



Università di Pisa

Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in  
Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

Tesi di Diploma di Specializzazione

“Analisi di metilazione gene specifica in  
pazienti affetti da malattia di Alzheimer”

Relatore:

Prof.ssa Lucia Migliore

Candidato:

Andrea Stocco

---

Anno accademico 2014/2015

*Ad Alessandro*

# Indice

|   |    |
|---|----|
| Riassunto.....  | IV |
| 1. Introduzione .....   | 1  |
| 1.2. Diagnosi .....   | 2  |
| 1.3. Caratteristiche neuropatologiche .....                             | 5  |
| 1.3.1. Peptide beta-amiloide (A $\beta$ ).....                          | 8  |
| 1.4. Genetica della MA.....   | 9  |
| 1.4.1. Forme familiari della MA .....                                   | 9  |
| 1.4.2. Forme sporadiche della MA .....                                  | 10 |
| 1.5. Fattori ambientali coinvolti nella MA.....                         | 13 |
| 1.6. Compromissione dei meccanismi di riparazione al DNA nella MA ..... | 19 |
| 1.6.1. Meccanismi di riparazione al DNA .....                           | 19 |
| 1.6.2. Danno al DNA e meccanismi di riparazione nella MA.....           | 20 |
| 1.7. Epigenetica e MA.....  | 25 |
| 1.7.1. Studi su modelli cellulari e animali di MA .....                 | 27 |
| 1.7.2. Studi su tessuti umani .....                                     | 28 |
| 2. Scopo della tesi .....   | 31 |
| 3. Materiali e Metodi.....  | 32 |
| 3.1. Popolazione oggetto dello studio.....                              | 32 |
| 3.2. Analisi di metilazione del DNA .....                               | 32 |
| 3.3. Methylation-Sensitive High Resolution Melting .....                | 33 |
| 3.4. Pirosequenziamento.....  | 35 |
| 3.5. Array di metilazione .....   | 35 |
| 3.6. Genotipizzazione .....   | 36 |
| 3.7. Analisi Biochimiche .....  | 37 |
| 3.8. Mappa di connettività semantica. ....                              | 37 |
| 3.9. Analisi statistiche .....  | 38 |
| 4. Risultati .....  | 39 |
| 4.1. Risultati Studio 1 .....   | 39 |
| 4.2. Risultati Studio 2 .....   | 44 |
| 5. Discussione .....  | 45 |
| 6. Bibliografia .....   | 53 |

## Riassunto

La malattia di Alzheimer (MA) è una malattia neurodegenerativa che rappresenta da sola circa i due terzi di tutte le forme di demenza. La MA è caratterizzata clinicamente da un progressivo deterioramento delle funzioni cognitive e da atrofia cerebrale che si localizza prevalentemente a livello della neocorteccia. A livello microscopico, il cervello di un individuo affetto è caratterizzato dalla presenza extracellulare di placche senili, costituite da un eccessivo deposito del peptide  $\beta$ -amiloide, che deriva dal taglio proteolitico della proteina precursore dell'amiloide (APP), ad opera degli enzimi  $\beta$ -secretasi (BACE1) e  $\gamma$ -secretasi. Inoltre si riscontra la presenza di grovigli neurofibrillari intracellulari, dovuti all'iperfosforilazione della proteina tau.

Circa l'1-5% dei casi della malattia è riconducibile a mutazioni causative a carico dei geni *PSEN1*, *PSEN2* (codificanti per componenti della  $\gamma$ -secretasi) e *APP* (codificante la proteina APP), mentre nella maggior parte dei casi si manifesta in maniera sporadica, verosimilmente in seguito all'interazione di fattori di suscettibilità genetici, il più noto dei quali è l'*APOE4*, e fattori di origine ambientale, come lo stile di vita, l'alimentazione e l'esposizione ad inquinanti. In particolare sempre più studi hanno mostrato come un deficit di acido folico con compromissione del ciclo dei folati, fondamentale per la sintesi di importanti composti cellulari e per la metilazione di DNA e altre macromolecole, sia associato ad un aumentato rischio di sviluppare la MA. I fattori ambientali promuoverebbero infiammazione e stress ossidativo in grado di indurre danno al DNA e compromissione dei meccanismi per la sua riparazione. Sempre più studi hanno inoltre evidenziato che diversi fattori ambientali sono in grado di indurre alterazioni epigenetiche in grado di contribuire allo sviluppo della MA; in particolare, alterazioni della metilazione del DNA sono state osservate sia a livello di tessuto cerebrale post-mortem che in cellule di sangue periferico di individui con MA.

Nel presente lavoro di tesi sono stati ricercati possibili marcatori epigenetici periferici in soggetti affetti da MA. A tale scopo sono stati condotti due studi. In un primo studio (studio 1) sono stati valutati i livelli di metilazione di geni coinvolti nel processamento del peptide  $\beta$ -amiloide (*PSEN1* e *BACE1*), nella metilazione del DNA (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) e nel metabolismo dei folati (*MTHFR*) mediante la tecnica Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) e i valori ottenuti sono stati correlati con fattori di rischio per la MA, come l'età, il sesso, biomarcatori del ciclo dei folati, quali l'omocisteina, folati e vitamina B12 e presenza del genotipo *APOE*  $\epsilon 4$ . Inoltre in un sottogruppo di questi individui sono state analizzate le forze di connessione tra le variabili

analizzate mediante l'applicazione di reti neurali artificiali (ANN). Dato che è ben noto che nel cervello e nei tessuti periferici di individui con MA vi è sia un aumentato danno al DNA che una alterazione dei meccanismi della sua riparazione, in un secondo studio (studio 2) sono stati valutati i livelli di metilazione di 25 geni che codificano per proteine coinvolte nella riparazione del DNA, mediante la MS-HRM e mediante un array di metilazione.

Tutti i geni analizzati nello studio 1 sono risultati essere ipometilati, con un livello di metilazione inferiore al 5%, tranne il gene *MTHFR* che ha mostrato dei livelli di metilazione compresi tra il 5 e il 75%. Nessuna differenza significativa nei livelli di metilazione dei geni analizzati è stata osservata tra i pazienti e i controlli. Inoltre, l'elaborazione dei risultati mediante l'applicazione delle ANN ha evidenziato interessanti correlazioni tra i livelli di metilazione dei geni *PSENI*, *BACE1*, *MTHFR* e delle *DNMT* e i livelli plasmatici di omocisteina, folati e vitamina B12.

Nello studio 2 sia la MS-HRM che l'array di metilazione hanno mostrato che tutti i geni coinvolti nella riparazione del DNA analizzati sono altamente ipometilati sia nei pazienti con MA che nei controlli, e non è stata evidenziata nessuna differenza tra i due gruppi in esame.

In conclusione, dal momento che non sono state osservate differenze tra i pazienti e i controlli, l'analisi di metilazione dei geni investigati non sembrerebbe essere un utile biomarker nella discriminazione tra pazienti e controlli. Tuttavia, nel loro insieme i risultati ottenuti suggeriscono che c'è una stretta correlazione tra i livelli di metilazione dei geni analizzati a livello del sangue periferico e i livelli plasmatici di omocisteina, folati e vitamina B12, noti biomarcatori associati alla MA.



## **1. Introduzione**

La malattia di Alzheimer (MA) è una malattia neurodegenerativa che rappresenta da sola circa i due terzi di tutte le forme di demenza. E' caratterizzata clinicamente da un progressivo deterioramento delle funzioni cognitive e da atrofia cerebrale che si localizza prevalentemente a livello della neocorteccia. Sebbene siano stati ben caratterizzati i principali eventi patogenetici molecolari che portano alla malattia, si sa ancora poco riguardo le cause che la inducono e nessun tipo di trattamento in grado di curare la malattia è al momento disponibile (Scheltens et al., 2016).

La malattia prende il nome da Alois Alzheimer, psichiatra bavarese che nel 1906 durante un convegno di psichiatria presentò il caso di una sua paziente, Auguste D., donna di 51 anni affetta da una sconosciuta forma di demenza. Nel presentare il caso clinico Alzheimer ipotizzò che le grosse lesioni cerebrali analizzate all'esame autoptico del cervello della paziente potevano essere la causa dei disturbi cognitivi osservati. Solo nel 1910 venne dato un nome alla malattia, da Emil Kraepelin, psichiatra tedesco, che nel suo trattato "Psichiatria" definiva una nuova forma di demenza scoperta da Alzheimer, chiamandola appunto malattia di Alzheimer (Tanzi e Bertram, 2005).

Per diverse ragioni, non ultima la mancanza di test diagnostici specifici e affidabili, è difficile fornire dati precisi sulla incidenza della MA. È stimato che circa 40 milioni di persone sopra i 60 anni sono affetti da demenza e questo numero sembra destinato a raddoppiare nei prossimi vent'anni (Scheltens et al., 2016). Generalmente la malattia esordisce intorno agli 80 anni, sebbene esista una forma ad esordio precoce nella quale la malattia insorge prima dei 65 anni. Sia la prevalenza che l'incidenza della MA sono più elevate nelle donne rispetto agli uomini, specialmente in individui di età superiore agli 80 anni (Qiu et al., 2007).

### **1.1. Quadro clinico**

La patologia inizialmente si manifesta con alcuni sintomi premonitori tra i quali perdita di memoria, difficoltà nelle normali attività quotidiane, problemi di linguaggio, disorientamento nel tempo e nello spazio, diminuzione della capacità di giudizio, difficoltà nel pensiero astratto, cambiamenti di umore, di comportamento, di personalità e mancanza di iniziativa. In una seconda fase l'amnesia diviene più pronunciata e si accompagna a segni di agnosia (difficoltà nel riconoscere le persone), aprassia (difficoltà nel movimento) ed afasia (deterioramento del linguaggio), nonché disturbi nelle funzioni esecutive (Kidd,

2005). La fase terminale può sopraggiungere, nei casi più gravi, dopo soli tre anni dall'esordio, sebbene nella maggior parte dei casi giunge circa dopo venti anni; in questo stadio della malattia si assiste ad una perdita quasi totale delle funzioni vitali, apatia ed inerzia cui segue la morte per patologie collaterali, quali quelle a carico dell'apparato respiratorio. I pazienti con la MA giungono negli stadi avanzati a non poter più svolgere nessuna attività autonoma, vivendo uno stato di assoluta dipendenza dai familiari o dal personale sanitario.

Una fase preclinica della MA è il decadimento cognitivo lieve (“*Mild Cognitive Impairment*”, MCI) che definisce la fase di transizione tra l'invecchiamento normale e la demenza. Si riferisce ad una popolazione di soggetti anziani che non sono compromessi nelle loro attività quotidiane ma che hanno un subclinico ed isolato deficit cognitivo e sono potenzialmente a rischio di sviluppare la MA (Petersen et al., 1999). Alcuni studi mostrano che circa il 30-60% dei pazienti ai quali è stato diagnosticato un decadimento cognitivo lieve progrediscono verso la MA (Bennet et al., 2002; Frisoni et al., 2009), entro un periodo di 4 anni (Petersen, 2007). Per tali ragioni questo stadio predemenziale risulta essere di notevole interesse nella ricerca di terapie preventive che siano in grado, se non di bloccare, almeno di rallentare la progressione verso la demenza (Praticò et al., 2002). Inoltre la diagnosi tempestiva di demenza permette una migliore gestione di alcune fondamentali implicazioni psicologiche e pratiche della malattia, influenzando anche sull'equilibrio del contesto familiare e sociale in cui il malato è inserito (Ashford 2007).

## **1.2. Diagnosi**

La diagnosi di malattia di Alzheimer si pone in termini di probabilità dal momento che la certezza si può avere soltanto con l'esame istopatologico, inattuabile *in vivo*, in quanto richiederebbe la biopsia cerebrale. Il follow-up del paziente resta fondamentale nel confermare o riconsiderare la diagnosi inizialmente posta.

Nel 1984 furono pubblicati dal National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) i primi criteri diagnostici che hanno segnato una svolta importante per la diagnosi della MA, poiché per la prima volta sono stati definiti con precisione gli aspetti clinici e strumentali determinanti per la diagnosi (McKhann et al., 1984). La diagnosi di MA era distinta in tre categorie: diagnosi possibile, diagnosi probabile, e diagnosi certa (esame istopatologico). Questi criteri hanno dimostrato una sensibilità nell'ordine dell'81%



e una specificità del 70% (Knopman et al., 2001). Da tali criteri emergevano due principi fondamentali per la diagnosi di MA: 1) la diagnosi clinica di MA poteva solo essere designata come “probabile” mentre il paziente era in vita e 2) la diagnosi clinica di MA poteva essere fatta solo quando la malattia era già ad uno stadio avanzato. Inoltre la mancanza a quel tempo di criteri clinici per altri tipi di demenza e la mancanza di biomarcatori portavano ad una diagnosi con bassa specificità di differenziazione tra la MA e le alte forme di demenza.

Nel 2007 l’International Working Group (IWG) ha proposto nuovi criteri per la diagnosi della malattia, spostando la MA da entità clinico-patologica ad entità clinico-biologica (Dubois et al., 2014). Questi nuovi criteri proponevano di riconoscere la MA *in vivo* ed indipendentemente dalla demenza, in presenza di due requisiti essenziali. Il primo requisito è che sia avvenuto almeno uno specifico episodio di perdita della memoria che non viene rievocata con l’ausilio di suggerimenti (ad esempio la difficoltà di ricordare una lista di parole, anche con l’ausilio di indizi); questo profilo mnemonico differisce da quelli osservati in pazienti con demenze non associate alla MA, come la demenza frontotemporale, la paralisi sopranucleare progressiva, la malattia di Huntington, il disturbo depressivo maggiore o anche il normale invecchiamento, nelle quali il recupero di memoria è normalizzato con l’ausilio di suggerimenti (Lavenex et al., 1998; Pillon et al., 1994; Fossati et al., 2004; Petersen et al., 1992). Il secondo criterio è la presenza di un biomarcatore coerente e di supporto alla diagnosi di MA: risonanza magnetica strutturale (MRI), tomografia ad emissione di positroni (PET) con fluorodeossiglucosio (FDG PET) o con composto di Pittsburgh (PiB PET); analisi nel liquido cefalorachidiano (CSF) delle concentrazioni del peptide  $\beta$ -amiloide o della proteina tau (proteina tau totale e fosforilata). I criteri stabiliti dal gruppo IWG nel 2007 sono stati di ispirazione per i criteri che sono stati utilizzati nel 2011 dal National Institute on Aging-Alzheimer’s Association (NIA-AA) nella rielaborazione dei criteri NINCDS-ADRDA del 1984. Molti importanti sviluppi sono stati inclusi in questi nuovi criteri, come il riconoscimento di un lungo stadio pre-demenziale. La MA viene inquadrata come un processo fisiopatologico continuo, che parte da una condizione preclinica, per poi passare ad una iniziale pre-demenza (MCI o “MA prodromica”), fino al quadro di demenza conclamato ed evolutivo. Inoltre, sono stati fatti importanti passi avanti nella diagnostica laboratoristica e strumentale, in particolare per quanto riguarda la PET, l’analisi del liquor e la genetica (Dubois et al., 2010; Sperling et al., 2011). Secondo le nuove linee guida per la diagnosi di demenza dovuta a MA si ha la suddivisione in a) demenza da MA probabile, b) demenza da MA possibile e c) demenza

da MA probabile o possibile con evidenza del processo fisiopatologico della MA. I primi due criteri sono utilizzati in ambito clinico e il terzo è attualmente da considerarsi nei contesti di ricerca. Si fa diagnosi di demenza quando sono presenti sintomi cognitivi o comportamentali che coinvolgano almeno due dei seguenti domini:

- compromessa abilità di acquisire o ricordare nuove informazioni;
- deficit nel ragionamento o nello svolgimento di compiti complessi, ridotta capacità di giudizio;
- compromissione delle abilità visuospatiali;
- alterazione del linguaggio;
- modificazioni nella personalità, nel comportamento e nella condotta.

