* potrebbe avere nell'aumentare il rischio d'insorgenza dell'AD e della FLTD. Per quanto riguarda la prima malattia sono stati analizzati due SNPs, rs9897526 e rs5848, che non sono risultati essere fattori di suscettibilità per l'AD. Non sono state riscontrate differenze significative nella distribuzione dei due SNPs nei casi rispetto ai controlli sani anche se è stata osservata una tendenza all'aumento dell'allele rs5848T nei pazienti AD rispetto ai controlli. Questo dato risulta essere in contrasto con quanto riportato in letteratura, in cui viene riportato un ruolo di rs5848 come fattore di suscettibilità per la FTLD[160]. Nei portatori omozigoti dell'allele rs5848T vi è un rischio d'insorgenza superiore di almeno tre volte rispetto ai non portatori. Il dato negativo ottenuto nella popolazione analizzata in questo studio potrebbe essere spiegato considerando che esistono probabilmente meccanismi patogenetici differenti che sottostanno alle due diverse malattie, anche se la differenza di distribuzione osservata per l'allele rs5848T nei pazienti AD, seppur non significativa, fa pensare che sarebbero necessari ulteriori studi su una popolazione molto più ampia per poter trarre conclusioni definitive.

Inoltre è stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra lo SNP rs9897526 e l'età d'esordio dell'AD in termini di riduzione dell'età d'insorgenza nei pazienti portatori di almeno un allele polimorfico A rispetto ai non portatori. Ovviamente sarebbero necessari ulteriori studi per confermare tale risultato analizzando popolazioni differenti e per valutare la presenza di altri fattori ambientali che potrebbero agire in maniera sinergica con il background genetico individuale nello sviluppare la malattia. Comunque è interessante ricordare che diversi studi presenti in letteratura hanno dimostrato un ruolo di rs9897526 nel diminuire l'età d'esordio in diverse malattie neurodegenerative; per esempio Sleegers e collaboratori [247] hanno esaminato il contributo di otto SNPs come fattori di rischio nella SLA e hanno evidenziato la presenza di tre varianti comuni presenti nello stesso blocco di LD, tra cui rs9897526, che sarebbero associate a una riduzione dell'età d'esordio e a una prognosi peggiore dopo l'insorgenza della malattia. [ref]. Il meccanismo molecolare alla base di questo effetto non è stato ancora chiarito, dato che rs9897526 non è localizzato in un sito di splicing e che, dopo un'analisi di RT-PCR, non sembra generare trascritti aberranti; inoltre stratificando i pazienti in base alla presenza dell'allele rs9897526A, non sono state osservate differenze significative per quanto riguarda i livelli di mRNA. Perciò un'ipotesi plausibile potrebbe essere che esista un'altra variante che agisca sull'età d'esordio e che sia in LD con rs9897526. In conclusione questi risultati suggeriscono che rs5848 e rs9897526 potrebbero agire modulando il rischio d'insorgenza dell'AD e contribuendo a una mancata sopravvivenza neuronale. Ovviamente sarebbe opportuno effettuare studi funzionali più estesi per confermare questi dati molto preliminari.

Per quanto il ruolo di *GRN* nello sviluppo della FTLD, i risultati ottenuti nel nostro studio dimostrano che il genotipo rs4792938 CC rappresenta un fattore di suscettibilità in quei soggetti non portatori di mutazioni causali in *GRN*, raddoppiando quasi il rischio di sviluppo della malattia. E' stato ipotizzato un effetto

regolatore di tale SNP sui livelli di mRNA, ma l'analisi effettuata con *PupaSNP finder* ha evidenziato che rs4792938 non altera nessuna regione che il sistema cellulare utilizza per il corretto processamento del gene e nemmeno un sito di binding per qualche fattore di trascrizione. Perciò non è possibile escludere che vi sia un'altra variante in LD con rs4792938 che sia responsabile dell'associazione osservata.

In accordo con quanto riportato in letteratura in uno studio condotto su una coorte di pazienti europei affetti da FTLD e non portatori di mutazioni causali, anche i dati ottenuti in questo lavoro dimostrano una mancata associazione tra rs5848 e il rischio di sviluppo della FTLD. Attualmente vi sono molte discrepanze riguardo al ruolo di questo SNP nello sviluppo della FTLD; infatti Rademakers e collaboratori hanno riportato un'associazione tra rs5848 e la FTLD analizzando un gruppo omogeneo di pazienti affetti da FTLD-U e confermati dal punto di vista neuropatologico, anche se tale dato non è mai stato confermato in una popolazione più ampia. Inoltre solo la presenza del genotipo rs5848 *TT* ha dimostrato di agire come fattore di suscettibilità, mentre la presenza di un singolo allele non ha prodotto nessun risultato positivo, ipotizzando un effetto molto limitato dello SNP rs5848 nel aumentare il rischio di sviluppo della FTLD. Un'altra possibile spiegazione per la discrepanza tra i dati ottenuti in questo lavoro di tesi e quanto riportato in letteratura potrebbe risiedere in una combinazione tra fattori ambientali e varianti genetiche che potrebbe risultare differente per la popolazione europea rispetto a quella americana. Comunque nel contesto di una malattia multifattoriale come la FTLD anche il piccolo effetto attuato da uno SNP in combinazione con specifici fattori ambientali può contribuire ad aumentare il rischio di sviluppo della malattia.

Nel 2010 il primo GWAS effettuato su 515 soggetti affetti da FTLD con patologia TDP-43 positiva, ha evidenziato un'associazione significativa con tre SNPs, localizzati a livello di un unico blocco di linkage disequilibrium presente sul cromosoma 7p21. In questa porzione cromosomica è situato il gene *TMEM106b*, che potrebbe essere coinvolto nell'aumento del rischio di sviluppo della malattia attraverso un'alterazione dell'espressione di *GRN*. In questo lavoro di tesi si è voluto studiare se vi sia un'interazione tra questo gene e l'AD. La possibile rilevanza funzionale della variabilità genetica presente nel gene *TMEM206b* è stata determinata anche mediante dosaggio ELISA di molecole come *GRN*, potenzialmente influenzate da tale variabilità. Da i risultati ottenuti *TMEM206b* sembrerebbe non avere nessun ruolo come fattore di suscettibilità nello sviluppo dell'AD; inoltre lo SNP rs1990622 non sembrerebbe avere un effetto modulatore sui livelli di *GRN* plasmatica, in contrasto con quanto riportato in precedenza in letteratura[ref] per i pazienti affetti da FTLD. Dato che in letteratura è riportata la presenza di inclusioni patologiche di TDP-43 in diverse malattie neurodegenerative[248], tra cui l'AD, sarebbe opportuno eseguire uno studio di replicazione, utilizzando una popolazione molto più ampia, indipendente e che preferibilmente abbia la conferma neuropatologica della malattia, per poter trarre delle conclusioni definitive.

Recenti studi di Genome Wide Association (GWAS)[150] hanno permesso di identificare una regione di linkage sul cromosoma 12 come una delle più attendibili per la suscettibilità di sviluppo dell'AD. Alcuni SNPs in differenti geni localizzati sul cromosoma 12 (*A2M*, *LRP1*, *CP2* e *OLR1*) potrebbero avere un ruolo come

marcatori biologici per un aumentato rischio di sviluppo di tale patologia.

Tra questi, il recettore della lipoproteina a bassa densità (LDL) ossidata (*OLR1*) è presente abbondantemente nel cervello e la sua espressione è favorita da citochine infiammatorie, stress ossidativo o patologie diffuse come l'ipertensione e il diabete. I dati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno permesso di dimostrare un'associazione tra lo SNP rs1050283 del gene *OLR1* e il rischio di sviluppare l'AD nella popolazione italiana. La presenza di almeno un allele rs1050283C è associata a una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di espressione relativa di *OLR1* in assenza di una de-regolazione del suo miRNA regolatore, has-miR369-3p. Quest'ultimo dato suggerisce che la presenza di un allele polimorfico potrebbe influenzare il legame tra il miRNA e la sua sequenza consenso presente nel 3'UTR del gene e in cui lo SNP rs1050283 è localizzato.