La differenziazione della demenza dall'MCI si basa sulla determinazione se ci sia o meno interferenza significativa con la capacità delle normali attività quotidiane.

La diagnosi di MA probabile si ha quando vengono osservati i criteri per la diagnosi di demenza più le seguenti caratteristiche:

- esordio insidioso (sintomi che si manifestano gradualmente);
- chiara evidenza di peggioramento cognitivo;
- assenza di concomitanti malattie cerebrovascolari, o comunque demenza dovuta ad altre patologie neurologiche.

La diagnosi di demenza da MA possibile si distingue nella demenza con decorso “atipico” nella quale si ha un improvviso esordio del declino cognitivo, e di una forma “mista” in cui vi è evidenza che la demenza è accompagnata da un ictus, o altri danni cerebrali che possono causare demenza.

La diagnosi di demenza da MA probabile o possibile con evidenza del processo fisiopatologico della MA si fa con l'ausilio di biomarcatori. Questi biomarcatori di diagnosi vengono suddivisi in due gruppi:

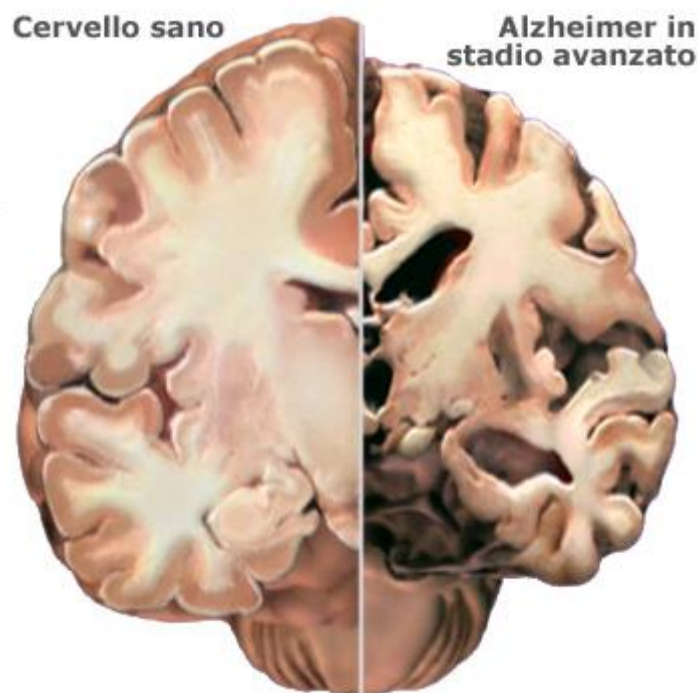
a) i biomarcatori del deposito di peptide  $\beta$ -amiloide nel cervello: bassi livelli di Ab42 nel CSF e positività alla PET amiloide (Jacke et al., 2008; Chetelat et al., 2010).

b) i biomarcatori di degenerazione neuronale: elevati livelli di proteina tau (totale e fosforilata) nel CSF; diminuito uptake di  $^{18}$ F-fluorodeossiglucosio (PET) nella corteccia temporale; anomalie nella struttura dei lobi mediale, basale e del lobo temporale laterale e della corteccia mediale-parietale.

In individui in cui si riscontrano i criteri per una diagnosi di demenza da MA probabile, la presenza di biomarcatori potrebbe incrementare la certezza che la demenza osservata clinicamente è dovuta al processo patofisiologico della MA (McKhann et al., 2011).

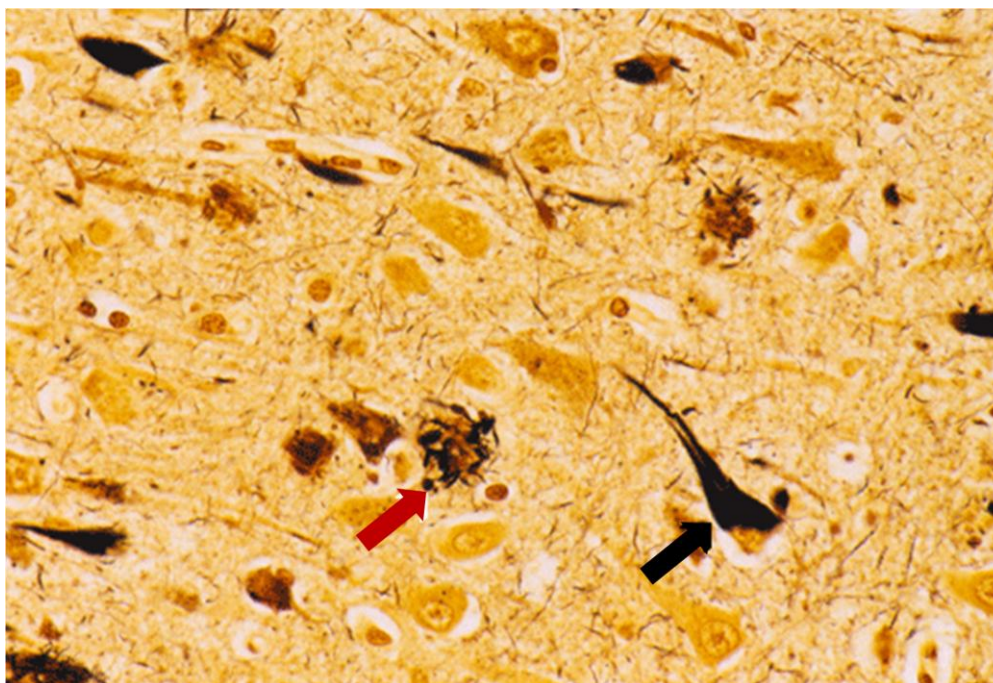
### 1.3. Caratteristiche neuropatologiche

Il cervello di un soggetto affetto dalla malattia di Alzheimer presenta una consistente degenerazione neuronale (Figura 1). Risultano particolarmente colpite l'area corticale temporale mediale (ippocampo, amigdala e corteccia entorinale), l'area parietale e l'area frontale. Si osserva un aumento dell'ampiezza dei solchi cerebrali ed un incremento delle aree ventricolari. La degenerazione neuronale coinvolge inizialmente le spine dendritiche e le giunzioni sinaptiche per poi interessare il corpo neuronale portando alla totale scomparsa della cellula nervosa. Molto spesso anche nell'invecchiamento fisiologico sono riscontrabili i medesimi segni macroscopici ma, oltre che in maniera meno diffusa, interessano quasi principalmente l'area temporale (Sabuncu et al., 2011).



**Figura 1.** Cambiamenti macroscopici a livello cerebrale nella MA. Fonte immagine: Alzheimer's Association, [www.alz.org](http://www.alz.org).

A livello microscopico la MA è caratterizzata da due fondamentali lesioni cerebrali che sono le placche senili ed i grovigli neurofibrillari costituite rispettivamente da depositi extracellulari del peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) e da aggregati intracellulari di proteina tau iperfosforilata (Figura 2). Entrambe le lesioni sono riscontrabili anche nei soggetti sani sebbene l'entità numerica sia assai minore (Katzman, 1993).

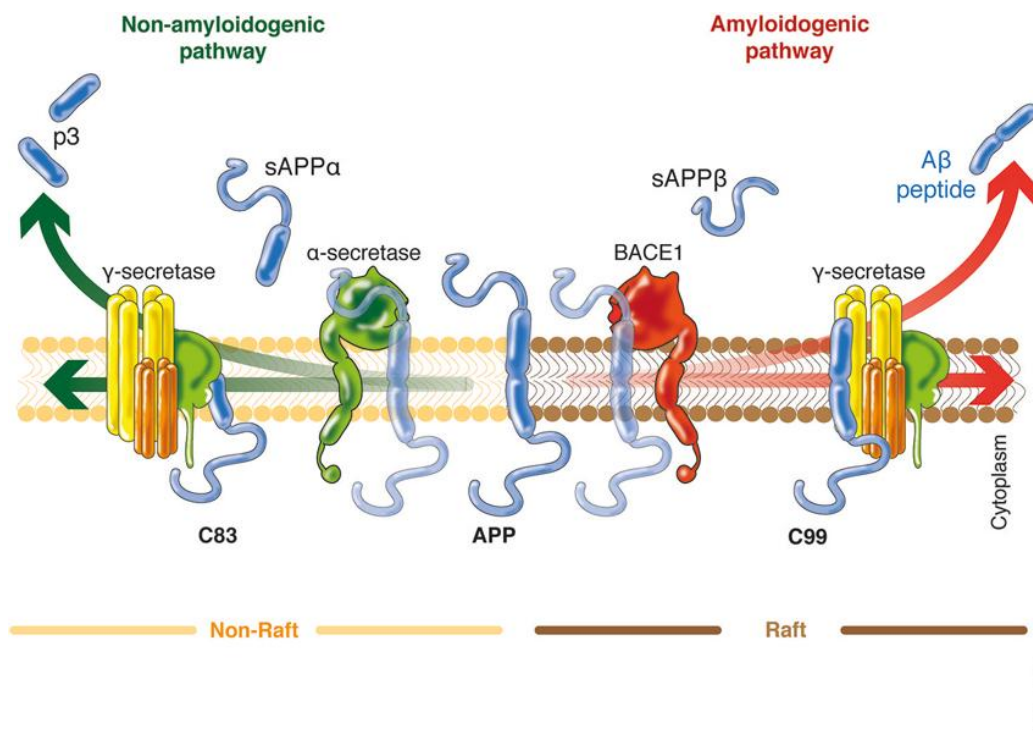


**Figura 2.** Segni microscopici caratteristici della MA. La freccia rossa indica una placca amiloide, la freccia nera indica un groviglio neurofibrillare. Immagine tratta dal sito web <http://thebrain.mcgill.ca/>

I grovigli neurofibrillari sono strutture fusiformi intracellulari, a gomito, localizzati nel citoplasma perinucleare e nei processi neuritici. Tali lesioni sono diffuse ed interessano sia gli strati superficiali sia quelli profondi della corteccia associativa, i neuroni dei nuclei della base ed alcuni nuclei del tronco encefalico. Sono costituiti principalmente dalla proteina tau, una delle proteine associate ai microtubuli (MAP) (Katzman, 1993). La funzione della proteina tau in condizioni fisiologiche è quella di interagire con la tubulina favorendo la formazione del microtubulo e insieme ad altre MAP garantirne la stabilità. Nei grovigli neurofibrillari la proteina tau è iperfosforilata e questo ne determina la polimerizzazione in dimeri insolubili che si aggregano formando i grovigli neurofibrillari. E' probabile che le alterazioni del citoscheletro ostacolino i processi di trasporto assonale, fondamentale nel trasporto di sostanze di natura trofica ed energetica tra corpo cellulare e sinapsi. L'efficienza di questo trasporto è necessaria per mantenere buone connessioni neuronali; quando il trasporto viene alterato i neuroni degenerano e la rete neuronale coinvolta nelle varie funzioni cognitive e vitali viene interrotta, provocando i sintomi tipici di tale malattia (Morishima-Kawashima e Ihara, 2002).

Le placche senili o amiloidi si localizzano extracellularmente. Sono strutture tondeggianti con un diametro compreso tra 50 e 200  $\mu\text{m}$  costituite da assoni e dendriti degeneranti spesso circondati da astrociti reattivi e cellule della microglia, che si accumulano intorno ad un nucleo formato dal peptide  $A\beta$ , il quale genera una sostanza insolubile che tende ad

aumentare di consistenza nel tempo. Il principale componente proteico delle placche senili, il peptide  $A\beta$ , deriva dal taglio proteolitico di una glicoproteina proteina precursore dell'amiloide (APP). L'APP è una proteina transmembrana che ha un lungo segmento N-terminale extracellulare ed un breve segmento C-terminale intracellulare (Kang et al., 1987); è codificata da un gene posto sul cromosoma 21, il gene *APP*, ed è espressa in maniera ubiquitaria nel tessuto nervoso e in altri tessuti periferici (Joachim et al. 1989). La proteina intera è un recettore che manda segnali attraverso le proteine G0 (Scheuermann et al., 2001). Mediante splicing alternativo, vengono prodotte dieci isoforme principali di APP (con misure comprese tra 563 e 770 amminoacidi), tutte potenzialmente amiloidogeniche e i neuroni esprimono principalmente l'isoforma contenente 695 amminoacidi (Peña et al., 2006); in seguito la proteina è sottoposta ad una serie di modificazioni post-traduzionali durante il passaggio attraverso il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi (Scheuermann et al., 2001) e solo una piccola percentuale viene trasportata alla superficie della membrana plasmatica attraverso vescicole secretorie (Selkoe et al., 1994). Una volta ancorata alla membrana la proteina va incontro a diverse vie cataboliche da parte di tre attività proteasiche dette  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  secretasi (Figura 3).



**Figura 3.** Processamento dell'APP (Zolezzi et al., 2014).

L'attività  $\alpha$ -secretasica (enzimi della famiglia ADAM: TACE e ADAM-10), che catalizza la via non amiloidogena, taglia l'APP a livello extracellulare, pochi aminoacidi prima del

dominio idrofobico di membrana: si ottengono così un frammento esteso N-terminale extracellulare che viene rilasciato e un frammento C-terminale di 83 aminoacidi che rimane ancorato alla membrana. La  $\beta$ -secretasi (BACE1), che catalizza invece la via amiloidogena, agisce sempre sul dominio extracellulare dell'APP formando un frammento N-terminale che viene pure secreto nello spazio extracellulare, ed un frammento C-terminale di 99 aminoacidi, che rimane ancorato alla membrana. La  $\gamma$ -secretasi (attività legata alla funzione protesica di un complesso di proteine composte da Presenilina, nicastrina, PEN2 e APOE1) agisce sui frammenti C83 e C99 formati dall'azione delle  $\alpha$ - e  $\beta$ -secretasi; può agire operando un taglio sull'aminoacido 711 o sull'aminoacido 713 dei frammenti C83 e C99. Da C83 si origina un peptide identificato come p3 non aggregante e non neurotossico, mentre da C99 deriva il peptide A $\beta$ , che a seconda del punto di clivaggio della secretasi sarà di 40 o di 42 aminoacidi (Vassar et al., 2009). In condizioni fisiologiche circa il 90% dell'APP viene processato dalla  $\alpha$ -secretasi (Peña et al., 2006) e comunque il peptide A $\beta$  solubile non è presente in alte concentrazioni nei cervelli di pazienti neurologicamente sani; questo fa ipotizzare che nei pazienti con MA ci sia una eccessiva produzione del peptide A $\beta$  o un deficit nel catabolismo del peptide stesso.

### **1.3.1. Peptide beta-amiloide (A $\beta$ )**

All'inizio degli anni '90 è stata proposta la cosiddetta "ipotesi dell'amiloide" secondo la quale l'accumulo di A $\beta$  sarebbe l'evento cruciale nella patogenesi della MA, cui seguirebbero una cascata di eventi che portano alla disfunzione e alla degenerazione del neurone e dei suoi processi (Hardy et al., 1992). Questa ipotesi è nata da tre fondamentali indizi: a) il A $\beta$  è un normale prodotto catabolico cellulare; b) nella sindrome di Down (trisomia 21), in cui esiste una congenita iperproduzione di A $\beta$ , dovuta ad un sovradosaggio genico dell'APP, si sviluppano le alterazioni cerebrali della MA; c) tutte le alterazioni genetiche identificate nei casi familiari ad esordio precoce determinano un'aumentata produzione o un'eccessiva aggregazione di peptide A $\beta$  (Tabaton and Piccini, 2005).

Alcuni importanti studi hanno mostrato che il peptide A $\beta$  probabilmente esercita la sua azione tossica prima ancora di accumularsi nelle placche. Numerosi sono i meccanismi attraverso cui il peptide A $\beta$  esprime la tossicità neuronale. E' ben noto che il peptide A $\beta$  induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno, così promuovendo stress ossidativo

e quindi apoptosi e necrosi cellulare (Butterfield and Lauderback 2002; Butterfield et al., 2001; Eckert et al., 2003; Galli et al., 1998; Keller et al., 1997).

Arispe e collaboratori (Arispe et al., 1993) hanno mostrato che il peptide A $\beta$  è capace di formare pori nel doppio strato lipidico delle membrane cellulari, e hanno suggerito che questi canali altererebbero l'omeostasi cellulare portando a morte il neurone. Inoltre il peptide A $\beta$  favorisce l'azione di neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato e potrebbe così determinare una eccitotossicità dovuta ad un eccessivo ingresso di ioni Ca<sup>2+</sup> nella cellula (Mattson et al., 1992). Il peptide A $\beta$  inoltre inibirebbe il potenziamento a lungo termine (LTP), meccanismo intimamente legato con la memoria, probabilmente limitando l'attività della protein chinasi A (PKA), e di conseguenza la fosforilazione di CREB. Questa proteina svolge un ruolo chiave sia nell'induzione che nel mantenimento del LTP, infatti aumentando i livelli di cAMP, che attiva la PKA, si protegge l'inibizione del LTP mediata dal A $\beta$  (Vitolo et al., 2002).

## **1.4. Genetica della MA**

Da un punto di vista genetico la MA viene suddivisa in una forma familiare ad esordio precoce (esordio prima dei 65 anni, early-onset familial Alzheimer disease EOFAD) che rappresenta circa il 5% dei casi di MA, dovuta a mutazioni in tre geni (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) trasmesse con modelli di ereditarietà mendeliana, ed una forma sporadica ad esordio tardivo (esordio dopo i 65 anni, late-onset Alzheimer disease LOAD), che rappresenta il restante 95% dei casi di MA.

### **1.4.1. Forme familiari della MA**

Studi di clonaggio posizionale hanno portato all'identificazione di tre geni le cui mutazioni portano all'insorgenza della forma familiare ad esordio precoce della MA: il gene dell'*APP* (amyloid precursor protein) che mappa sul cromosoma 21q, il gene *PSEN1* (presenilin 1) che mappa sul cromosoma 14q e il gene *PSEN2* (presenilin 2) che mappa sul cromosoma 1q (Tanzi e Bertram, 2005). Numerosi studi hanno suggerito che le mutazioni in questi tre geni portano ad un risultato comune, ovvero ad un aumento della produzione del peptide A $\beta$ -42 (Holmes, 2002). Dalla identificazione della prima mutazione missenso dell'*APP* responsabile dell'emorragia cerebrale ereditaria con amiloidosi (HCHWA-D) (Levy et al.,

1990) altre 23 mutazioni missenso dell'APP sono state identificate in 77 famiglie MA. Si ritiene che mutazioni a carico dell'APP coinvolgano meno dello 0,1% dei pazienti MA. Tutte le mutazioni missenso dell'APP interessano il processamento dell'APP stessa e in effetti esse si trovano principalmente a livello degli esoni che codificano per il peptide A $\beta$  (esoni 16 e 17 dell'APP). La presenza di tali mutazioni determina un cambiamento del processamento dell'APP con un aumento dell'accumulo del peptide A $\beta$  e formazione delle placche senili. Nel 2009 è stata scoperta una mutazione recessiva del gene nel APP (A673V) collegata all'AD familiare (Di Fede et al., 2009).

Attualmente sono note 185 mutazioni a carico di *PSEN1* e 13 di *PSEN2*, le quali vengono ereditate con modalità autosomica dominante e rappresentano rispettivamente l'80% e il 5% dei casi della forma familiare della MA (Guerreiro et al., 2012). La maggior parte delle mutazioni a carico dei geni *PSEN* sono sostituzioni in singoli nucleotidi, ma sono state descritte anche piccole inserzioni e delezioni (Bettens et al., 2010). Le preseniline, proteine codificate dai geni *PSEN 1* e *2*, sono funzionalmente coinvolte nel taglio proteolitico mediato dal complesso della gamma-secretasi sull' APP (De Stropper et al., 1998). Mutazioni nelle preseniline disturbano questo taglio, portando così ad un incremento del rapporto Abeta42/Abeta40, dovuto sia ad un incremento nella produzione di Abeta42 sia ad una diminuzione di Abeta40 (Bentahir et al., 2006). Il processo neurodegenerativo è dunque una conseguenza di uno sbilanciamento tra la produzione dell'A $\beta$  e la degradazione dello stesso (Selkoe, 1994; Hardy et al., 1992), suggerendo che altri geni coinvolti in questo meccanismo potrebbero essere fattori di rischio.

#### **1.4.2. Forme sporadiche della MA**

Mentre la forma familiare della MA è caratterizzata da un modello di ereditarietà autosomica dominante, la forma sporadica presenta un'eziologia multifattoriale. Infatti, nella patogenesi entrano in gioco non solo diversi fattori genetici ma anche fattori ambientali, come lo stile di vita, l'alimentazione e l'attività fisica. Tuttavia anche nelle forme LOAD la componente genetica svolge un ruolo fondamentale. Infatti parenti di primo grado di individui con la LOAD hanno un rischio doppio della popolazione generale di sviluppare la malattia, ed inoltre studi su gemelli hanno evidenziato che la LOAD si manifesta con maggior frequenza nei fratelli monozigoti (Scheltens et al., 2016).

La prima variante genica che è stata accertata come fattore di rischio nella LOAD è l'allele  $\epsilon 4$  del gene che codifica per l'apolipoproteina E (*APOE*) situato sul cromosoma 19, in



posizione q13 (Strittmatter et al., 1993). L'apolipoproteina E (apoE) è una glicoproteina di 35 kDa presente in tre isoforme, E2, E3, E4, le quali differiscono per un singolo amminoacido; gli alleli  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  codificano per queste isoforme con una prevalenza nella popolazione del 7-8%, 75-80% e 14-15% rispettivamente (Cedazo-Minguez and Cowburn, 2001). Le lipoproteine mediano il trasporto del colesterolo, dei trigliceridi e di altri lipidi all'interno dei fluidi biologici. Le varie isoforme dell' apoE differiscono per le loro preferenze nel legare i recettori per le lipoproteine (LDLR) e per le proteine LDLR-correlate (Davignon et al., 1988). All'interno del sistema nervoso centrale il colesterolo viene sintetizzato e metabolizzato in maniera indipendente rispetto al colesterolo del resto dell'organismo. Nel cervello, così come negli altri tessuti, il colesterolo è un importante componente delle membrane biologiche, un lipide di segnale ed è il principale precursore degli steroidi; inoltre svolge un ruolo importante nei meccanismi di riparo della membrana in seguito ai meccanismi patogenetici della MA e in altri disordini infiammatori del cervello (Bogdanovic et al., 2001; Refolo et al., 2001; Shobab et al., 2005). In queste condizioni gli astrociti e altre cellule della neuroglia sintetizzano il colesterolo e riciclano gli steroli rilasciati dalla degenerazione dei neuroni (Jurevics e Morell, 1995; Pfrieger, 2003). L'apoE è principalmente espressa negli astrociti, microglia e oligodendrociti e svolge un ruolo essenziale nel trasporto del colesterolo e dei fosfolipidi da questi compartimenti gliali ai siti di rigenerazione delle membrane neuroanali e rimielinizzazione. (Beffert and Poirier, 1998; Lane and Farlow, 2005; Vaya et al., 2007).

La presenza dell'allele  $\epsilon 4$  in omozigosi o in eterozigosi conferisce diversi svantaggi in relazione all'omeostasi degli steroli, alla riparazione delle membrane biologiche e ad altre attività vitali per la cellula che possono essere di significativo impatto nella patogenesi di una vasta gamma di disordini cerebrali. In soggetti affetti da MA l'APOE si trova sia nelle placche senili che nei grovigli neurofibrillari (Namba et al., 1991). La formazione del frammento C-terminale tronco dell'isoforma E4 stimola la iperfosforilazione della proteina tau e la formazione di grovigli neurofibrillari (Harris et al., 2003). Inoltre il catabolismo del peptide A $\beta$  è meno efficiente e la deposizione del peptide neurotossico è più pronunciata nel cervello di anziani portatori dell'allele  $\epsilon 4$  (Bennet et al., 2003; Schmechel et al., 1993).

E' importante sottolineare che circa la metà dei portatori omozigoti per l'allele  $\epsilon 4$  non sviluppano la MA, e la mancanza di questo allele non rende immuni dalla malattia (Henderson et al., 1995). Quindi la presenza dell'allele  $\epsilon 4$  non costituisce un marcatore biologico per la malattia e la sua individuazione non viene utilizzata come strumento di

diagnosi (Hyman, 1998; Mayeux et al., 1998). In contrapposizione agli effetti dell'allele  $\epsilon 4$ , la variante *APOE*  $\epsilon 2$  ha un effetto protettivo nei confronti della malattia (Corder et al. 1994); ciò dimostra che differenti varianti dello stesso gene possono avere effetti anche opposti sul rischio della patologia. Questa osservazione ha portato a supporre che l'effetto primario della variante allelica  $\epsilon 4$  sia sull'età di esordio della malattia. L'esordio è anticipato di 5-10 anni in presenza della condizione di eterozigosi per l'allele  $\epsilon 4$  e di 10-20 anni in omozigosi. Il meccanismo molecolare con il quale la variante allelica  $\epsilon 4$  influenza la precocità dell'esordio è ancora sconosciuto (Nussbaum et al., 2003).

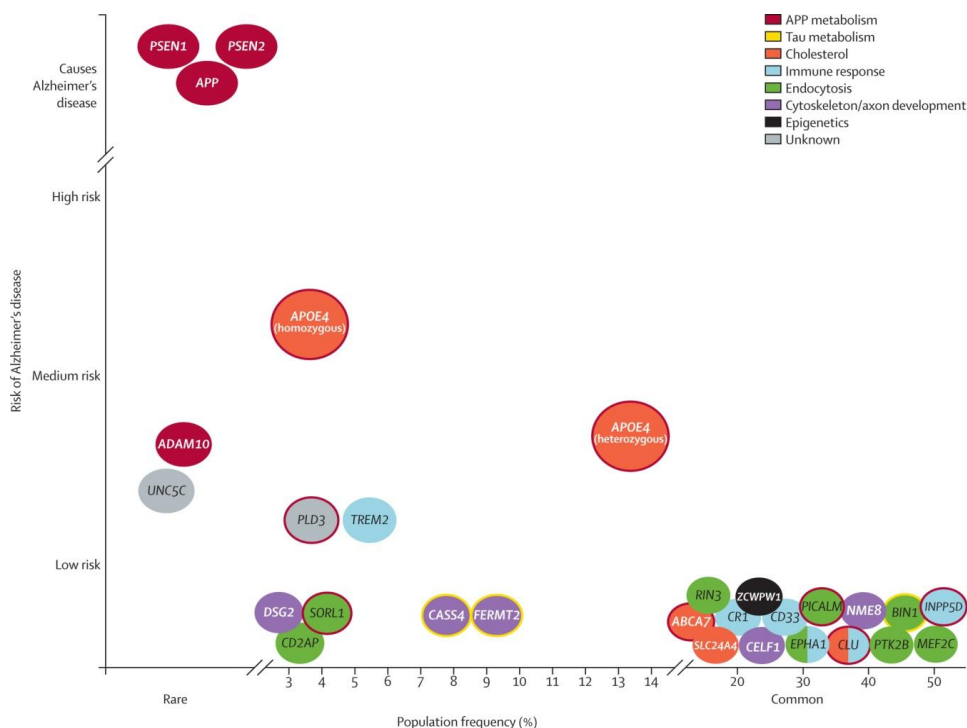
Attraverso studi di *whole-exome sequencing* e *whole-genome sequencing* sono stati individuati altri geni associati al rischio di sviluppare la LOAD, quali *ABCA7*, *CLU*, *CRI*, *CD33*, *CD2AP*, *EPHA1*, *BINI*, *PICALM*, *MS4A* (Karch and Goate, 2015). Mediante una metanalisi altri loci associati alla MA, quali *CASS4*, *CELF1*, *DSG2*, *FERMT2*, *HLA DRB5*, *DBR1*, *INPP5D*, *MEF2C*, *NME8*, *PTK2B*, *SLC24H4*, *RIN3*, *SORL1*, *ZCWPW1* sono stati proposti (Lambert et al., 2013). Tali geni codificano per proteine coinvolte nel sistema immunitario e nelle risposte infiammatorie, nel metabolismo del colesterolo e dei lipidi e nel riciclo delle vescicole endoplasmatiche (Guerreiro e Hardy, 2014).