Per quanto riguarda l'analisi genetica effettuata, i risultati ottenuti in questo studio risultano in accordo con quanto precedentemente riportato in letteratura [151]. Il rischio relativo è piuttosto limitato, ma nel contesto di una malattia multifattoriale come l'AD, la presenza di un polimorfismo potrebbe contribuire in maniera significativa a influenzare la suscettibilità per l'AD interagendo con altri fattori genetici e ambientali sconosciuti. Inoltre non è possibile escludere che *OLR1* possa essere in LD con un terzo gene ancora sconosciuto. A questo proposito, è utile sottolineare che i geni *CLEC1*, *CLEC2*, *CLL1* e *LLT1*, anche loro codificanti per recettori delle LDL ossidate, sono localizzati sul cromosoma 12 tra *OLR1* e *A2M* e che un loro possibile ruolo nello sviluppo dell'AD dovrebbe essere studiato (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview). L'importanza dello SNP rs1050283 presente nel 3'UTR di *OLR1* nello sviluppo dell'AD è stata convalidata dallo studio di espressione condotto in questo lavoro; infatti è stata osservata una diminuzione significativa dei livelli di espressione di *OLR1* in quei pazienti portatori di almeno un allele rs1050283C polimorfico. Dato che rs1050283 è situato anche nel sito di binding del miRNA hasa-miR369-3p è stata condotta anche un'analisi d'espressione dei livelli relativi di tale miRNA, stratificando i risultati in base alla presenza di almeno un allele polimorfico. È stato dimostrato che i livelli di espressione del miRNA non hanno subito modificazioni, in contrasto con quanto osservato per i livelli di espressione relativa di *OLR1*. Questa osservazione suggerisce che potrebbe essere presente un aumento della forza di legame tra il miRNA e la sua sequenza consenso dovuto alla presenza dello SNP rs1050283. È stata inoltre osservata una correlazione negativa, seppur non significativa, tra l'espressione genica di *OLR1* e has-miR369-3p nei pazienti portatori di almeno un allele C polimorfico, anche se il numero limitato di soggetti e l'ampia distribuzione osservata non permettono di trarre conclusioni certe. Inoltre, considerando anche il numero limitato di pazienti utilizzati per quest'analisi di espressione, sarebbe opportuno confermare questi dati in una popolazione molto più ampia. *OLR1* è abbondantemente espresso nel sistema nervoso centrale e le lipoproteine sono risultate essere presenti nel CSF [151]. Tali proteine sembrano essere vulnerabili allo stress ossidativo e tale caratteristica appare molto importante soprattutto nell'AD, in cui le specie reattive dell'ossigeno sono altamente prodotte a causa della presenza di uno stato infiammatorio cronico. L'ossidazione delle lipoproteine contribuire alla distruzione di molti meccanismi cellulari contribuendo allo sviluppo o alla progressione della malattia.

In conclusione i dati ottenuti suggeriscono come lo SNP rs1050283 presente nel

gene *OLR1* possa essere considerato un fattore di rischio per lo sviluppo dell'AD sporadico. La presenza di almeno un allele polimorfico potrebbe influenzare il legame del miRNA hsa-miR369-3p al suo sito di binding contribuendo a promuovere una down-regolazione dell'espressione di *OLR1*. Nonostante questo sarebbe opportuno effettuare un'analisi di replicazione utilizzando tessuto cerebrale per poter confermare tali risultati, soprattutto perché *OLR1* risulta essere espresso circa cinque volte di più in parti differenti del sistema nervoso centrale rispetto a quanto espresso nelle PBMC[151]. Infine sarebbe necessario effettuare uno studio di binding *in vitro* per verificare l'effettivo legame tra la sequenza consenso presente nel 3'UTR di *OLR1* e il miRNA hsa-miR369-3p.

6 CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sulla ricerca di mutazioni autosomiche dominanti che potessero essere causa di due malattie neurodegenerative, quali la Malattia di Alzheimer e la Degenerazione Lobare Frontotemporale. Sulla restante popolazione, denominata sporadica, il lavoro si è concentrato sull'analisi genetica e funzionale di alcuni geni candidati, scelti secondo l'approccio del gene candidato posizionale e funzionale, che potessero essere coinvolti nell'eziopatogenesi delle due malattie come fattori di suscettibilità.

Per quanto riguarda lo screening genetico sono stati analizzati i più frequenti geni causali noti in letteratura, che sono *PSEN1*, *PSEN2* e *APP* per quanto riguarda l'AD e *MAPT*, *GRN* e *C9orf72* per i soggetti affetti da FTLD. Tramite sequenziamento diretto sono stati individuati 18 pazienti portatori di mutazioni causali, 16 dei quali presentavano mutazioni a livello del gene *GRN*; inoltre un paziente è risultato essere portatore di una nuova variante, Gly304Ser (g123789 G>A), situata a livello dell'esone 10 di *MAPT*. Per escludere che questa variante rappresentasse un polimorfismo raro, sono stati analizzati altri 167 pazienti con diagnosi clinica di FTLD e 179 controlli sani mediante analisi HRM; nessuno è risultato portatore della variante allelica descritta. L'analisi in silico ha evidenziato un possibile effetto negativo di tale variante sulla funzionalità proteica.

L'espansione esanucleotidica situata nel primo introne del gene *C9orf72* è stata analizzata, tramite *Primer-Repeat PCR* e relativa analisi dei frammenti, in una popolazione di pazienti affetti da FTLD molto ampia (651 FTLD, 21 CBS, 31 PSP) grazie alla collaborazione di diversi gruppi di ricerca afferenti a Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale.

Sono stati individuati 39 pazienti portatori dell'espansione patologica esanucleotidica (17 maschi e 22 femmine). Come ci si aspettava anche l'analisi condotta su 222 controlli sani non ha prodotto nessun risultato positivo così come lo screening sui pazienti affetti da CBS e PSP.

Come detto in precedenza sulla popolazione sporadica di pazienti affetti da AD e FTLD è stato scelto di eseguire diversi studi di associazione caso-controllo utilizzando l'approccio del gene candidato posizionale e funzionale. Pertanto è stata analizzata la variabilità genetica associata al gene *GRN* sia nella popolazione FTLD sporadica sia nei pazienti affetti da AD. In questo caso è stato scelto di focalizzare l'attenzione in particolare su due SNPs, rs9897526G>A e rs5848C>T, che presentano una MAF >10% e che per tale motivo avrebbero potuto giocare un ruolo come fattori di suscettibilità. E' stata osservata una tendenza all'aumento della frequenza dell'allele rs5848T nei pazienti AD rispetto ai controlli sani, mentre per quanto riguarda lo SNP rs9897526, stratificando i risultati in base all'età d'esordio della malattia (LOAD/EOAD), è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa dell'età d'insorgenza per quei pazienti portatori di almeno un allele polimorfico.

Lo studio di associazione condotto sulla popolazione FTLD si è concentrato su 4 Tagging SNP scelti in modo da coprire tutta la sequenza del gene (rs2879096, rs3785817, rs4792938 e rs9897526); inoltre è stato analizzato anche lo SNP rs5848, localizzato nel 3'UTR. Considerando separatamente ciascuno SNP, non è stata osservata alcuna differenza significativa tra pazienti FTLD e controlli sani per

quanto riguarda le frequenze alleliche. E' stata osservata, però, un'associazione statisticamente significativa del genotipo CC nel caso dello SNP rs4792938 nei pazienti FTLD rispetto ai controlli.