Tuttavia questi polimorfismi sono frequenti nella popolazione e contribuiscono solo in minima parte al rischio di contrarre la MA (Karch and Goate, 2015).

Mediante l'uso delle nuove tecnologie di sequenziamento genomico sono state identificate rare mutazioni che conferirebbero un maggior rischio di sviluppare la MA, in particolare varianti nei geni *PLD3* e *TREM2* (Guerreiro et al., 2013a; Cruchaga et al., 2014). *TREM2* codifica per un recettore transmembrana espresso dalle cellule mieloidi, inclusa la microglia, i monociti derivati da cellule dendritiche e i macrofagi derivati dal midollo osseo (Colonna, 2003). Sono state trovate diverse varianti del gene, ma solo alcune sono effettivamente collegate ad un aumento del rischio di LOAD, come ad esempio la variante *TREM2* R47H che incrementa di 3,4 volte il rischio (Guerreiro et al., 2013b). *PLD3* è un membro della famiglia delle fosfolipasi (PLD) la cui attività catalitica non è stata ancora del tutto confermata. In generale i membri della famiglia delle PLD catalizzano la reazione di idrolisi della fosfatidilcolina per generare l'acido fosfatidico. In particolare, *PLD3* sembra essere altamente espressa nei neuroni dell'ippocampo e della corteccia entorinale e frontale (Karch et al., 2015). Studi *in vitro* hanno dimostrato che una sovraespressione di *PLD3* è associata ad una diminuzione della produzione del peptide  $A\beta$ , mentre topi knock-out per *Pld3* mostrano un incremento dei livelli di  $A\beta$  (Cruchaga et al., 2014). E' stata

inoltre individuata una variante in PLD3 (V232M) che aumenta il rischio di sviluppare la MA da 2 a 3 volte (Cruchaga et al., 2014).

In figura 4 sono riportati i principali geni coinvolti nella MA.



**Figura 4.** Geni maggiormente implicati nella MA. Il colore dei pallini indica in quale pathway cellulare è implicato il gene, in riferimento alla legenda mostrata in alto a destra. I geni coinvolti nel metabolismo dell'APP sono cerchiati in rosso, mentre quelli coinvolti nel pathway di tau in giallo. Tratta da Scheltens et al., 2016.

## 1.5. Fattori ambientali coinvolti nella MA

La maggioranza dei casi di MA è il risultato dell'interazione tra fattori ambientali e fattori genetici di suscettibilità, non sufficienti da soli a determinare la comparsa della malattia. I fattori ambientali correlati ad un aumento del rischio di contrarre la MA sono i metalli (ferro, rame, zinco, mercurio e alluminio), pesticidi e solventi, esposizione a campi elettromagnetici, traumi cerebrali, malattie cardiovascolari e diabete, tutti fattori in grado di indurre infiammazione e stress ossidativo. Tra i fattori che sembrano avere un ruolo protettivo si trovano la dieta mediterranea ricca di pesce e acidi grassi omega-3, la restrizione calorica e l'assunzione di antiossidanti (Coppedè, 2012).

Un potenziale fattore di rischio è legato al verificarsi di un grave danno traumatico cerebrale nella storia clinica del paziente, anche se è tuttora una questione controversa. E' stato ipotizzato che il verificarsi di un evento traumatico cerebrale possa agire in sinergia con una predisposizione genetica (presenza dell' allele  $\epsilon 4$  del gene *APOE*) nel determinare la comparsa della malattia. Diversi studi riportano che le fonti più comuni di danno cerebrale derivano dalla partecipazione dei soggetti a sport di forte contatto fisico, quali la boxe, il calcio, il rugby, l' hockey su ghiaccio, le arti marziali e l' equitazione (Rabadi e Jordan, 2001; McCrory et al., 2007).

I metalli sono stati ampiamente studiati come potenziali fattori di rischio della LOAD e anche se non è stato dimostrato un rapporto causativo diretto con l'eziopatogenesi della malattia, evidenze epidemiologiche suggeriscono che metalli come alluminio, ferro, mercurio, zinco e rame, nel cervello possano essere collegati allo sviluppo e alla progressione della patologia (Migliore e Coppedè, 2009). L'alluminio può essere un fattore neurotossico della MA in quanto è in grado di inibire l'attività degli enzimi di riparazione del DNA, incrementando la produzione di ROS e diminuendo l'attività di enzimi antiossidanti (Bharathi et al., 2008). Studi *in vivo* hanno riportato che il peptide  $\beta A$  è ricco in zinco, rame e ferro (Bush et al., 1994; Stoltenberg et al., 2007), suggerendo che questi ioni potrebbero agire da fattori di sedimentazione del peptide nelle placche.

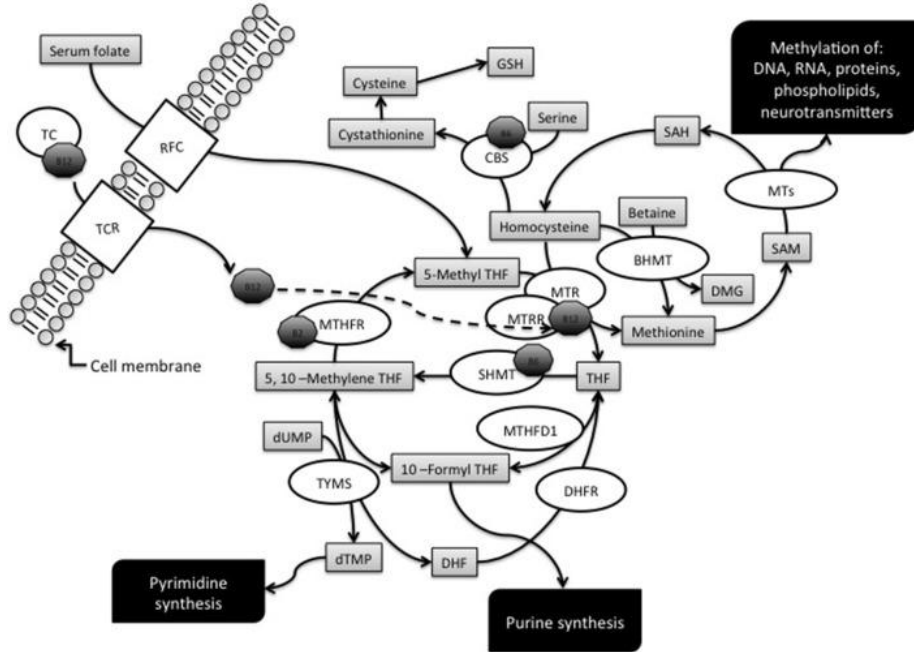
Ulteriori fattori di rischio di insorgenza della MA sono il consumo di alcool e il tabagismo. E' stata valutata l' associazione tra la malattia, il consumo di alcool e il tabagismo, considerando il genotipo del paziente per l' allele  $\epsilon 4$ , e correlando queste analisi con la precocità di esordio della malattia. Dallo studio è emerso che, in presenza della variante allelica  $\epsilon 4$ , in soggetti con un passato da fumatori e/o da consumatori di alcool, l'esordio della malattia è anticipato di 2-3 anni. Inoltre, nei pazienti soggetti a tutti e tre i fattori di rischio (allele *APOE4*, consumo di alcool e fumo), l' esordio è anticipato di 10 anni rispetto a pazienti che non sono soggetti ad alcuno dei tre fattori analizzati (Harwood et al., 2009).

La MA è stata anche associata al livello di scolarizzazione e alle capacità linguistiche dei soggetti (Sando et al., 2008; Stern, 2012). Secondo alcune ricerche chi ha studiato per molti anni crea una "riserva cognitiva" che va a compensare i cambiamenti responsabili della comparsa dei sintomi della malattia poiché le connessioni neuronali sono molto più efficienti (Stern, 2012). Anche le relazioni sociali sembrano poter avere degli effetti sull'esordio della malattia; è stato osservato che persone di mezza età che non convivono con un partner hanno un maggior rischio di andare incontro a un decadimento cognitivo tra

i 65 e i 79 anni (Håkansson et al., 2009); il meccanismo col quale questo si potrebbe verificare non è ancora chiaro, sebbene si ipotizza che sia lo stress fisiologico ad incentivarlo.

Le abitudini alimentari e lo stile di vita sembrano giocare un ruolo molto importante nel rischio di sviluppare la MA. Un gran numero di alimenti, come acidi grassi saturi, eccessiva assunzione calorica e abuso di alcool sono associati con un aumentato rischio di sviluppare la MA. Per contro antiossidanti, pesce, proteine ricche in metionina, e vitamine sono state identificate come fattori protettivi verso la malattia (Santibanez et al., 2007). Inoltre anche il diabete e l'iperinsulinemia sono considerati importanti fattori di rischio della MA (Strachan, 2003). Alcuni studi hanno dimostrato come l'iperlipidemia e alterazioni nel metabolismo del colesterolo rivestano un ruolo cruciale nella patogenesi della MA (Dufouil et al., 2005; Vaya and Schipper, 2007). I dati sul possibile ruolo della dieta nelle malattie cognitive correlate con l'età, sono principalmente relativi alle carenze, descritte frequentemente in età avanzata e significativamente associate al declino cognitivo (Solfrizzi et al., 2011). In particolare i folati sembrano avere un ruolo importante nel prevenire la neurodegenerazione (Xu et al., 2015). I folati vengono unicamente introdotti con la dieta, in quanto il nostro organismo non è in grado di sintetizzarli (Bailey e Gregory, 1999). Dopo l'assorbimento intestinale, attraverso una serie di reazioni di riduzione e metilazione all'interno del fegato viene formato il 5-metil-tetraidrofolato (5-MTHF), il composto maggiormente attivo, che verrà rilasciato nel sangue e assorbito dalle cellule (Figura 5). Il 5-MTHF, giunto all'interno della cellula, libera un gruppo metile per la sintesi della metionina a partire dall'omocisteina (Hcy) trasformandosi in THF. Questo composto è substrato della serina idrossimetiltrasferasi (SHMT) che catalizza l'interconversione della serina in glicina, con conseguente formazione di 5,10-metilentetraidrofolato. Una parte del 5,10-metilentetraidrofolato prodotto in questa reazione va incontro ad una riduzione enzimatica irreversibile catalizzata dall'enzima metilentetraidrofoloreduktasi (MTHFR), che lo trasforma in 5-metil-THF. La sintesi della metionina è catalizzata dall'enzima metionina sintasi (MTR), enzima che necessita della vitamina B12 come cofattore e dell'enzima metionina sintasi reductasi (MTRR) per il mantenimento dello stato attivo; durante la reazione il gruppo metilico viene trasferito dal 5-metil-THF al coenzima e quindi all' Hcy per formare metionina. La metionina, oltre a partecipare alla sintesi proteica, svolge un importante ruolo come donatore di gruppi metilici: infatti è il precursore della S-adenosil-metionina (SAM), utilizzata principalmente nelle reazioni di trans-metilazione, mediante le quali questo composto viene convertito in

S-adenosil-omocisteina, dopo il trasferimento del suo gruppo metile a diverse molecole biologiche, tra cui il DNA (Coppedè, 2010).



**Figura 5.** In figura sono mostrati gli enzimi, i metaboliti e i cofattori coinvolti nel ciclo dei folati (Coppedè, 2015).

E' stata largamente studiata la correlazione tra i livelli di folati, Hcy e vitamina B12 e il rischio di insorgenza della MA. La maggior parte di questi studi hanno mostrato che in pazienti con MA si hanno livelli ematici di Hcy più alti (iperomocisteinemia, HHcy) e livelli di folati e vitamina B12 ridotti rispetto a controlli sani di pari età (Coppede, 2010). Già dagli anni 90' è stato osservato che nei pazienti con MA si hanno più alti livelli di Hcy (Regland et al., 1990) e questo è stato associato ad un rischio doppio di sviluppare la patologia rispetto ai soggetti che non presentavano HHcy (Seshadri et al., 2002). Si sono quindi susseguiti studi su animali modello di MA per trovare una relazione tra HHcy e rischio di MA (Van Dam e Van Gool, 2009). Grazie a tali studi sono stati ipotizzati diversi meccanismi che potenzialmente potrebbero rappresentare la relazione tra MA e HHcy, come lo stress ossidativo (Ho et al., 2001; Streck et al., 2003) e l'aumento della produzione del peptide Aβ e della P-Tau. (Pacheco-Quinto et al., 2006; Sontag et al., 2007). Ad esempio nel caso dello stress ossidativo è noto che la stessa Hcy può subire un'auto-ossidazione portando alla formazione di perossido di idrogeno e altre specie reattive dell'ossigeno (Perna et al., 2003). E' stato inoltre evidenziato che una condizione di HHcy potrebbe influenzare il metabolismo del peptide Aβ e della proteina tau. Infatti esperimenti

su tessuto cerebrale di ratto hanno mostrato che l' HHcy porta ad un incremento non solo dei livelli del peptide A $\beta$  ma anche ad un aumento della fosforilazione della proteina tau (Luo et al., 2007; Zhang et al., 2009). A tal proposito, l'associazione tra HHcy e la MA è stata osservata in diversi studi a carattere epidemiologico. Ad esempio Seshardi e collaboratori hanno evidenziato come in adulti con ottima funzionalità della sfera cognitiva, elevati livelli di Hcy protratti nel tempo possano favorire l'insorgenza di patologie a carattere demenziale inclusa la MA (Seshardi et al., 2002).

Inoltre diversi enzimi e cofattori regolano le vie metaboliche dell' Hcy e nel momento in cui si ha un deficit di questi, l' Hcy intracellulare in eccesso viene esportata in circolo, dove una parte viene eliminata, principalmente dal rene, e il resto si lega alle proteine plasmatiche. La MTHFR ha un ruolo chiave nel metabolismo dei folati dei mammiferi.

La riduzione dell'attività della MTHFR è stata associata a decremento dei livelli dei folati e incremento dei livelli di Hcy, nonché a riduzione del potenziale di metilazione della cellula stessa (Goyette et al., 1996). Sono noti due polimorfismi all'interno del gene *MTHFR* che determinano una significativa riduzione dell'attività enzimatica; il primo ad essere stato scoperto è una sostituzione di una C a T in posizione 677, che determina una riduzione dell'attività di MTHFR di circa il 70% in omozigosi (Frosst et al., 1995). Il secondo polimorfismo è la sostituzione di una A con C in posizione 1298; anche questo porta ad una diminuzione dell'attività dell'enzima, anche se in maniera minore (van der Put et al., 1998). Entrambi i polimorfismi risultano associati a diverse manifestazioni cliniche: difetti nello sviluppo del tubo neurale, infertilità maschile, malattie cardiovascolari e cancro (Botto et al., 2000 ; McNulty et al., 2012). Diversi gruppi hanno studiato il ruolo di questi due polimorfismi nella malattia di Alzheimer con risultati contrastanti (Wu et al., 2014). Tuttavia, da una recente metanalisi il polimorfismo *MTHFR* C677T è risultato associato ad un aumento del rischio di sviluppare la LOAD (Peng et al, 2015). Tuttavia, l'attività di MTHFR non è influenzata solo da queste varianti nel DNA. Infatti anche la metilazione del gene è in grado di regolarne l'espressione (Vaissiere et al, 2009). Alterazioni nella metilazione di questo gene sono state osservate in vari tipi di tessuti tumorali (Vaissiere et al, 2009; Botezatu et al, 2013), in condizioni di infertilità maschile (Rotondo et al, 2012; Wu et al., 2010; Botezatu et al, 2014), in patologie renali (Ghattas et al, 2014) ed in bambini con difetti del tubo neurale (Stolk et al., 2013).

Nonostante sia chiaro che i fattori di rischio menzionati giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della MA, il primo e più forte fattore di rischio per la forma sporadica della MA è l'età. Con l'avanzamento dell'età si va incontro ad una fisiologica perdita neuronale,

la quale è strettamente associata a demenza e a malattie neurodegenerative. Lo stress ossidativo e l'esposizione cronica ai radicali liberi sembrano poter spiegare i cambiamenti fisiologici che si osservano durante il normale invecchiamento e si ipotizza che essi giochino un ruolo di primo piano anche nello sviluppo di patologie neurodegenerative. Tessuti diversi presentano differente suscettibilità allo stress ossidativo ed è ormai noto da tempo che il sistema nervoso centrale è particolarmente vulnerabile al danno da radicali liberi per diverse ragioni che includono una limitata efficacia del sistema antiossidante e un elevato consumo di ossigeno per produrre energia.

Un evento di stress ossidativo si produce all'interno della cellula quando c'è uno squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la capacità del sistema antiossidante di neutralizzarli. Le possibili fonti di formazione di tali specie reattive sono l'esposizione a radiazioni ionizzanti, farmaci, batteri, ma anche fonti intracellulari. Le specie chimiche di maggiore interesse biologico sono quelle che si formano spontaneamente per reazione diretta dell'ossigeno molecolare a formare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) con cationi non chelati, quali il ferro o il rame, presenti nel circolo sanguigno, nell'interstizio cellulare o nei fluidi intracellulari. Le ROS vengono prodotte maggiormente nei mitocondri, nel citosol e nel reticolo endoplasmatico e i loro bersagli principali sono le proteine cellulari a livello delle quali determinano la generazione di amminoacidi modificati, gli acidi nucleici che, soprattutto nei mitocondri, formano basi azotate alterate, e i lipidi. Marcatori dello stress ossidativo sono stati trovati sia nei cervelli che nei tessuti periferici di pazienti con MA. Inoltre l'attività di enzimi antiossidanti è stata trovata ridotta in pazienti con MA rispetto ai controlli sani; in particolare nel DNA mitocondriale la concentrazione di 8-idrossi-2-deossiguanosina (8-OH-dG) nei pazienti con MA è circa tre volte superiore rispetto ai controlli mentre nel DNA nucleare è stato rilevato un lieve ma significativo aumento della concentrazione di tale marcatore (Mecocci et al., 1994). Le possibili fonti di stress ossidativo nei malati di Alzheimer sono molteplici; a tal proposito negli ultimi anni sono stati proposti vari meccanismi di produzione di radicali liberi e alcuni di questi sono supportati da numerose evidenze sperimentali. Una delle ipotesi maggiormente studiate è quella che attribuisce alla proteina  $\beta$ -amiloide un ruolo preminente nella produzione di radicali liberi e nella cascata di eventi che seguono, responsabili del processo neurodegenerativo nella MA (Smith et al., 2000). Inoltre investigazioni su soggetti MCI insieme con studi eseguiti su modelli animali e colture cellulari, hanno evidenziato che lo stress ossidativo è uno degli eventi più precoci nella MA, precedente alla formazione delle placche amiloidi e ai primi sintomi di demenza. È stato proposto che il peptide  $A\beta$  venga



dapprima prodotto come sostanza antiossidante, ed evolve in sostanza pro-ossidante solo dopo l' aggregazione e la deposizione nelle placche senili (Moreira et al., 2007). Appurato che il danno ossidativo può essere considerato un fattore coinvolto nell'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer è ragionevole ritenere che gli antiossidanti possano eventualmente avere un ruolo nella prevenzione o nel miglioramento della malattia. I pazienti con MA mostrano livelli plasmatici di vitamine antiossidanti (vitamina A, C, E e carotenoidi) significativamente più bassi rispetto ai soggetti sani e la spiegazione più verosimile è legata al fatto che la sovrapproduzione di ROS in seguito allo sviluppo della malattia richieda un maggior consumo di antiossidanti (Mecocci et al., 2002).

## **1.6. Compromissione dei meccanismi di riparazione al DNA nella MA**

### **1.6.1. Meccanismi di riparazione al DNA**

Dal momento che il DNA è il depositario dell'informazione genetica, al fine di garantire la corretta espressione di tale informazione e la sua esatta trasmissione alle generazioni cellulari successive, è necessario che la sua sequenza sia mantenuta inalterata. Le lesioni al DNA insorgono sia spontaneamente (danni endogeni), che in seguito all'esposizione a sostanze presenti nell'ambiente (danni esogeni). Fattori endogeni sono ad esempio l'intrinseca instabilità del DNA, la sua interazione con le molecole presenti nella cellula, ossia acqua, ossigeno e prodotti del metabolismo cellulare, e l'errato funzionamento di processi molecolari del DNA quali replicazione, ricombinazione e riparazione. Tra i fattori esogeni che possono provocare lesioni al DNA si trovano radiazioni ionizzanti e non-ionizzanti, e agenti chimici come metalli pesanti pesticidi e inquinanti atmosferici (Coppedè e Migliore, 2010a). È stato stimato che ogni giorno ogni singola cellula del corpo umano è soggetta ad una media di circa un milione di lesioni al DNA, inclusa la formazione di siti abasici e di addotti al DNA, rotture a singolo filamento del DNA (SSB), rotture a doppio filamento del DNA (DSB), delezioni/inserzioni, formazione di legami crociati tra DNA e proteine. Se non riparate correttamente le lesioni al DNA possono guidare la mutazione delle cellule, interferire con la normale espressione genica o indurre la sintesi di proteine anomale (Kulkarni e Wilson, 2008). Per tale motivo le cellule possiedono differenti sistemi ed enzimi di riparazione che sono in grado di contrastare il danno che avviene quotidianamente al DNA. I principali meccanismi di riparazione delle

cellule umane sono: la riparazione per escissione di basi (Base Excision Repair, o BER), la riparazione per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair, o NER), la riparazione degli appaiamenti errati delle basi (Mismatch Repair o MMR) che riparano i danni al DNA a singolo filamento, e la riparazione per ricombinazione non omologa (Non-Homologous End-Joining o NHEJ) e la riparazione per ricombinazione omologa (Homologous Recombination o HR) per riparare i danni al DNA a doppio filamento. Il BER è il processo deputato alla rimozione delle basi del DNA modificate in seguito ad eventi di deamminazione idrolitica, ossidazione e alchilazione; interviene inoltre nella riparazione dei siti apurinici/apirimidinici (siti AP) ed opera a livello delle rotture causate dall'esposizione ai raggi X. Il NER è deputato alla rimozione di un'ampia gamma di danni che determinano una distorsione della molecola di DNA; i substrati biologicamente più rilevanti del NER sono i dimeri di pirimidina (CPD) e i (6-4)fotoprodotti, ossia le lesioni indotte dai raggi UV, e gli addotti ingombranti. Il MMR interviene nella rimozione di appaiamenti errati delle basi che sono sfuggiti alla correzione da parte dell'attività esonucleasica 3'→5' delle DNA polimerasi replicative. Sono inoltre substrati del MMR le anse extra-elica che si formano in regioni ricche di nucleotidi ripetuti. I sistemi HR e NHEJ competono l'un l'altro nella riparazione della rottura a doppia elica indotta da radiazioni ionizzanti, radicali liberi e mutageni chimici quali agenti ossidanti, o che si origina in seguito alla replicazione di una molecola di DNA contenente una rottura a singola elica (Bignami e Stefanini, 2004).

### **1.6.2. Danno al DNA e meccanismi di riparazione nella MA**

Il danno al DNA è fisiologicamente bilanciato con i meccanismi di riparazione, e quando è talmente esteso da non permettere una completa riparazione viene indotta l'apoptosi, la senescenza cellulare o la mutazione genica. Questo sbilanciamento avviene molto più frequentemente nelle cellule vecchie rispetto a quelle nuove e risulta particolarmente deleterio in cellule post-mitotiche, come i neuroni, i quali non si rinnovano con il ciclo cellulare (Rasmussen et al., 2013; Campisi, 2013). I neuroni sono un complesso mosaico di cellule aneuploidi ed euploidi; tale mosaicismo determina una enorme diversità cellulare, con il potenziale di indurre malattie del SNC (Kingsbury et al., 2006). È stato ad esempio osservato mosaicismo con aneuploidia del cromosoma 21 in individui con MA e con demenza (Iourov et al., 2009; Ringman et al., 2008). Questo mosaicismo potrebbe essere indotto sia da una malsegregazione cromosomica durante lo sviluppo del SNC, sia dalla

neurogenesi ad opera delle cellule staminali neuronali le quali vanno più facilmente incontro ad errori replicativi (Yurov et al., 2014; Taupin, 2011; Yurov et al., 2011). È interessante notare che la neurogenesi è aumentata nei cervelli di pazienti con MA, verosimilmente nel tentativo di compensare la forte perdita di neuroni che caratterizza questi individui (Jin et al., 2004; Krantic et al 2005; Taupin, 2011).

Come già detto l'invecchiamento è il principale fattore di rischio per la MA, e l'età è associata ad un accumulo di stress ossidativo nelle cellule. Per questo motivo è stato proposto che alti livelli di acidi nucleici ossidati nelle cellule cerebrali possano portare alla disfunzione neuronale dei pazienti con MA (Lovell et al., 2007; Sayre et al., 2008; Candore et al., 2010) e l'evidenza di un legame tra danno ossidativo e neurodegenerazione è ormai certa (Hegde et al., 2012; Iyama et al., 2013; Maynard et al., 2013). Numerose ricerche hanno messo in evidenza che un diffuso danno ossidativo alle macromolecole cellulari, ed in particolare il danno ossidativo al DNA, è uno degli eventi più precoci riscontrabili nella patogenesi della MA, presente anche nello stadio MCI (Wang et al., 2014a). Il danno ossidativo a livello del DNA può portare alla generazione di più di 20 addotti alle basi, il più frequente dei quali è l' 8-idrossiguanina (8-OHG). Nel 1994 Mecocci e collaboratori hanno misurato i livelli di 8-OHG in DNA isolato da tre regioni della corteccia cerebrale e del cervelletto di 13 pazienti con MA e di 13 controlli, osservando un aumento di 3 volte dei livelli di 8-OHG nel DNA mitocondriale (mtDNA) della corteccia parietale dei pazienti con MA rispetto ai controlli, così come un lieve ma comunque significativo aumento del danno ossidativo al DNA nucleare (nDNA) (Mecocci et al., 1994). Questi dati hanno mostrato per la prima volta che c'è un aumento del danno ossidativo al DNA in pazienti con MA. Studi seguenti hanno confermato questi risultati. Infatti incrementati livelli di 8-OHG, 8-idrossiadenina, 5-idrossicitosine e 5-idrossiuracile sono stati osservati in numerosi studi condotti su tessuto cerebrale post-mortem di pazienti con MA (Lyras et al., 1997; Gabbitta et al, 1998). E' stato poi confermato che il mtDNA ha più alti livelli di basi ossidate rispetto al nDNA, che la guanina è la base più vulnerabile al danno ossidativo e che le basi ossidate sono più numerose nei lobi frontale, temporale, parietale e temporale dei cervelli post-mortem di pazienti MA rispetto ai controlli (Wang et al., 2005). Nel 2006 il danno ossidativo al DNA è stato osservato per la prima volta in pazienti MCI (Wang et al., 2006). Più recentemente aumentati livelli di 8-OHG sono stati osservati in sezioni di ippocampo/paraippocampo di pazienti con uno stadio pre-clinico della MA (PCAD, da preclinical stage of AD), una condizione nella quale i soggetti non manifestano clinicamente i segni della malattia, ma che mostrano i segni della malattia all'esame

autoptico (Lovell et al., 2011). Inoltre, i livelli di alcune basi ossidate sono stati quantificati nel nDNA e nel mtDNA di diverse regioni cerebrali di pazienti con MCI, PCAD, MA e pazienti con disordini neurologici non associati alla MA (demenza frontotemporale e demenza con corpi di Lewy), e sono risultati significativamente più elevati negli MCI, PCAD e MA e nei pazienti con demenza non associata a MA rispetto ai soggetti neurologicamente sani (Bradley-Whitman et al., 2014).

Il danno ossidativo al DNA è stato anche osservato nei fluidi biologici e tessuti periferici di pazienti con MA. Ad esempio aumentati livelli di 8-OHG sono stati osservati nei linfociti del sangue periferico e CSF di pazienti con MA (Mecocci et al., 1998; Mecocci et al., 2002; Lovell et al., 1999). Marcatori di danno ossidativo al DNA sono anche stati osservati nel CSF, urine e leucociti di pazienti con una forma di demenza mista MA/vascolare (Gackowski et al., 2008). Aumentati livelli di danno ossidativo al DNA sono stati osservati in linfociti di pazienti MA mediante la versione modificata del test della cometa che consente di rilevare le purine e le pirimidine ossidate (Mórocz et al., 2002; Kadioglu et al., 2004; Migliore et al., 2005), ed è stato osservato che questo avviene precocemente nella patogenesi della MA in quanto questi marker erano rilevabili anche nei leucociti di pazienti MCI (Migliore et al., 2005).