E' stata anche analizzata la variabilità genetica presente nei geni *TMEM106b* e *OLR1* su pazienti affetti da AD sporadico.

Nel primo caso è stato condotto uno studio di associazione caso-controllo su tre SNPs, rs1020004 A/G, rs6966915 C/T e rs1990622 A/G, ma non è stata osservata alcuna differenza significativa né per quanto riguarda le frequenze alleliche né per quelle genotipiche.

Inoltre la possibile rilevanza funzionale della variabilità genetica presente in questo gene è stata determinata mediante dosaggio ELISA di molecole come GRN in 80 pazienti. I risultati ottenuti sono stati stratificati in base al genotipo dello SNP rs1990622 e il confronto tra il genotipo di rs1990622 e i livelli di GRN non ha mostrato nessun risultato significativo.

Per quanto riguarda *OLR1* è stato studiato in particolare lo SNP rs1050283 T/C, posizionato nel 3'UTR del gene, che era già stato recentemente associato a un aumentato rischio di sviluppare AD[151]. L'analisi di regressione logistica lineare, corretta per genere e per genotipo *ApoE*, ha evidenziato la presenza di un'associazione statisticamente significativa dello SNP rs1050283 T/C, sia ipotizzando un modello dominante, sia ipotizzando un modello genotipico. Pertanto tale SNP potrebbe essere considerato un fattore di suscettibilità per l'insorgenza di AD. Dato che rs1050283 è situato anche nel sito di binding per il miRNA hsa-miR369-3p, è stata effettuata un'analisi preliminare dei livelli di espressione dei due trascritti nelle PBMC per verificare un possibile ruolo funzionale della variabilità genetica individuale sull'espressione del gene *OLR1*. Considerando i livelli di espressione sia di *OLR1* sia di hsa-miR369-3p non sono state riscontrate differenze significative; dopo aver stratificato i risultati in base alla presenza dell'allele rs1050283C è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di espressione di *OLR1* nei portatori di almeno un allele C rispetto ai non portatori, a dispetto di una normale espressione di hsa-miR369-3p. Questo dato potrebbe far pensare al fatto che la presenza di almeno un allele polimorfico influenzi il legame del miRNA al suo sito di binding contribuendo a promuovere una down-regolazione dell'espressione di *OLR1*.

Studi più approfonditi si focalizzeranno sui soggetti portatori di mutazioni in *GRN*. In particolare è stato da poco intrapreso uno studio di espressione genica mediante l'utilizzo di arrays specifici, volto a determinare il profilo di espressione di 88 citochine e 88 chemochine e recettori, in soggetti portatori di mutazione in *GRN* rispetto a soggetti affetti non portatori e controlli sani. Questo sulla base dell'osservazione che le mutazioni in *GRN* provocano aploinsufficienza, e la mancanza di un fattore di crescita con proprietà anti infiammatorie, quale è progranulina, potrebbe giocare un ruolo fondamentale nell'insorgenza di neuro degenerazione.

I primi risultati, seppur molto preliminari, mostrerebbero una down-regolazione dei geni che codificano sia per citochine sia per chemochine nei pazienti portatori di mutazione rispetto ai non portatori, in cui invece l'espressione risulta essere up-regolata, suggerendo quindi un diverso meccanismo di regolazione.

Infine sarebbe interessante utilizzare i medesimi pathways di espressione genica

per analizzare pazienti portatori di mutazioni in altri geni considerati causali, come *C9orf72*, rispetto a pazienti sporadici, ma anche confrontare gli stessi soggetti con dei controlli sani.

BIBLIOGRAFIA

1. Götz J., Eckert A., Matamales M., Ittner L.M., Liu X.; "Modes of A β toxicity in Alzheimer's disease"; *Cell. Mol. Life Sci.* (2011), 68:3359–3375, DOI 10.1007/s00018-011-0750-2.
2. Khachaturian Z.S., "Plundered memories", *The Sciences* (1997), Vol. 37, no. 4, pp. 20-25.
3. Rocca W.A., Amaducci L.A., Schoenberg B.S.; "Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease"; *Ann. Neurol.* (1986), Vol. 19, no. 5, pp. 415-24.
4. Tomilson BE et al. Observation on the brain of demented old people. *J Neurol Sci* 1970, 11, 205-242.
5. Rocca WA, Amaducci L. epidemiology of Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology: a tribute to Bruce Schoenberg.* Crc press Inc, Boca Raton, Florida, 1991.
6. Whitehouse PJ. Genesis of Alzheimer. *Neurology* 1997, 48, 2-7.
7. Spinnler H. Il decadimento demenziale. *Il pensiero scientifico*, 1985.
8. Khachaturian ZS. Plundered memories. *The Sciences* 1997, 20-25.
9. Flicker C., Ferris S.H., Reisberg B., "Mild cognitive impairment in the elderly: predictors of dementia", *Neurology* 1991; 41: 1006–09.
10. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, et al., "Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome", *Arch Neurol* 1999; 56: 303–08.
11. Dubois B. et al., Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria 2007 *Lancet Neurol* 6: 734-746
12. Whitehouse P.J.; "Genesis of Alzheimer's disease"; *Neurology* (1997), Vol. 48, no. 5 Suppl 7, pp. S2-7
13. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *Journal of neuropathology & experimental neurology*, 1997, 56, 321–339.
14. Jarrett JT et al. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993, 32, 4693–4697.
15. Iwatsubo T et al. Visualization of Abeta 42(43) and Abeta 40 in senile plaques with end-specific a beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is Abeta 42(43). *Neuron* 1994, 13, 45–53.
16. Roher AE et al. Chemical characterization of a β 17–42 peptide: a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269, 10987–10990.
17. Iwatsubo T et al. Amyloid β protein (A β) deposition: A β 42(43) precedes A β 40 in down syndrome. *Annals of Neurology* 1995, 37, 294–299.
18. Lemere CA et al. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A α -42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature Medicine* 1996, 2, 1146–1150.
19. Lemere CA et al. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid α -peptides and ApoE in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiological Disorders* 1996, 3, 16–32.

20. Grundke-Iqbal I et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, 83, 4913–4917.
21. Kosik KS et al. Microtubule-associated protein, tau, is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986, 83, 4044–4048.
22. Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *Journal of Biochemistry* 1986, 99, 1541–1544.
23. Wood JG et al. Neurofibrillary tangles 1986, 83, 4040–4043.
24. Goedert M, et al. The neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. In: *The molecular and genetic basis of neurological disease (2nd ed.)*, Rosenberg M, Prusiner SB, Di Mauro S, Barchi RL, Boston, MA, Butterworth-Heinemann, 1996, 613–627.
25. Strittmatter WJ et al. Apolipoprotein E: high avidity binding to α -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993, 90, 1977–1981.
26. Webster S et al. Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, c5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997, 18, 415–421.
27. Snow AD et al. Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans to the beta-Amyloid protein of Alzheimer's disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995, 320, 84–95.
28. Ghiso J et al. The cerebrospinal fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to sp40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane attack complex. *Biochemical Journal* 1993, 293, 27–30.
29. Verbeek MM et al. *Cerebrovascular amyloidosis in Alzheimer's disease and related disorders*. Amsterdam. Ed. Kluwer, 2000.
30. Caramelli P et al. Structural correlates of cognitive deficits in a selected group of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatry, neuropsychology, and behavioral neurology* 1998, 11, 84–90.
31. Veerbek M et al. Differences between the pathogenesis of sp and ca in AD. *Journal of neuropathology & experimental neurology* 1997, 56 (7), 751–761.
32. Suzuki N et al. High tissue content of soluble β 1–40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *American Journal of Pathology* 1994, 145, 452–460.
33. Oltersdorf T et al. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *Journal of Biological Chemistry* 1990, 265, 4492–4497.
34. Hung AY, Selkoe DJ. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of β -amyloid precursor protein. *EMBO Journal* 1994, 13, 534–542.
35. Walter J et al. Ectodomain phosphorylation of β -amyloid precursor protein