In parallelo alle osservazioni di un aumentato danno ossidativo al DNA nel cervello e nei tessuti periferici di pazienti con MA, molti ricercatori si sono chiesti se questo aumento poteva essere dovuto ad un' alterata attività dei sistemi di riparazione al DNA. In particolare la maggior parte degli studi si sono focalizzati sul meccanismo BER in quanto è il principale meccanismo intracellulare che consente la rimozione delle basi ossidate dal DNA. In particolar modo la ricerca si è focalizzata sull'attività dell' enzima OGG1 (da 8-oxoguanine DNA glycosylase) che rimuove le 8-OHG dal DNA e sull'attività della DNA polimerasi beta (Pol $\beta$ ) (Iida et al., 2002; Coppedè et al., 2007a; Weissman et al., 2007). Il primo step del BER coinvolge l'escissione della base danneggiata mediante una DNA glicosidasi (ad esempio quando la proteina OGG1 rimuove l' 8-OHG da un sito 8-OHG:C), generando un sito abasico (AP). Nello step successivo l'AP-endonucleasi-1 (APE1) taglia idroliticamente il sito AP, la Pol $\beta$  sintetizza la nuova sequenza di DNA e la DNA ligasi rilega il taglio (Seeberg et al., 1995). La Poli ADP-ribosio polimerasi-1 (PARP-1) svolge un ruolo importante in molte reazioni di riparazione al DNA, incluso il BER (Rouleau et al., 2010; Haince et al., 2008; Mortusewicz et al., 2007). Infatti la PARP-1 è una proteina a dito di zinco legante il DNA che viene attivata da rotture al DNA. La funzione primaria della PARP-1 è coinvolta nei processi di riparazione al DNA attraverso il rilevamento del

danno al DNA. Quando la PARP-1 individua danni al DNA inizia la sintesi di catene di poli ADP-ribosio (PAR) che fungono da segnale per altri enzimi di riparazione del DNA. Ad esempio a livello istonico inducono rilassamento locale della cromatina così facilitando l'ingresso di proteine di riparazione al DNA danneggiato. Comunque l'attivazione di PARP-1 può anche portare alla morte cellulare. Infatti le cellule con danno al DNA eccessivamente esteso hanno un'attivazione di PARP-1 molto diffusa con conseguente consumo del suo substrato, ovvero il NAD<sup>+</sup>, e quindi di ATP, portando così ad un deficit energetico tale da indurre morte cellulare (Kauppinen et al., 2007). È stato proposto che la PARP-1 media la morte neuronale nei pazienti affetti da MA (Wang et al., 2004). Inoltre è stata osservata estesa formazione di SSB e DSB in cervelli di pazienti con MA, così come aumentati livelli di PARP-1 (Lassmann et al., 1995; Adamec et al., 1999; Love et al., 1999). Già dagli anni '80 del secolo scorso sono stati eseguiti studi che hanno mostrato che fibroblasti, linfoblasti e linfociti di pazienti con MA erano caratterizzati da deficit dei meccanismi di riparazione al DNA in seguito all'esposizione a numerosi agenti alchilanti (Li et al., 1985; Robison et al., 1987; Bradley et al., 1989). Studi pubblicati più recentemente hanno dimostrato una diminuita attività di numerose proteine coinvolte nella riparazione del DNA sia nei cervelli di pazienti con MA che con MCI. Ad esempio è stata osservata diminuita attività della proteina MTH1, coinvolta nell'idrolisi delle basi ossidate (Furuta et al., 2001), del complesso Mre11, coinvolto nel riconoscimento del danno, nella sua riparazione e nell'inizio del ciclo cellulare (Jacobsen et al., 2004) e del complesso NHEJ (Shackelford et al., 2006) in cervelli di pazienti con MA rispetto ai cervelli di pazienti neurologicamente sani.

Nel 1998 Tan e colleghi hanno osservato mediante tecniche di immunostochimica che i livelli di APE1 erano bassi in tessuti di controllo ma alti nelle placche amiloidi presenti nell'ippocampo di pazienti con MA (Tan et al., 1998). In seguito un altro gruppo di ricercatori ha mostrato che aumenti significativi di APE1 si osservavano anche nella corteccia di pazienti con MA (Davydov et al., 2003). In seguito all'osservazione che nel CSF di pazienti con MA si ha un aumento dei livelli di stress ossidativo ed una diminuzione della capacità ripartiva (Lovell et al., 1999), Lovell e collaboratori hanno suggerito che il cervello nella MA potrebbe essere soggetto ad un doppio insulto per incremento del danno ossidativo e per diminuita capacità ripartiva. Hanno quindi analizzato l'attività di OGG1 in campioni cerebrali di pazienti con MA trovando decrementi a livello ippocampale, nelle circonvoluzioni mediale e superiore e nel lobo parietale inferiore, rispetto a campioni di cervelletto e di individui sani (Lovell et al.,

2000). Nel giro orbito frontale e nella corteccia entorinale sono stati osservati diminuiti livelli della isoforma mitocondriale di OGG1 (Iida et al., 2002). Deficienze del sistema BER sono state più recentemente osservate in campioni cerebrali di 10 affetti da MA e 9 affetti da MCI rispetto a 10 controlli; in particolare gli autori hanno osservato diminuita attività della uracil DNA glicosidasi (UDG), di OGG1 e della Pol $\beta$ , mentre i livelli di APE1 erano simili tra i due gruppi (Weissman et al., 2007).

Recentemente è stato osservato che i livelli di BRCA1, coinvolto nella riparazione del DNA che subisce danni del tipo DSB, erano ridotti nel cervello di pazienti MA e in topi transgenici per l'APP (Suberbielle et al., 2015). Inoltre gli autori hanno osservato che in seguito all'esposizione di cellule neuronali in coltura agli oligomeri di  $\beta$ -amiloide, si induceva riduzione dei livelli di BRCA1. Lillenes e collaboratori hanno misurato l'espressione genica di alcune componenti del BER come *APE1*, *OGG1*, *PARP-1* e *Pol $\beta$*  nel sangue e in tessuti cerebrali post-mortem di pazienti con MA, con MCI e in controlli sani, osservando che l'espressione era maggiore nel tessuto cerebrale che nei campioni di sangue, che l'espressione di *Pol $\beta$*  era maggiore nel cervelletto di pazienti con MA, che i livelli di OGG1 nel sangue erano bassi mentre quelli di PARP-1 erano più elevati nei pazienti con MA e MCI (Lillenes et al., 2016). Sykora e collaboratori hanno indotto eterozigotità per il gene codificante la Pol $\beta$  in topi modello della MA, osservando che una diminuzione di questa proteina determinava una più grave neurodegenerazione aggravando anche gli effetti caratteristici della MA, come la perdita della memoria (Sykora et al., 2015), evidenziando così che anche una modesta diminuzione dell'attività di questo enzima può rendere più vulnerabile il cervello alle alterazioni molecolari e cellulari tipiche della MA.

Nel 2004 Swerdlow e Khan hanno proposto "l'ipotesi della cascata mitocondriale" alla base della MA, suggerendo che l'assetto genetico che codifica per le proteine che compongono la catena respiratoria mitocondriale dell'individuo, determina la produzione di ROS che a sua volta determina il tasso al quale viene accumulato il danno mitocondriale. L'accumulo di mtDNA danneggiato causa di conseguenza deficit energetico, incremento dello stress ossidativo e formazione del peptide  $\beta$ -amiloide, determinando così neurodegenerazione (Swerdlow e Khan, 2004). Nonostante le evidenze che nella MA vi è una disfunzione mitocondriale, nessuna mutazione causativa è stata trovata nel mtDNA, e risultati di studi atti a valutare il ruolo di polimorfismi di geni o aplogruppi del mtDNA come fattori di rischio per la MA sono contrastanti (Mancuso et al., 2007; Mancuso et al., 2010).

Altre ipotesi suggeriscono che lo stress ossidativo possa indurre modificazioni post-traduzionali o degradare le proteine di riparazione (Coppedè e Migliore, 2010b). Studi più recenti si sono focalizzati sull'attività BER mitocondriale in soggetti MCI e MA (Santos et al., 2013). Anche in questo caso l'accumulo di lesioni ossidative avviene in concomitanza con deficit dei meccanismi BER, ed uno studio più recente condotto nei lisati mitocondriali di pazienti MA, ha evidenziato che le incisioni di 5-idrossiuracile e le attività della ligasi sono basse nei cervelli di questi pazienti, mentre le incisioni di uracile, i siti di taglio abasici e l'incorporazione di deossiribonucleotide trifosfato sono normali (Canugovi et al., 2014).

In un lavoro pubblicato quest'anno è stato osservato che i livelli endogeni di danno ossidativo al DNA erano più alti nel sangue periferico di pazienti con MA rispetto ai controlli neurologicamente sani, e che varianti geniche di *XRCCI*, che codifica per una proteina del BER, e di *OGGI* erano associate ad un aumentato danno al DNA nei pazienti con MA (Kwiatkowski et al., 2016).

## 1.7. Epigenetica e MA

L'epigenetica è lo studio delle modificazioni ereditabili del DNA e della cromatina che influenzano il genoma e l'espressione genica senza che venga alterata la sequenza del DNA stesso. Negli ultimi anni un sempre maggior numero di studi ha mostrato che l'epigenetica potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nel mediare gli effetti di fattori ambientali sullo sviluppo di varie patologie, come il cancro e le malattie neurodegenerative (Urduingio et al., 2009). Le modificazioni epigenetiche meglio studiate sono la metilazione del DNA, i cambiamenti nella struttura della cromatina mediante modificazioni istoniche e l'attività degli RNA non codificanti. I meccanismi epigenetici rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel differenziamento del sistema nervoso centrale e risultano essenziali per stabilire i processi di memoria e apprendimento (Fischer, 2014). Quindi, tali meccanismi potrebbero rivestire un ruolo importante in patologie che presentano indebolimento della memoria e declino cognitivo, come avviene nella MA.

Il meccanismo epigenetico maggiormente studiato è la metilazione del DNA. La metilazione del DNA consiste nel legame covalente di un gruppo metilico (CH<sub>3</sub>) sul carbonio in posizione 5 dell'anello pirimidinico di una citosina (C) con formazione di 5-metilcitosina (5-mC). Nelle cellule dei mammiferi la metilazione del DNA avviene

principalmente nelle citosine (C) che precedono le guanine (G), le cosiddette unità CpG. Le unità CpG si possono ritrovare altamente addensate in particolari regioni del genoma, come i promotori genici, a formare le isole CpG, corte regioni genomiche (circa 500 pb) che si trovano in circa il 75% dei geni umani (Bird et al., 1986). Una piccola porzione di isole CpG diviene metilata durante i normali processi fisiologici, come ad esempio nell'imprinting genomico e nel meccanismo di inattivazione del cromosoma X, e quando questo accade il gene associato alla sequenza metilata è reso silente e perciò la metilazione del DNA viene solitamente considerata come un marcatore di repressione genica a lungo termine (Goll et al., 2005). Al contrario, molte unità CpG al di fuori delle isole CpG sono metilate, specialmente quelle che si trovano negli elementi di DNA ripetuto (come le LINE1 o le SINE) che costituiscono circa il 45% del genoma (Yoder et al., 1997); qui la metilazione svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità del genoma, impedendo le traslocazioni (Eden et al., 2003; Rodriguez et al., 2006). I pattern di metilazione vengono mantenuti durante la divisione cellulare dalle DNA-metiltransferasi (DNMT). Le DNMT sono enzimi presenti principalmente negli eucarioti e sono raggruppati in una famiglia composta da cinque membri: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L che prelevano i gruppi metilici dalla SAM (Rollins et al., 2006). Studi eseguiti su gemelli monozigoti indicano che un ruolo fondamentale nello sviluppo della MA può essere giocato da fattori ambientali e probabilmente da meccanismi epigenetici (Brickell et al., 2007; Gatz et al., 2005). Uno studio su gemelli monozigoti ha mostrato che l'"epigenoma" si modifica in maniera crescente con l'età (Fraga et al., 2005). Questo può essere spiegato col fatto che le esposizioni ambientali possono modificare l'epigenoma. Nel 2009 Mastroeni e collaboratori hanno trovato che in una coppia di gemelli monozigoti discordanti per la MA il gemello affetto dalla malattia mostrava livelli di metilazione significativamente più bassi a livello della corteccia temporale (Mastroeni et al., 2009). Inoltre il gemello malato, che era un ingegnere chimico, era stato per tanti anni a stretto contatto con pesticidi, e questo potrebbe essere un fattore che ha favorito lo sviluppo della patologia.

Il ruolo dell'epigenetica, e in modo particolare della metilazione del DNA, nella MA è stato ampiamente analizzato in modelli cellulari e animali e anche in tessuti umani sia mediante indagine gene-specifica che a livello globale del genoma.



### 1.7.1. Studi su modelli cellulari e animali di MA

Diversi studi condotti su cellule neuronali in coltura e su modelli animali di MA hanno messo in evidenza l'importanza del ciclo dei folati, ed in particolare del rapporto SAM/SAH nel regolare l'espressione di geni coinvolti nella MA. Fuso e colleghi hanno osservato, sia *in vitro* che in modelli murini, che la carenza di vitamina B provoca una demetilazione di *PSENI*, sovraespressione di *PSENI* e *BACE1* e accumulo di peptide  $\beta$ -amiloide. La somministrazione di SAM può impedire la demetilazione del gene e quindi ripristinare il suo stato di metilazione (Scarpa et al., 2003; Fuso et al., 2008; Fuso et al., 2011; Fuso et al., 2012). Inoltre uno studio condotto su un modello murino transgenico, il TgCRND8 che sovraesprime il gene dell'*APP*, e nel suo correlato *wild type* 129S, ha dimostrato che l'espressione del gene *PSENI* è regolata dal suo pattern di metilazione in risposta a stimoli metabolici; in particolare in topi trattati con una dieta povera di vitamina B si induceva ipometilazione di specifiche unità CpG della regione 5' del gene *PSENI* (Fuso et al., 2008). Risultati simili sono stati ottenuti anche in uno studio di un altro gruppo di ricerca condotto in topi modello della MA (Li et al., 2015a). È stato infatti osservato che la somministrazione di acido folico induceva una diminuzione dell'espressione di *APP*, *PSENI* e della deposizione del peptide  $A\beta$  nell'ippocampo dei topi. Questo effetto inibitorio era associato ad un aumentato potenziale di metilazione e dell'attività delle DNMT così come ad alterata metilazione dei promotori dell' *APP* e di *PSENI* (Li et al., 2015a).

Diversi studi condotti su animali e colture cellulari hanno mostrato come l'esposizione al piombo sia in grado di indurre la MA. È stato osservato che l'esposizione al piombo di ratti durante il loro sviluppo determina una ritardata (20 mesi dopo) sovraespressione dell'*APP* e del peptide  $A\beta$  (Basha et al., 2005). Le stesse osservazioni sono state fatte su scimmie adulte esposte in giovane età al piombo (Wu et al., 2008). Lo stesso gruppo ha osservato che l'esposizione al piombo precocemente durante lo sviluppo era accompagnato da un significativo decremento dei livelli proteici delle DNMT, di MeCP2 e altre proteine coinvolte nelle modificazioni istoniche (Bihaqi et al., 2011). Inoltre l'esposizione di cellule di neuroblastoma al piombo induceva un latente aumento di espressione dei fattori di trascrizione Sp1 e Sp3, insieme ad una riduzione dei livelli di DNMT1, DNMT3a e MeCP2 (Bihaqi e Zawia, 2012). Un altro gruppo ha analizzato il pattern di metilazione del gene *APP* in cellule in coltura esposte al piombo, osservando ipometilazione del promotore e disturbo nell'espressione della DNMT1 (Li et al., 2012).

Molto interessante è un lavoro di Chen e colleghi i quali hanno osservato in colture cellulari endoteliali di cervello che il peptide A $\beta$  stesso può indurre modificazioni epigenetiche (Chen et al., 2009). In particolare l'accumulo del peptide  $\beta$ -amiloide può determinare da un lato una globale ipometilazione genomica e dall'altro ipermetilazione di specifici loci genici, come il promotore del gene per la neprilisina. La neprilisina è una proteina di membrana coinvolta nella degradazione del peptide  $\beta$ -amiloide; una sua sovra espressione riduce significativamente l'accumulo di  $\beta$ -amiloide in topi MA (Marr et al., 2003), mentre è stata riscontrata una sua riduzione in cervelli di pazienti MA (Russo et al., 2005). La regione promotrice del gene che codifica per la NEP è molto ricca di isole CpG che vengono riconosciute come siti di metilazione dalle DNMT; gli effetti epigenetici del peptide  $\beta$ -amiloide non sono ancora chiari ma questo studio suggerisce che il  $\beta$ -amiloide possa essere artefice della sua stessa formazione e accumulo. In un recente lavoro il ruolo del peptide A $\beta$  è stato messo in relazione con la produzione di ROS e l'induzione di modificazioni epigenetiche in topi modello della MA (5XFAD mice) (Griñán-Ferré et al., 2016). In questi topi sono stati osservati alti livelli di espressione dei geni *APP* e *Bace1*, alti livelli dei loro prodotti proteici ed alto numero di placche amiloidi; inoltre è stato osservato che il progredire della malattia era accompagnato da un accumulo di ROS, in particolare i livelli di 4-HNE aumentavano già dopo due mesi di vita. Accanto a queste modificazioni gli autori hanno anche osservato un aumento della metilazione globale in concomitanza con il deposito del peptide A $\beta$  ed un incremento di espressione delle *Dnmt1*, *3a* e *3b*; effetti simili sono stati visti per alcune metiltransferasi e deacetilasi istoniche (Griñán-Ferré et al., 2016).

### **1.7.2. Studi su tessuti umani**

I primi studi condotti sul tessuto cerebrale di pazienti MA risalgono agli anni '90. In uno studio del 1995 è stato osservato che la regione del promotore del gene *APP* era ipometilata in tessuti cerebrali post-mortem di pazienti con MA rispetto a controlli sani e con demenza non-Alzheimer (Pick's disease) (West et al., 1995). A riguardo, Toghi e colleghi hanno osservato che le isole CpG nel promotore dell'*APP* nella corteccia parietale sono frequentemente metilate prima dei 70 anni e significativamente demetilate dopo quest'età, e ciò potrebbe essere associato alla progressiva deposizione del peptide A $\beta$  (Toghi et al., 1999).

Da allora molti studi si sono focalizzati sullo studio della metilazione del DNA in tessuti cerebrali di individui con la MA. Studi di metilazione globale mediante tecniche di immunostochimica hanno rivelato differenti pattern di metilazione in differenti aree cerebrali dei cervelli di pazienti LOAD (Mastroeni et al., 2009; Mastroeni et al., 2010; Chouliaras et al., 2013; Condliffe et al., 2014; Coppieters et al., 2014). Inoltre molti geni differenzialmente metilati a livello cerebrale di pazienti con MA rispetto a controlli neurologicamente sani sono stati individuati (Siegmund et al., 2007; Bakulski et al., 2012; Furuya et al., 2012; Rao et al., 2012; Sanchez-Mut et al., 2013; De Jager et al., 2014; Lunnon et al., 2014; Sanchez-Mut et al., 2014; Yu et al., 2015). Il primo studio genome-wide è stato condotto da Bakulsky e collaboratori (2012). 948 siti CpG sono stati potenzialmente associati con la forma sporadica della MA ed è stata registrata una differenza di metilazione tra pazienti LOAD e controlli sani del 2,9% (Bakulski et al., 2012). In un altro studio sono stati investigati i livelli di metilazione di 415,848 siti CpG, 71 dei quali sono risultati essere associati alla MA, incluse CpG in prossimità dei geni *ANK1*, *BINI* e *RHBDF2*, tutti geni noti per essere differenzialmente espressi nella MA (De Jager et al., 2014).

Data la difficoltà nell'esecuzione di analisi su campioni cerebrali, sono stati ricercati possibili marcatori epigenetici in tessuti periferici come sangue e CSF in grado di monitorare la malattia nei diversi stadi (Carboni et al., 2015; D'Addario et al., 2012; Ferri et al., 2016; Hou et al., 2013; Kaut et al., 2014; Silva et al., 2014; Nagata et al., 2015; Piaceri et al., 2015; Wang et al., 2008). Uno dei primi studi in cui è stato utilizzato il sangue periferico per studiare modificazioni epigenetiche in pazienti con MA risale al 2008 (Wang et al., 2008). In questo studio sono stati investigati vari geni coinvolti nel processamento del peptide  $\beta$ -amiloide e nel metabolismo dei folati sia su tessuto cerebrale che su linfociti di sangue periferico, ed è stata osservata una variabilità inter-individuale nella metilazione dei geni *PSENI*, *APOE*, *DNMT1* e *MTHFR* (Wang et al., 2008). Risultati contrastanti sono stati ottenuti dallo studio dei livelli di metilazione delle sequenze ripetute del DNA, come le LINE1 e le Alu (Bollati et al., 2011; Hernandez et al., 2014; Di Francesco et al., 2015). Più recentemente uno studio di tipo epigenome-wide è stato eseguito sia nel tessuto cerebrale che nel sangue di individui con la MA (Lunnon et al., 2014). Da questo studio sono emersi diversi loci genici, alcuni dei quali posti in prossimità di geni coinvolti nella MA, differentemente metilati nel sangue di pazienti con MA rispetto ai controlli. Comunque questi loci erano diversi rispetto a quelli trovati nel tessuto cerebrale (Lunnon et al., 2014).

In un recente lavoro mediante un approccio epigenome-wide sono stati analizzati i livelli di metilazione del DNA in linfociti CD4+ da sangue prelevato a due tempi diversi, un'analisi al momento del reclutamento dello studio ed una in prossimità della morte del paziente, e in tessuto cerebrale post-mortem di 41 individui anziani, dei quali più della metà è stato diagnosticato come affetto da MA all'esame autoptico (Yu et al., 2016). E' stato osservato che i pattern di metilazione globale erano conservati nei diversi tessuti, ed in particolare la metilazione media a livello cerebrale è risultata essere più bassa rispetto a quelle dei linfociti. Inoltre i livelli di metilazione a livello di singoli siti CpG erano altamente sovrapponibili tra le due analisi sui linfociti CD4+, mentre il 46,8% dei 420,131 siti CpG hanno mostrato una metilazione differente tra i due tessuti. Solo una modesta differenza (del 5% circa) è stata osservata nei livelli di metilazione globale tra i pazienti MA e quelli neurologicamente sani (Yu et al., 2016).

## 2. Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di ricercare possibili marcatori epigenetici periferici in soggetti affetti da malattia di Alzheimer sporadica ad esordio tardivo.

A questo proposito è stato condotto un primo studio (studio 1) in cui sono stati valutati i livelli di metilazione di geni coinvolti nel processamento del peptide  $\beta$ -amiloide (*PSEN1* e *BACE1*), nella metilazione del DNA (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) e nel metabolismo dei folati (*MTHFR*) in DNA estratto da sangue periferico di pazienti MA e individui neurologicamente sani. I risultati sono stati correlati con noti fattori di rischio per la MA, come l'età, il sesso, biomarcatori del ciclo dei folati e presenza del genotipo *APOE  $\epsilon$ 4*. Inoltre in un sottogruppo di questi individui sono state analizzate mediante l'applicazione di reti neurali artificiali le forze di connessione tra le variabili analizzate.

In un secondo studio (studio 2) sono stati valutati i livelli di metilazione di geni che codificano per proteine coinvolte nella riparazione del DNA nel sangue periferico di pazienti con MA e controlli neurologicamente sani, al fine di rilevare eventuali differenze tra i due gruppi.

### 3. Materiali e Metodi

#### 3.1. Popolazione oggetto dello studio

Per questo lavoro di tesi è stata utilizzata una popolazione costituita da 120 soggetti con diagnosi di MA probabile, rispettando i criteri NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 2011) e da 115 soggetti volontari non affetti da patologie neurologiche e la cui storia familiare è risultata negativa per la MA (Tabella 1). Tutti i partecipanti allo studio sono stati reclutati nella Clinica Neurologica dell'Università di Pisa e nell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) "Oasi Maria Santissima" di Troina (EN) e sono stati sottoposti ad un prelievo ematico dopo consenso informato da ciascuno di loro. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette con l'anticoagulante EDTA e conservati a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Questo studio è stato eseguito in conformità alla Dichiarazione di Helsinki, in accordo con le regole etiche proposte dal Comitato Etico del Azienda Ospedaliera Pisana.

|   | Pazienti MA (n=120) | Controlli (n=115) | p-value           |
|---|---------------------|-------------------|-------------------|
| Età al campionamento (anni, media $\pm$ DS) | 76.9 $\pm$ 8.1      | 76.3 $\pm$ 8.3    | 0.56 <sup>a</sup> |
| Sesso (M/F)                                 | 49/71               | 51/64             | 0.60 <sup>b</sup> |

**Tabella 1.** Caratteristiche demografiche della popolazione oggetto dello studio. p-value ottenuto mediante <sup>a</sup>test t di Student e <sup>b</sup>analisi  $\chi^2$ .

#### 3.2. Analisi di metilazione del DNA

Le analisi di metilazione sono state condotte mediante due tecniche. Per le analisi di metilazione dello studio 1 condotto su 120 pazienti MA e 115 controlli (tabella 1) è stata utilizzata la tecnica Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM). Per lo studio 2 è stato dapprima utilizzato un saggio che consente la simultanea analisi di 22 geni su 7 pazienti MA e 7 controlli (tabella 2), ed in seguito la MS-HRM su 56 pazienti con MA e 55 controlli (tabella 3). Inoltre la metilazione del gene *MTHFR*, l'unico ad avere mostrato una grande variabilità interindividuale nei suoi livelli di metilazione (5-75%) è stata confermata mediante la tecnica del pirosequenziamento.

Il DNA genomico è stato isolato da sangue periferico mediante l'uso del kit QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia) seguendo i passaggi indicati nel manuale di riferimento. Successivamente, il materiale genomico estratto, è stato quantificato mediante lo spettrofotometro NanoDrop ND 200c (Nano Drop Thermo scientific, Wilmington, DE).

| Variabile                                   | Pazienti MA (n=7) | Controlli (n=7) | p-value           |
|---|-------------------|-----------------|-------------------|
| Età al campionamento (anni, media $\pm$ DS) | 79.1 $\pm$ 4.7    | 79.7 $\pm$ 5.2  | 0.83 <sup>a</sup> |
| Sesso (M/F)                                 | 5/2               | 5/2             | 1.00 <sup>b</sup> |

**Tabella 2.** Caratteristiche demografiche della popolazione oggetto dello studio analizzata con gli Array di metilazione. *p*-value ottenuto mediante <sup>a</sup>test t di Student e <sup>b</sup>analisi  $\chi^2$

| Variabile                                   | Pazienti MA (n=56) | Controlli (n=55) | p-value           |
|---|--------------------|------------------|-------------------|
| Età al campionamento (anni, media $\pm$ DS) | 76.3 $\pm$ 7.3     | 77.9 $\pm$ 10.1  | 0.49 <sup>a</sup> |
| Sesso (M/F)                                 | 31/25              | 32/23            | 0.85 <sup>b</sup> |

**Tabella 3.** Caratteristiche demografiche della popolazione oggetto dello studio analizzata con la tecnica MS-HRM nello studio 2. *p*-value ottenuto mediante <sup>a</sup>test t di Student e <sup>b</sup>analisi  $\chi^2$

### 3.3. Methylation-Sensitive High Resolution Melting

Per l'analisi di metilazione mediante MS-HRM sono stati trattati 200 ng di DNA con sodio bisolfito utilizzando il kit "EpiTect® Bisulfite Kit" (Qiagen, Milano, Italia). Questo trattamento è necessario per poter conservare la metilazione nella sequenza di interesse che, altrimenti durante la reazione di PCR andrebbe persa per azione della DNA polimerasi. Come intercalante abbiamo utilizzato l'Eva-Green che emette fluorescenza a 510 nm se eccitato ad una lunghezza d'onda di 470 nm. Lo strumento che abbiamo usato per questa analisi è il termociclatore C1000™ Thermal Cycler supportato dal CFX 96™ Real-Time System (Bio-Rad, Milano).