- at two distinct cellular locations. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 1896–1903.
36. Weidemann A et al. Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and β -amyloid precursor protein. *Nature Medicine* 1997, 3, 328–332.
37. Haass C et al. The Swedish mutation causes early onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine* 1995, 1, 1291–1296.
38. Smith RP et al. Platelet coagulation factor xia-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 1990, 248, 1126–1128
39. Esch FS et al. Cleavage of amyloid β -peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990, 248, 1122–1124.
40. Esler WP, Wolfe MS. A portrait of alzheimer secretases—new features and familiar faces. *Science* 2001, 293, 1449–1454.
41. Seubert P et al. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the aminotermius of the b-amyloid peptide. *Nature* 1993, 361, 260–263.
42. Vassar R, Citron M. A β -generating enzymes: recent advances in β - and γ -secretase research. *Neuron* 2000, 27, 419–422.
43. Perez RG et al. Mutagenesis identifies new signals for β -amyloid precursor protein endocytosis, turnover and the generation of secreted fragments, including A β 42. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274, 18851–18856.
44. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 2001, 81, 741–766.
45. Haass C et al. The Swedish mutation causes early onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine* 1995, 1, 1291–1296.
46. Higgins LS et al. P3 β -amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *American Journal of Pathology* 1996, 149, 585–596.
47. Sisodia SS. β -amyloid precursor protein cleavage by a membranebound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 6075–6079.
48. Sambamurti K et al. Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *Journal of Neurosciences Research* 1992, 33, 319–322.
49. Cook DG et al. Alzheimer's a β (1-42) is generated in the endoplasmic reticulum /intermediate compartment of NT2 cells. *Nature Medicine* 1997, 3, 1021–1023.
50. Motter S et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 1995, 38(4), 643–8.
51. Koo EH et al. Precursor of amyloid protein in Alzheimer's disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, 87, 1561–1565.
52. Yamazaki T et al. Trafficking of cell surface β -amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *Journal of Cell*

- Biology 1995, 129, 431–442.
53. Poduslo JF et al. Receptor-mediated transport of human amyloid betaprotein 1–40 and 1–42 at the blood-brain barrier. *Neurobiological Disorders* 1999, 6, 190–199.
54. Saitoh T et al. Secreted form of amyloid β protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 1989, 58, 615–622.
55. Mattson M et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron* 1993, 10, 243–254.
56. Tanzi RE et al. Protease inhibitor domain encoded by an Amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 1998, 331, 528–532.
57. Sinha S et al. The protease inhibitory properties of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 1990, 265, 8983–8985.
58. Schubert D et al. The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 1989, 3, 689–694.
59. Teller JK et al. Presence of soluble Amyloid β peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Medicine* 1996, 2, 93-95.
60. Tabaton M et al. Is Amyloid beta protein glycosylated in AD? *Clinical neuroscience and neuropathology. Neuroreport* 1997, 8, 907-909.
61. Hendriks L et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature Genetics* 1992, 1, 218-221.
62. Lesne S and Kotilinek L. Amyloid plaques and amyloid-beta oligomers: an ongoing debate. *Journal of Neurosciences* 2005, 25, 9319-9320.
63. Oddo S et al. Temporal profile of amyloid-beta (A β) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between A β and tau pathology. *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 281, 1599-1604.
64. Postina R et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation* 2004, 113, 1456-1464.
65. Furukawa K et al. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *Journal of Neurochemistry* 1996, 67, 1882-1896.
66. Sennvik K et al. Levels of α - and β - secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosciences Letters* 2000, 278, 169-172
67. Hardy J., "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease", *Trends Neurosci.*, Vol. 20, no 4, 1997, pp. 154-159
68. Hutton M., Hardy J.; "The presenilins and Alzheimer's disease"; *Hum. Mol. Genet.* (1997), Vol. 6, no. 10, pp. 1639-1646.
69. Zhang C., Wu B., Beglopoulos V., Wines-Samuelson M., Zhang D., Dragatsis I., Südhof T.C., Shen J.; "Presenilins are Essential for Regulating Neurotransmitter Release". *Nature* (2009), 460 (7255): 632–6. doi:10.1038/nature08177.

70. Kim T.W., Pettingell W.H., Hallmark O.G., Moir R.D., Wasco W., Tanzi R.E.; "Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells"; *J. Biol. Chem.* (1997), Vol. 272, no. 17, pp. 11006-10.
71. Steiner H., Capell A., Pesold B., Citron M., Kloetzel P.M., Selkoe D.J., Romig H., Mendla K., Haass C.; "Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation"; *J. Biol. Chem.* (1998), Vol. 273, no. 48, pp. 32322-31.
72. Prox J., Rittger A., Saftig P.; "Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and Presenilin"; *Exp. Brain Res.* (2011), Springer-Verlag, DOI 10.1007/s00221-011-2952-0. 106
73. Kaether C., Lammich S., Edbauer D., Ertl M., Rietdorf J., Capell A., Steiner H., Haass C.; "Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane"; *J. Cell Biol.* (2002), Vol. 158, no. 3, pp. 551-61.
74. Georgakopoulos A., Marambaud P., Efthimiopoulos S., Shioi J., Cui W., Li H.C., Schütte M., Gordon R., Holstein G.R., et al.; "Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts"; *Mol. Cell.* (1999), Vol. 4, no. 6, pp. 893-902.
75. Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y.Q., Rogueva E., Chen F., Kawarai T., Supala A. et al.; "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing", *Nature* (2000), Vol. 407, no. 6800, pp. 48-54.
76. De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K., Van Leuven F.; "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein"; *Nature* (1998), 391:387-390.
77. Xia W., Zhang J., Kholodenko D., Citron M., Podlisny M.B., Teplow D.B., Haass C., Seubert P., Koo E.H., Selkoe D.J.; "Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins"; *J. Biol. Chem.* (1997) Vol. 272, no. 12, pp. 7977-82.
78. Naruse S., Thinakaran G., Luo J.J., Kusiak J.W., Tomita T., Iwatsubo T., Qian X., Ginty D.D., Price D.L., Borchelt D.R., Wong P.C., Sisodia S.S.; "Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons"; *Neuron* (1998), Vol. 21, no. 5, pp. 1213-21.
79. Thinakaran G., Regard J.B., Bouton C.M., Harris C.L., Price D.L., Borchelt D.R., Sisodia S.S.; "Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP"; *Neurobiol Dis.* (1998), Vol. 4, no. 6, pp. 438-53.
80. De Strooper B., Annaert W.; "Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease"; *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (2010), 26:235-260.
81. Spasic D., Tolia A., Dillen K., Baert V., De Strooper B., Vrijens S., Annaert W.; "Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway"; *J. Biol. Chem.* (2006), 281 (36): 26569-77
82. Steiner H., Fluhrer R., Haass C.; "Intramembrane proteolysis by gamma-secretase"; *J. Biol. Chem.* (2008), 283:29627-29631.

83. Jorissen E., De Strooper B.; "Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch"; *Curr. Top. Dev. Biol.* (2010), 92:201–230.
84. Castellani R.J., Nunomura A., Lee H., et al., "Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above", *J. Alzheimer Dis.*, Vol. 14, 2008, pp. 377-383
85. Mc Geer PL, Mc Geer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2001, 22, 799-809.
86. Mc Geer PL, Mc Geer EG. Autotoxicity and Alzheimer's disease. *Archives of Neurology* 2000,57, 789–790.
87. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience* 1999, 22, 219–40.
88. Aisen PS. Anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease: implications of the prednisone trial. *Acta Neurologica Scandinavica* 2000, 176, 85–89.
89. Webster S et al. Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, c5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997, 18, 415–421.
90. Das S, Potter H. Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL-1. *Neuron* 1995, 14, 447–56.
91. Eikelenboom P, Veerhuis R. The importance of inflammatory mechanisms for the development of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* 1999, 34, 453–61
92. Gahtan E, Overmier JB. inflammatory pathogenesis in alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli. *Neuroscience & biobehavioral reviews: official journal of the International Behavioral Neuroscience Society* 1999, 23, 615–633.
93. Yamanaka H et al. Genetic risk factors in Japanese Alzheimer's disease patients: alpha1-ACT, VLDLR and ApoE. *Neurobiology of Aging* 1998, 19 (1 Suppl.), S43-46
94. Breitner JC. The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine* 1996, 47, 401-411
95. Corder EH et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993, 26, 921-923.
96. Hallyday GM., Song YJ., Lepar G., et al. Pick bodies in a family with presenilin-1 Alzheimer's disease and frontotemporal dementia *Dement Geriatr Cogn Disord* 8:240-243
97. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology* 1993, 23, 21-48.
98. Martins RN et al. Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. *Journal of Neurochemistry* 1986, 46, 1042-1045.
99. Perry G et al. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2000, 28, 831-834.
100. Pratico D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochemical Pharmacology* 2002, 63, 563-567.
101. Smith MA and Perry G. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *Journal of Neuropathology and*

- Experimental Neurology 1997, 56, 217.
102. Sayre L et al. 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 1997, 68, 2092-2097.
103. Mattson MP. Central role of oxyradicals in the mechanism of amyloid-beta-peptide cytotoxicity. *Alzheimer Disease Review* 1997, 2, 1-14.
104. Thomas T et al. Beta-amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996, 380, 168-171.
105. Horwood N and Davies DC. Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease. *Virchows Archives* 1994, 425, 69-72.
106. Mark RJ et al. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *Journal of Neurosciences* 1997, 17, 1046-1054.
107. Albers DS and Beals MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, 2000, 59, 133-154.
108. Zhang P et al. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 30615-30618.
109. Hirai K et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 2001, 21, 3017-3023.
110. Hedley R et al. Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia. *Annals of Neurology* 2002, 51, 795-797.
111. Bisaglia M et al. Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation. *Neurochemistry International* 2002, 41, 43-54.
112. Nunomura A et al. Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2006, 65 (7), 631-641.
113. Davis KL et al. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer's disease. *JAMA, the Journal of the American Medical Association* 1999, 281, 1401-1406.
114. Whitehouse P.J.; "Genesis of Alzheimer's disease"; *Neurology* (1997), Vol. 48, no. 5 Suppl 7, pp. S2-7
115. Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al.; "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease"; *Nature* (1991), Vol. 349, no. 6311, pp. 704-6. 107
116. Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., et al.; "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease"; *Nature* (1995), Vol. 375, no. 6534, pp. 754-60.
117. Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., et al.; "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus"; *Science* (1995), Vol. 269, no. 5226, pp. 973-7.
118. Hardy J., Selkoe D.J.; "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease:
-

- progress and problems on the road to therapeutics"; *Science* (2002), Vol. 297, no 5580, pp. 353-356.
119. Lemere C.A., Lopera F., Kosik K.S., Lendon C.L., Ossa J., Saido T.C., Yamaguchi H., Ruiz A. et al.; "The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology"; *Nat. Med.* (1996), Vol. 2, no. 10, pp. 1146-50, 130
120. Di Fede G., Catania M., Morbin M., Rossi G., Suardi S., Mazzoleni G., Merlin M., Giovagnoli A.R. et al.; "A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis"; *Science* (2009), Vol. 323, no. 5920, pp. 1473-7.
121. Borchelt D.R., Thinakaran G., Eckman C.B., Lee M.K., Davenport F., Ratovitsky T., Prada C.M., Kim G. et al.; "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A beta 42/1-40 ratio in vitro and in vivo"; *Neuron* (1996), Vol. 17, no. 5, pp. 1005-13.
122. Duff K., Eckman C., Zehr C., Yu X., Prada C.M., Perez-tur J., Hutton M., Buee L., Harigaya Y., Yager D., Morgan D. et al.; "Increased amyloid-beta 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1"; *Nature* (1996), Vol. 383, no. 6602, pp. 710-3.
123. Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G., Johnson-Wood K., Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R. et al.; "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice"; *Nat. Med.* (1997), Vol. 3, no. 1, pp. 67-72.
124. Tomita T., Maruyama K., Saido T.C., Kume H., Shinozaki K., Tokuyoshi S., Capell A., Walter J., Grünberg J., Haass C. et al.; "The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997), Vol. 94, no. 5, pp. 2025-30.
125. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A.; "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families"; *Nature* (1993), Vol. 261, no. 5123, pp. 921-3.
126. Saunders A.M., Schmechel K., Breitner J.C., Benson M.D., Brown W.T., Goldfarb L., Goldgaber D., Manwaring M.G. et al.; "Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases"; *Lancet* (1993), Vol. 342, no. 8873, 1993, pp. 710-1.
127. Grupe A., Li Y., Rowland C., Nowotny P., Hinrichs A.L., Smemo S., Kauwe J.S., Maxwell T.J., Cherny S., Doil L., Tacey K. et al.; "A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late-onset Alzheimer disease"; *Am. J. Hum. Genet.* (2006), Vol. 78, no. 1, pp. 78-88. 108
128. Li H., Wetten S., Li L., St Jean P.L., Upmanyu R., Surh L., Hosford D., Barnes M.R., Briley J.D., Borrie M., Coletta N., Delisle R. et al.; "Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genome-wide association study of Alzheimer disease"; *Arch. Neurol.* (2008), Vol. 65, no. 1, pp. 45-53.
129. Grimaldi L.M., Casadei V.M., Ferri C., et al., "Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism", *Ann. Neurol.*, Vol. 47, no 3, 2000, pp. 361-365
-

130. Papassotiropoulos A., Bagli M., Jessen F., et al., "A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease", *Ann. Neurol.*, Vol. 45, no 5, 1999, pp. 666-668
131. Bi S., Wang D.S., Li G.L., Pan S.H., "Analysis of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in Chinese patients with Alzheimer's disease", *Chin. Med. Sci. J.*, Vol. 19, no. 2, 2004, pp. 93-96
132. Grimaldi L.M., Casadei V.M., Ferri C., et al., "Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism", *Ann. Neurol.*, Vol. 47, no 3, 2000, pp. 361-365
133. Sciacca F.L., Ferri C., Licastro F., et al., "Interleukin-1B polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease", *Neurobiol. Aging.*, Vol. 24, no. 7, 2003, pp. 927-931
134. Hedley R., Hallmayer J., Groth D.M., et al., "Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia", *Ann. Neurol.*, Vol. 51, no. 6, 2002, pp. 795-797
135. Kuo Y.M., Liao P.C., Lin C., et al., "Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia", *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.*, Vol. 17, no. 2, 2003, pp. 94-97
136. Licastro F., Grimaldi L.M., Bonafè M., et al., "Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain", *Neurobiol. Aging.*, Vol. 24, no. 7, 2003, pp. 921-926
137. Collins J.S., Perry R.T., Watson B. Jr, et al., "Association of a haplotype for tumor necrosis factor in siblings with late-onset Alzheimer disease: the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative", *Am. J. Med. Genet.*, Vol. 96, no 6, 2000, pp. 823-830
138. Blacker D., Wilcox M.A., Laird N.M., et al., "Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease", *Nat. Genet.*, Vol. 19, no 4, 1998, pp. 357-360
139. Huerta C., Alvarez V., Mata I.F., et al., "Chemokines (RANTES and MCP-1) and chemokine-receptors (CCR2 and CCR5) gene polymorphisms in Alzheimer's and Parkinson's disease", *Neurosci. Lett.*, Vol. 370, no 2-3, 2004, pp. 151-154
140. Fenoglio C., Galimberti D., Lovati C., et al., "MCP-1 in Alzheimer's disease patients: A-2518G polymorphism and serum levels", *Neurobiol. Aging.*, Vol. 25, no 9, 2004, pp. 1169-1173
141. Galimberti D., Fenoglio C., Lovati C., et al., "CCR2-64I polymorphism and CCR5Delta32 deletion in patients with Alzheimer's disease", *J. Neurol. Sci.*, Vol. 225, no 1-2, 2004, pp. 79-83
142. Venturelli E., Galimberti D., Fenoglio C., et al., "Candidate gene analysis of IP-10 gene in patients with Alzheimer's disease", *Neurosci Lett.*, Vol. 404, no. 1-2, 2006, pp. 217-221
143. Dahiyat M., Cumming A., Harrington C., et al., "Association between Alzheimer's disease and the NOS3 gene", *Ann. Neurol.*, Vol. 46, no. 4, 1999, pp. 664-667
144. Galimberti D., Venturelli E., Gatti A., et al., "Association of neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism with Alzheimer's disease", *J. Neurol.*, Vol. 252, pp. 985-6

145. Liou Y.J., Hong C.J., Liu H.C., et al., "No association between the neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism and Alzheimer's disease", *Am. J. Med. Gen.*, Vol. 114, 2002, pp. 687-688
146. Feulner T.M., Laws S.M., Friedrich P., et al., "Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study", *Mol. Psychiatry.*, Vol. 15, no 7, 2010, pp. 756-766
147. Reiman E.M., Webster J.A., Myers A.J., et al., "GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers", *Neuron.*, Vol. 54, 2007, pp. 713-720
148. Bertram L., McQueen M.B., Mullin K., et al., "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database", *Nat. Genet.*, Vol. 39, 2007, pp. 17-23 112
149. Del Bo R, Comi GP, Bresolin N, Castelli E, Conti E, Degiuli A, Ausenda CD, Scarlato G. The apolipoprotein E ε4 allele causes a faster decline of cognitive performances in Down's syndrome subjects. *J Neurol Sc* 1997; 145:87-91.
150. Gary W. Beecham, Eden R. Martin, Yi-Ju Li, Michae A. Slifer, John R. Gilbert, Jonathan L. Haines, Margaret A. Pericak-Vance Genome-wide Association Study Implicates a chromosome 12 Risk Locus for Late-Onset Alzheimer Disease. *The American Journal of Human Genetics* 84, 35-43, January 9, 2009.
151. J-C Lambert, E Luedeking-Zimmer, S Merrot, A Hayes, U Thaker, P Desai, A Houzet, X Hermant, D Cottel, A Pritchard, T Iwatsubo, F Pasquier, B Frigard, P M Conneally, M-C Chartier-Harlin, S T DeKosky, C Lendon, D Mann, M I Kamboh, P Amouyel Association of 3'-UTR polymorphisms of the oxidised LDL receptor 1 (OLR1) gene with Alzheimer's disease. *J Med Genet* 2003;40:424-430
152. Nelson P., Wang WX, Rajeev BW. MicroRNAs in neurodegenerative Diseases *Brain Pathology* ISSN 1015-6305.
153. Charlotte Delay, Wim Mandemakers, Sébastien S. Hébert MicroRNAs in Alzheimer's disease *Neurobiology of Disease* 46 (2012) 285-290
154. Lukiw, W.J., 2007. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 18, 297-300.
155. Shioya, M., et al., 2010. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neuron navigator-3. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 36, 320-330.
156. Finnerty, J.R., et al., 2010. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J. Mol. Biol.* 402, 491-509.
157. Nelson, P.T., Wang, W.-X., 2010. MiR-107 is reduced in Alzheimer's disease brain neocortex: validation study. *J. Alzheimers Dis.* 21, 75-79.
158. Nunez-Iglesias, J., et al., 2010. Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One* 5, 88-98.
159. Wang, W.-X., et al., 2008. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J. Neurosci.* 28, 1213-1223.

160. Rademakers, R., et al., 2008. Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3631–3642
161. Delay, C., et al., 2011. Alzheimer-specific variants in the 3'UTR of amyloid precursor protein affect microRNA function. *Mol. Neurodegener.* 6, 70.
162. Rosen H.J., Allison S.C., Ogar J.M., et al.; "Behavioral features in semantic dementia vs other forms of progressive aphasia"; *Neurology* (2006), 67:1752-1756.
163. Neary D., Snowden J.S., Gustafson L., Passant U., Stuss D., Black S. et al.; "Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria"; *Neurology.* (1998), Vol. 51, no. 6, pp. 1546-54.
164. Rascovsky K., Hodges J.R., Knopman D., et al.; "Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia"; *Brain* (2011), 134:2456-2477.
165. Gorno-Tempini M.L., Hillis A.E., Weintraub S., et al.; "Classification of primary progressive aphasia and its variants"; *Neurology* (2011), 76:1006-1014.
166. Hou C.E., Carlin D., Miller B.L.; "Non-Alzheimer's disease dementias: anatomic, clinical, and molecular correlates"; *Can. J. Psychiatry* (2004), 49:164-171.
167. Scarpini E., Galimberti D., Guidi I., et al.; "Progressive, isolated language disturbance: its significance in a 65-year-old-man. A case report with implications for treatment and review of literature"; *J. Neurol. Sci.* (2006), 240:45-51.
168. Gorno-Tempini M.L., Brambati S.M., Ginex V., et al.; "The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia"; *Neurology* (2008), 71:1227-1234.
169. Rabinovici G.D., Jagust W.J., Furst A.J., et al.; "Abeta amyloid and glucose metabolism in three variants of primary progressive aphasia"; *Ann. Neurol.* (2008), 64:388-401
170. Rankin K.P., Kramer J.H., Miller B.L.; "Patterns of cognitive and emotional empathy in frontotemporal lobar degeneration"; *Cogn. Behav. Neurol.* (2005), 18:28-36.
171. Rankin K.P., Gorno-Tempini M.L., Allison S.C., et al.; "Structural anatomy of empathy in neurodegenerative disease"; *Brain* (2006), 129:2945-2956.
172. Catani M., Piccirilli M., Geloso M.C., Cherubini A., Finali G., Pelliccioli G., Senin U., Mecocci P.; "Rapidly progressive aphasic dementia with motor neuron disease: a distinctive clinical entity"; *Dement Geriatr. Cogn. Disord.* (2004), Vol. 17, no. 1-2, pp. 21-8.
173. Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K., et al., "The prevalence of frontotemporal dementia", *Neurology*, Vol. 58, 2002, pp. 1615–1621
174. The Lund and Manchester Groups; "Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia"; *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (1994), Vol. 57, no. 4, pp. 416-8.
175. Rascovsky K., Hodges J.R., Kipps C.M., et al.; "Diagnostic criteria for the behavioral variant of frontotemporal dementia (bvFTD): current limitations and future directions"; *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* (2007), Vol. 21, pp. S14–18.
176. Kipps C.M., Mioshi E., Hodges J.R., "Emotion, social functioning and

- activities of daily living in frontotemporal dementia”, *Neurocase*, Vol. 15, 2009, pp. 182–189
177. Cummings J.L., Mega M., Gray K., et al., “The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia”, *Neurology*, Vol. 44, 1994, pp. 2308-2314
178. Bozeat S., Gregory C.A., Ralph M.A., et al., “Which neuropsychiatric and behavioural features distinguish frontal and temporal variants of frontotemporal dementia from Alzheimer’s disease?”, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, Vol. 69, 2000, pp. 178–186
179. Kertesz A., Davidson W., Fox H., “Frontal behavioral inventory: diagnostic criteria for frontal lobe dementia”, *Can. J. Neurol. Sci.*, Vol. 24, 1997, pp. 29–36
180. Postiglione A., Milan G., Pappata S., et al., “Fronto-temporal dementia presenting as Geschwind’s syndrome”, *Neurocase*, Vol. 14, 2008, pp. 264–270
181. Shinagawa S., Ikeda M., Nestor P.J., et al., “Characteristics of abnormal eating behaviours in frontotemporal lobar degeneration: a crosscultural survey”, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, Vol. 80, 2009, pp. 1413–1414
182. Piguet O., Petersén Á., Lam B.Y.K., et al., “Eating Disturbance in Behavioural-Variant Frontotemporal Dementia.”, *J. Mol. Neurosci.*, 2011, Epub ahead of print
183. Pasquier F., Lebert F., Lavenu I., et al., “The clinical picture of frontotemporal dementia: diagnosis and follow-up”, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, Vol. 10, suppl. 1, 1999, pp. 10–14
184. Mioshi E., Kipps C.M., Dawson K., et al., “Activities of daily living in frontotemporal dementia and Alzheimer disease”, *Neurology*, Vol. 68, 2007, pp. 2077–2084
185. Pick A., “Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie”, *Prager Medizinische Wochenschrift*, Vol. 17, 1892, pp. 165-167
186. Serieux P., “Sur un cas de surdité verbale pure”, *Rev. Med.*, Vol. 13, 1893, pp. 733–750
187. Mesulam M.M., “Slowly progressive aphasia without generalized dementia”, *Ann. Neurol.*, Vol. 11, 1982, pp. 592–598
188. Mesulam M.M., Weintraub S., “Spectrum of primary progressive aphasia”, *Baillieres Clin. Neurol.*, Vol. 1, 1992, pp. 583–609
189. Hodges J.R., Patterson K., Oxbury S., et al., “Semantic dementia: progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy”, *Brain*, Vol. 115, 1992, pp. 1783–1806
190. Grossman M., Mickanin J., Onishi K. et al., “Progressive non-fluent aphasia: language, cognitive and PET measures contrasted with probable Alzheimer’s disease”, *J. Cogn. Neurosci.*, Vol. 8, 1996, pp. 135–154
191. Mesulam M.M., “Primary progressive aphasia: a language-based dementia”, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 349, 2003, pp. 1535–1542
192. Ogar J.M., Dronkers N.F., Brambati S.M. et al., “Progressive nonfluent aphasia and its characteristic motor speech deficits”, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, Vol. 21, 2007, pp. S23–S30
193. Bozeat S., Lambon Ralph M.A., Patterson K. et al., “Non-verbal semantic impairment in semantic dementia”, *Neuropsychologia*, Vol. 28, 2000, pp.

1207–1215

194. Sieben A., Langenhove T. et al., The Genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration, *Acta Neuropathol*(2012) 124:353-372

195. Graham A., Davies R., Xuereb J., et al., "Pathologically proven frontotemporal dementia presenting with severe amnesia", *Brain*, Vol. 128, 2005, pp. 597–605

196. Gorno-Tempini M.L., Dronkers N.F., Rankin K.P., et al., "Cognition and anatomy in three variants of primary progressive aphasia", *Ann. Neurol.*, Vol. 55, 2004, pp. 335–346

197. Mackenzie I.R., Neumann M., Bigio E.H., et al., "Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update", *Acta Neuropathol.*, Vol. 119, 2010, pp. 1–4.

198. Peelaer H., Klijnsma K.Y., de Koning I., et al., "Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration", *J. Neurol.*, Vol. 257, 2010, pp. 747–753

199. Hodges J.R., Davies R.R., Xuereb J.H., et al., "Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia", *Ann. Neurol.*, Vol. 56, 2004, pp 399–406

200. Knibb J.A., Xuereb J.H., Patterson K., "Clinical and pathological characterization of progressive aphasia", *Ann. Neurol.*, Vol. 59, 2006, pp.156 – 165

201. Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K., Hodges J.R.; "The prevalence of frontotemporal dementia"; *Neurology* (2002), 58:1615-1621.

202. Bird T., Knopman D., VanSwieten J., et al.; "Epidemiology and genetics of frontotemporal dementia/Pick's disease"; *Ann. Neurol.* (2003), 54:S29-S31.

203. Goldman J.S., Farmer J.M., Wood E.M., et al.; "Comparison of family histories in FTLD subtypes and related tauopathies"; *Neurology* (2005), 65:1817-1819.

204. Snowden J.S., Neary D., Mann D.M.; "Frontotemporal dementia"; *Br. J. Psychiatry* (2002), 180:140–143.

205. Pickering-Brown S.M.; "The complex aetiology of frontotemporal lobar degeneration"; *Exp. Neurol.* (2007), 114:39-47.

206. DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F., Boxer A.L., Baker M., Rutherford N.J., Nicholson A.M. et al.; "Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS"; *Neuron* (2011), 72:245–256, Elsevier Inc.

207. Renton A.E., Majounie E., Waite A., et al.; "A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD"; *Neuron* (2011), 72:257-268.

208. Van Deerlin VM, Sleiman PM, Martinez-Lage M, (2010) Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions *Nat Genet.*42(3):234-9.

209. Lynch T., Sano M., Marder K.S., et al.; "Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex"; *Neurology* (1994), 44:1878-1884.

210. Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P., et al.; "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17"; *Nature*

- (1998), 393:702–705.
211. Poorkaj P., Bird T.D., Wijsman E., et al.; “Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia”; *Ann. Neurol.* (1998), 43:815–825.
212. Spillantini M.G., Murrell J.R., Goedert M., et al.; “Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia”; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), 95:7737–7741.
213. Rademakers R., Cruts M., Dermaut B., et al.; “Tau negative frontal lobe dementia at 17q21: significant finemapping of the candidate region to a 4.8 cM interval”; *Mol. Psychiatry* (2002), 7, 1064–1074.
214. Goedert M., Jakes R.; “Mutations causing neurodegenerative tauopathies”; *Biochim. Biophys. Acta* (2005), 1739:240-250.
215. Buée L., Delacourte A.; “Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick’s disease”; *Brain Pathol.* (1999), 9:681-693.
216. Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.; “Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer’s disease”; *Neuron* (1989) 3:519-526.
217. Yancopoulos D., Spillantini M.G.; “Tau protein in familial and sporadic diseases”; *Neuromolecular Med.* (2003), 4:37-48.
218. Baker M., Mackenzie I.R., Pickering-Brown S.M., et al.; “Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17”; *Nature* (2006), 442:916–919.
219. He Z., Bateman A.; “Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis”; *J. Mol. Med.* (2003), 81:600–612.
220. Gass J., Cannon A., Mackenzie I.R., et al.; “Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration”; *Hum. Mol. Genet.* (2006), 15:2988-3001.
221. Carecchio M., Fenoglio C., De Riz M., et al.; “Progranulin plasma levels as potential biomarker for the identification of GRN deletion carriers. A case with atypical onset as clinical amnesic Mild Cognitive Impairment converted to Alzheimer’s disease”; *J. Neurol. Sci.* (2009), 287:291-293.
222. Arighi A., Fumagalli G., Jacini F., Fenoglio C., ghezzi L., Pietroboni AM., De Riz M., Serpente M. et al., Early onset behavioral variant frontotemporal demantia due to C9orf72 hexanucleotide repaet expansion: psychiatric clinical presentation, 2012 *J. Alzheimer Dis* (Epub of Print)
223. Holm I.E., Englund E., Mackenzie I.R., et al.; “A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3”; *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2007), 66:884-891.
224. Finch N, Carrasquillo MM, et al., (2011) *TMEM106B* regulates progranulin levels and the penetrance of FTLD in GRN mutation carriers. *Neurology.* 1; 76 (5):467-74.
225. Cruchaga C, Graff C, Chiang HH, Wang J, Hinrichs AL, Spiegel N, Bertelsen S, Mayo K, Norton JB, Morris JC, Goate A (2011). Association of *TMEM106B* gene polymorphism with age at onset in granulin mutation carriers and plasma granulin protein levels. *Arch Neurol.* 68(5):581-6.

226. Stevens M., Van Duijn C.M., De Knijff P., et al.; "Apolipoprotein E gene and sporadic frontal lobe dementia"; *Neurology* (1997), 48, 1526-1529
227. Geschwind D., Karrim J., Nelson S.F., Miller B.; "The apolipoprotein E epsilon4 allele is not a significant risk factor for frontotemporal dementia"; *Ann. Neurol.* (1998), 44:134-138.
228. Galimberti D., Fenoglio C., Cortini F., et al.; "GRN variability contributes to sporadic frontotemporal lobar degeneration"; *J. Alzheimers Dis.* (2010), 19:171-177.
229. Froelich S., Basun H., Forsell C., Lilius L., Axelman K., Andreadis A., Lannfelt L.; "Mapping of a disease locus for familial rapidly progressive frontotemporal dementia to chromosome 17q12-21"; *American Journal of Medical Genetics* (1997), Vol. 74, no. 4, pp. 380-385.
230. Rizzu P., Van Swieten J.C., Joosse M., Hasegawa M., Stevens M., Tibben A. et al.; "High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands"; *American Journal of Human Genetics* (1999), Vol. 64, no. 2, pp. 414-421.
231. Gass J., Cannon A., Mackenzie I.R., Boeve B., Baker M., Adamson J., Crook R. et al.; "Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration"; *Hum. Mol. Genet.* (2006), Vol. 15, no. 20, pp. 2988-3001.
232. Cruts M., Van Duijn C.M., Backhovens H., Van den Broeck M., Wehnert A. et al.; "Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease"; *Human Molecular Genetics* (1998), Vol. 7, No. 1, 43-51.
233. Hantash F.M., Goos D.G., Tsao D., Quan F., Buller-Burckle A. et al.; "Qualitative assessment of FMR1 (CGG)_n triplet repeat status in normal, intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening"; *Genet. Med.* (2010), 12:162-173.
234. Warner J.P., Barron L.H., Goudie D., Kelly K., Dow D., Fitzpatrick D.R., Brock D.J.H.; "A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR"; *Med. Genet.* (1996), 33:1022-1026.
235. Mesulam M., Johnson N., Krefft T.A., et al., "Progranulin mutations in primary progressive aphasia: the PPA1 and PPA3 families", *Arch. Neurol.*, Vol. 64, 2007, pp. 43-47
236. Huey E.D., Grafman J., Wassermann E.M., et al., "Characteristics of frontotemporal dementia patients with a Progranulin mutation", *Ann. Neurol.*, Vol. 60, no 3, 2006, pp.374-380.
237. Rademakers R., Cruts M., van Broekhoven C., "The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies", *Hum. Mut.*, Vol. 24, 2004, pp. 277-295
238. Munoz D.G., Ros R., Fatas M., et al., (2007) "Progressive nonfluent aphasia associated with a new mutation V363I in tau gene", *Am. J. Alzheimers. Dis. Other. Demen.*, Vol. 22, 2007, pp. 294-299
239. Rosso S.M., van Herpen E., Pijnenburg Y.A.L., et al., "Total tau and phosphorylated tau levels in the cerebrospinal fluid of patients with

- frontotemporal dementia due to P301 and G272 tau mutations”, Arch. Neurol., Vol. 60, 2007, pp. 1209-1213
240. Bunker J.M., Kamath K., Wilson L., et al., “FTDP-17 mutations compromise the ability of tau to regulate microtubule dynamics in cells”, J. Biol. Chem., Vol. 17, 2006, pp.11856-11863
193. Hasegawa M., Smith
241. Boeve BF, Boyland KB et al., Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9orf72, Brain 2012;135 784-793
242. Sha SJ, Takada LT et al., Frontotemporal dementia due to C9orf72 mutations: clinical and imaging features. Neurology 2012;79:1002-1011
243. Gijssels I., Van Langenhove T. et al., A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. Lancet Neurol 2012; 11: 54-65
244. Galimberti D, Scarpini E., Clinical phenotypes and genetic biomarkers of FTL. J Neural Transm 2012; 119:851-860
245. Lindquist S, Dunno : et al., Corticobasal and ataxia syndromes widen the spectrum of C9orf72 hexanucleotide expansion disease. Clin Genet 2012[epub of print]
246. Xi Z, Zinman L et al., Investigation of C9orf72 in 4 Neurodegenerative Disorders. Arch Neurol 2012; Sep 10 [Epub of print]
247. Sleegers K, Brouwers N, et al., Progranulin genetic variability contributes to amyotrophic lateral sclerosis Neurology 2008;71: 253-259
248. Davidson Y, Kelley T, Mackenzie IR, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Neary D, Snowden JS, Mann DM (2007) Ubiquitinated pathological lesions in frontotemporal lobar degeneration contain the TAR DNA-binding protein, TDP-43 Acta Neuropathol. 113(5):521-33.

APPENDICI

I risultati descritti in questo lavoro di tesi sono stati pubblicati sulle seguenti riviste scientifiche:

Serpente M, Fenoglio C, Villa C, Cortini F, Cantoni C, Ridolfi E, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Martinelli Boneschi F, Gallone S, Cappa S, Binetti G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. Role of OLR1 and its regulating hsa-miR369-3p in Alzheimer's disease: genetics and expression analysis. *J Alzheimers Dis.* 2011;26(4):787-93.

Pietroboni AM, Fumagalli G., Ghezzi L., Fenoglio C., Cortini F., Serpente M., Cantoni C., Rotondo E., Corti P., Carecchio M., Bassi M., Bresolin N., Galbiati D., Galimberti D., Scarpini E., Phenotypic heterogeneity of the *GRN* Asp22fs mutation in a large italian kindren, 2011 *J Alzheimers Dis*:253-259

Villa C., Ghezzi L., Pietroboni AM., Fenoglio C., Cortini F., Serpente M., Cantoni C., Ridolfi E., Marcone A., Benussi L., Ghidoni R., Jacini F., Arighi A., Fumagalli G., Mandelli A., Binetti G., Cappa S., Bresolin N., Scarpini E and Galimberti D A novel *MAPT* mutation associated with the clinical phenotype of progressive nonfluent aphasia *J Alzheimers Dis* 2011;26:19-26

Fenoglio C., Galimberti D., Cortini F., Kauwe JSK., Cruchaga C., Venturelli E., Villa C., Serpente M., Scalabrini D., MAyo K., Piccio LM., Clerici F., Albani D., Mariani C., Forloni G., Bresolin N., Goate AM., Scarpini E. rs5848 variant influences *GRN* mRNA levels in brain and peripheral mononuclear cells in patients with Alzheimer's disease *J Alzheimers Dis* 2009; 18:603-612

Daniela Galimberti, Chiara Fenoglio, Francesca Cortini, Maria Serpente, Eliana Venturelli, Chiara Villa, Francesca Clerici, Alessandra Marcone, Luisa Benussi, Roberta Ghidoni, Salvatore Gallone, Diego Scalabrini, Ilaria Restelli, Filippo Martinelli Boneschi, Stefano Cappa Giuliano Binetti, Claudio Mariani, Innocenzo Rainero, Maria Teresa Giordana , Nereo Bresolin and Elio Scarpini, *GRN* Variability Contributes to Sporadic Frontotemporal Lobar Degeneration *J Alzheimers Dis* 2010;19:171–177