I primer utilizzati per l'amplificazione dei geni *BACE1*, *DNMT1*, *DNMT3B*, *PSEN1*, *MRE11A* e *PARP1* sono stati disegnati attraverso l'utilizzo del software MethPrimer seguendo le linee guida di Wojdacz et al. (Wojdacz et al., 2008), mentre i primer per i geni per *MTHFR*, *DNMT3A*, *BRCA1*, *MGMT* e *MLH1* sono stati presi dalla letteratura (Vaissiere et al., 2009, Jost et al., 2014, Lim et al., 2014, Coppedè et al., 2014). Per ogni reazione è stato usato un volume di 25  $\mu$ l contenente 12,5  $\mu$ l di master Mix (Qiagen, Milano, Italia), 1  $\mu$ l di primer forward, 1  $\mu$ l di primer reverse, 9,5  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O ed in aggiunta 1  $\mu$ l di DNA trattato con bisolfito, contenente circa 10 ng di DNA. I primer e le loro principali caratteristiche, quali la temperatura di annealing, la lunghezza dell'amplicone e il numero di dinucleotidi CpG presenti nell'amplicone, sono riportati nelle tabelle 4 e 5.

| Gene          | Sequenza dei primer   | T <sub>a</sub> | Amplicone (bp) | Siti CpG |
|---------------|---|----------------|----------------|----------|
| <i>BACE1</i>  | F 5'-CGGTAGAGGGTATTTTAGATTTTTTT-3'<br>R 5'-CGTAACTACTCAAACCACCATAAT-3'      | 57°            | 191            | 10       |
| <i>DNMT1</i>  | F 5'-GGTATCGTGTTTATTTTTTAGTAA-3'<br>R 5'-ACGAAACCAACCATACCCAA-3'            | 52°            | 114            | 9        |
| <i>DNMT3A</i> | F 5'-GGTTGGGTTTATTGTAGGAAGGTTATTAAGGT-3'<br>R 5'-AATCCAAAACCCCTATCACGAAA-3' | 58°            | 199            | 7        |
| <i>DNMT3B</i> | F 5'-TGGTGTTGTGTGATTATAGTGG-3'<br>R 5'-TCACCCTAAAAAATCAAAAACC-3'            | 55°            | 174            | 6        |
| <i>MTHFR</i>  | F 5'-TTTTAATTTTTGTTTGGAGGGTAGT-3'<br>R 5'-AAAAAAACCACTTATCACCAAATTC-3'      | 54°            | 155            | 7        |
| <i>PSENI</i>  | F 5'-TTTTTTGATTGTGATGTAGTTGGTT-3'<br>R 5'-AAAAACCCAAAACCTCCACCTAAC-3'       | 56°            | 227            | 11       |

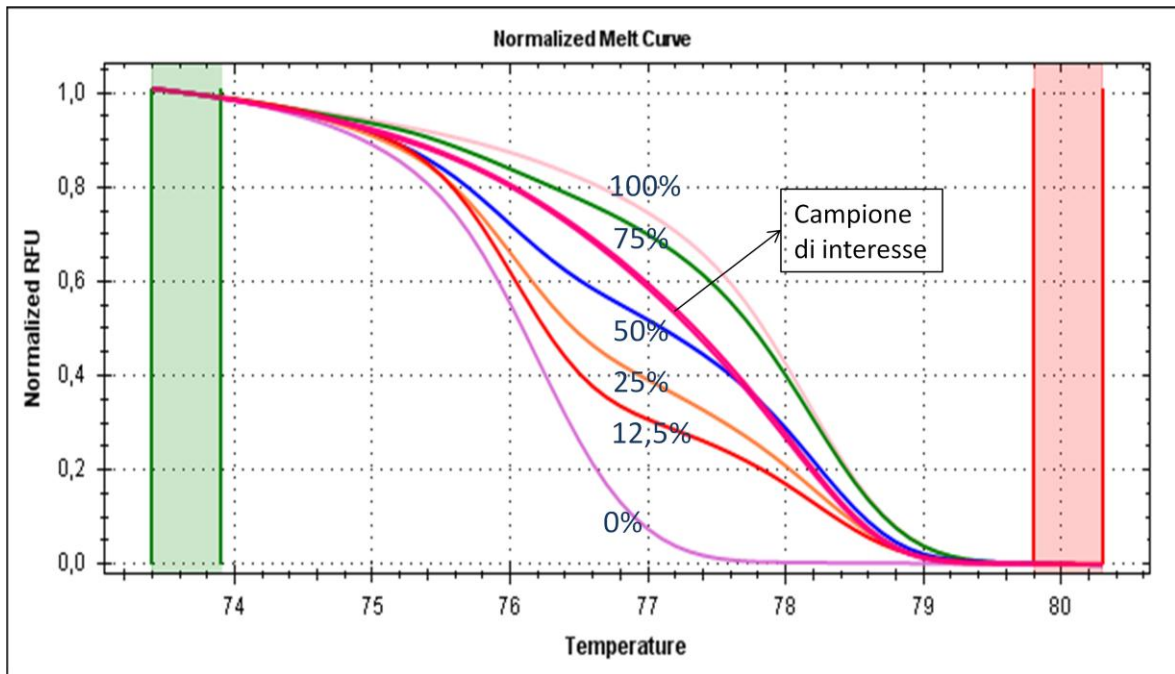
**Tabella 4.** Primer dei geni analizzati nello studio 1.

| Gene          | Sequenza dei primer  | T <sub>a</sub> | Amplicone (bp) | Siti CpG |
|---------------|--|----------------|----------------|----------|
| <i>BRCA1</i>  | F 5'-TTGTTGTTAGCGGTAGTTTTTTGGTT-3'<br>R 5'-CAATCGCAATTTTAATTTATCTATAATTCC-3' | 58°            | 79             | 7        |
| <i>MGMT</i>   | F 5'-GCGTTTCGGATATGTTGGGATAAGT-3'<br>R 5'-AACGACCCAAACACTCACCAA-3'           | 58°            | 110            | 12       |
| <i>MLH1</i>   | F 5'-GGTTATAAGAGTAGGGTTAA-3'<br>R 5'-ATACCAATCAAATTTCTC-3'                   | 56°            | 81             | 5        |
| <i>MRE11A</i> | F 5'-ATTTTGTGTTGTTTAAAGGTGTTT-3'<br>R 5'-CAAAAACAATCCTATATTTCTATTCAA-3'      | 56°            | 150            | 7        |
| <i>OGGI</i>   | F 5'-AAATAGGGAAGGTTGTTAAATAGTAT-3'<br>R 5'-AAAAACCCACAAAACAAAATAAAA-3'       | 52°            | 214            | 15       |
| <i>PARP1</i>  | F 5'-GTTTTTTAAAGAGTTATTAGTTTAA-3'<br>R 5'-CCCTAATAAATTACTAATACCTAACC-3'      | 56°            | 194            | 24       |

**Tabella 5.** Primer dei geni analizzati nello studio 2.

La tecnica MS-HRM è in grado di fornire un range di metilazione di un campione di interesse mediante il confronto tra la sua curva di melting e quelle ottenute con DNA standards con valore di metilazione noto (figura 6). Per ottenere un valore preciso di metilazione abbiamo quindi utilizzato la funzione “polyfit” all’interno del programma MatLab, che fornisce una curva di interpolazione (Migheli et al., 2013). Per la costruzione di questa curva abbiamo utilizzato la media dei valori di RFU (Relative Fluorescence Unit) normalizzati dei DNA standards (0%, 12.5%, 25%, 50%, 75%, 100%) che ci vengono forniti dal software “Precision melt analysis™ software” (BioRad, Milano). Si procede quindi con l’inserimento del valore RFU di ogni campione nella funzione, così da ottenere un valore preciso di metilazione.





**Figura 6.** Curve di melting ottenute con la tecnica MS-HRM. Con la freccia è indicato un campione con un grado di metilazione compreso tra il 50 e il 75%.

### 3.4. Pirosequenziamento

I livelli di metilazione del gene *MTHFR*, l'unico ad avere mostrato una metilazione media di metilazione compresa tra il 5% e il 75%, sono stati confermati mediante la tecnica del pirosequenziamento, analizzando le stesse unità CpG analizzate con la MS-HRM. Per ogni reazione di PCR sono stati utilizzati 12.5  $\mu$ L di PyroMark Mastermix (Qiagen), 5 pmol di primer forward e primer reverse e 1  $\mu$ L (circa 10 ng) di DNA trattato con bisolfito di sodio. Le analisi sono state condotte con un PyroMark Q24 MDx (Qiagen, Germania) al dipartimento di Scienze Nutrizionali, Università di Vienna

### 3.5. Array di metilazione

Per lo studio della metilazione dei geni coinvolti nella riparazione del DNA è stato utilizzato il DNA Repair EpiTect Methyl II PCR Array (Qiagen, Milano, Italia) che permette di ottenere lo stato di metilazione di 22 geni in un unico esperimento. I geni analizzati codificano per proteine facenti parte del BER, del NER, del MMR e della riparazione al danno al DNA a doppio filamento (tabella 6). Il saggio di Array è stato eseguito seguendo il protocollo della ditta. A differenza della metodica MS-HRM, questa

analisi di metilazione non necessita del trattamento con sodio bisolfito del DNA. Tale saggio consiste di una prima fase in cui 1 µg di DNA genomico viene trattato con enzimi sensibili alla metilazione, che digeriscono il DNA non metilato, e con enzimi dipendenti dalla metilazione, che digeriscono il DNA metilato. Nella seconda fase il DNA digerito con i diversi enzimi viene dispensato in una piastra da 96 pozzetti contenente i primer per i geni di interesse, e viene quindi eseguita real-time PCR. Il profilo di metilazione viene fornito come percentuale di DNA non metilato (UM, unmethylated DNA) e di DNA metilato (M, methylated DNA) per ciascun gene. Le analisi sono state eseguite con un termociclatore C1000™ Thermal Cycler supportato dal CFX 96™ Real-Time System della Bio-Rad con reagenti e condizioni di PCR fornite dalla ditta. Ogni Array contiene due controlli interni, chiamati rispettivamente SEC (methylation-sensitive restriction enzyme control assay) e DEC (methylation-dependent restriction enzyme control assay). Questi controlli contengono una sequenza non metilata (SEC) e una sequenza metilata (DEC) e servono come controllo interno di qualità del saggio, per confermare l'efficienza del taglio degli enzimi di restrizione. I dati sono stati analizzati con il software Methyl II PCR data analysis della Qiagen che fornisce un file Excel che calcola lo stato di metilazione del DNA a partire dai dati grezzi dei cicli soglia (Ct) di amplificazione della PCR, usando la tecnologia MethylScreen™. Una volta che i Ct vengono immessi nel file Excel, il software fornisce un risultato delle sequenze interne SEC e DEC. Più del 94% delle sequenze SEC e DEC devono essere digerite affinché i risultati dell'Array possano essere considerati attendibili.

| <b>Meccanismo di riparazione al DNA</b>      | <b>Geni analizzati</b>                          |
|--|---|
| Base Excision Repair (BER)                   | <i>APEX1, LIG3, PARP1, POLB, UNG, XRCC1,</i>    |
| Nucleotide Excision Repair (NER)             | <i>CCNH, RAD23A, RAD23B, XPC</i>                |
| Mismatch Repair (MMR)                        | <i>MLH1, MLH3, MSH2, PMS2, POLD3,</i>           |
| Double-Strand Break (DSB) Repair             | <i>BRCA1, BRCA2, FEN1, MRE11A, RAD50, RAD51</i> |
| Altri geni correlati alla riparazione al DNA | <i>ATM</i>                                      |

**Tabella 6.** Geni della riparazione al DNA presenti nell'Array.

### 3.6. Genotipizzazione

La genotipizzazione per *APOE* è stata eseguita come descritto da Hixon e Vernier (1990) e da Tsai e collaboratori (1994). Brevemente, una volta che il DNA è stato isolato dal sangue periferico è stata eseguita una PCR con i primers specifici per il gene *APOE*. L'amplificato

è stato digerito con l'enzima di restrizione *HhaI*, ed i frammenti separati mediante corsa elettroforetica su gel.

### **3.7. Analisi Biochimiche**

Le analisi biochimiche sono state effettuate su campioni di sangue periferico con protocolli standard presso il laboratorio di diagnostica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana e dell'IRCCS Oasi Maria SS, Troina. Il plasma è stato immediatamente separato e conservato in congelatore a -80°C. L'Hcy plasmatica è stata misurata mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem; mentre i livelli sierici di folati e vitamina B12 sono stati determinati tramite un test immunologico per elettrochemiluminescenza (ECLIA).

### **3.8. Mappa di connettività semantica**

Per mostrare graficamente le connessioni e le forze di interazione delle variabili analizzate nello studio 1, è stato utilizzato un sistema artificiale adattativo chiamato Auto-CM (Buscema et al., 2008) in un sottogruppo di 100 pazienti con MA e 100 controlli (tabella 7) per i quali erano disponibili i dati completi delle variabili da analizzare (sesso, età al prelievo, livelli di folati, Hcy e vitamina B12 e livelli di metilazione dei geni *PSENI*, *BACE1*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MTHFR*). Il sistema Auto-CM è un tipo particolare di Rete Neurale Artificiale (Artificial Neural Networks, ANN) in grado di determinare i pesi delle forze di associazione di tutte le variabili tra di loro. I pesi vengono quindi trasformati in distanze fisiche così che le coppie delle variabili con forza di connessione maggiore saranno più vicine tra loro. Dopo una fase di "apprendimento" il peso della matrice dell'Auto-CM rappresenta il paesaggio deformato del dataset. In seguito viene applicato un semplice filtro per ottenere una mappa delle principali connessioni tra le variabili del dataset definita mappa di connettività. Le variabili categoriche vengono lasciate invariate mentre le variabili numeriche (folati, Hcy, vitamina B12 e la metilazione dei geni) sono state trasformate in input con range da 0 a 1 (Gallucci et al., 2014; Coppedè et al., 2013). Ad esempio la metilazione del gene *MTHFR* ha mostrato valori di metilazioni variabili tra il 5.9% (il più basso valore osservato) e il 74.6% (valore più alto). In seguito

alla trasformazione a 5.9 viene assegnato il valore di 0, mentre al 74.6% il valore 1. Tutti gli altri valori di metilazione di *MTHFR* osservati vengono trasformati in base alla nuova scala. Grazie a questo pre-processamento di tutte le variabili studiate viene consentita una visualizzazione grafica di ogni variabile nella mappa in base ai loro valori più bassi e più alti.

| Variabile                                   | Pazienti MA (n=100) | Controlli (n=100) | p-value           |
|---|---------------------|-------------------|-------------------|
| Età al campionamento (anni, media $\pm$ DS) | 77.5 $\pm$ 7.5      | 76.8 $\pm$ 8.4    | 0.53 <sup>a</sup> |
| Sesso (M/F)                                 | 46/54               | 46/54             | 1.00 <sup>b</sup> |

**Tabella 7.** Caratteristiche demografiche della popolazione oggetto dello studio analizzata con le ANN. p-value ottenuto mediante <sup>a</sup>test t di Student e <sup>b</sup>analisi  $\chi^2$

### 3.9. Analisi statistiche

Le differenze di età e le differenze di genere nei due gruppi in esame sono state verificate rispettivamente mediante analisi della varianza e test del  $\chi^2$ .

Dal momento che le concentrazioni di Hcy, folati e vitamina B12 non mostravano una distribuzione normale, i dati sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica prima delle analisi.

Le differenze nella media dei livelli ematici di Hcy, folati e vitamina B12 sono state calcolate utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) multifattoriale, includendo come cofattori l'età al momento del campionamento e il genere. Questo stesso test è stato applicato per valutare le differenze di metilazione dei geni studiati nei due gruppi oggetto dello studio.

La regressione lineare è stata utilizzata per valutare la correlazione tra i dati biochimici e i livelli di metilazione dei geni, per correlare ogni dato biochimico con l'età al momento del campionamento e per verificare l'esistenza di una correlazione tra l'età al momento del campionamento e i livelli di metilazione di ciascun gene.

Dal momento che con la MS-HRM abbiamo analizzato i livelli di metilazione di sei diversi geni nello studio 1 e 6 geni nello studio 2, abbiamo applicato la correzione di Bonferroni per analisi multiple. Il p-value per considerare un risultato statisticamente significativo è stato quindi stabilito a  $0,05/6 = 0,008$  in ciascuno studio.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte con l'ausilio dei software GraphPad Prism e STATGRAPHICS® Centurion XVI.I

## 4. Risultati

### 4.1. Risultati Studio 1

Nella tabella 8 sono riportate le caratteristiche demografiche, i dati biochimici e genetici dei 120 pazienti MA e 115 controlli utilizzati nello studio 1.

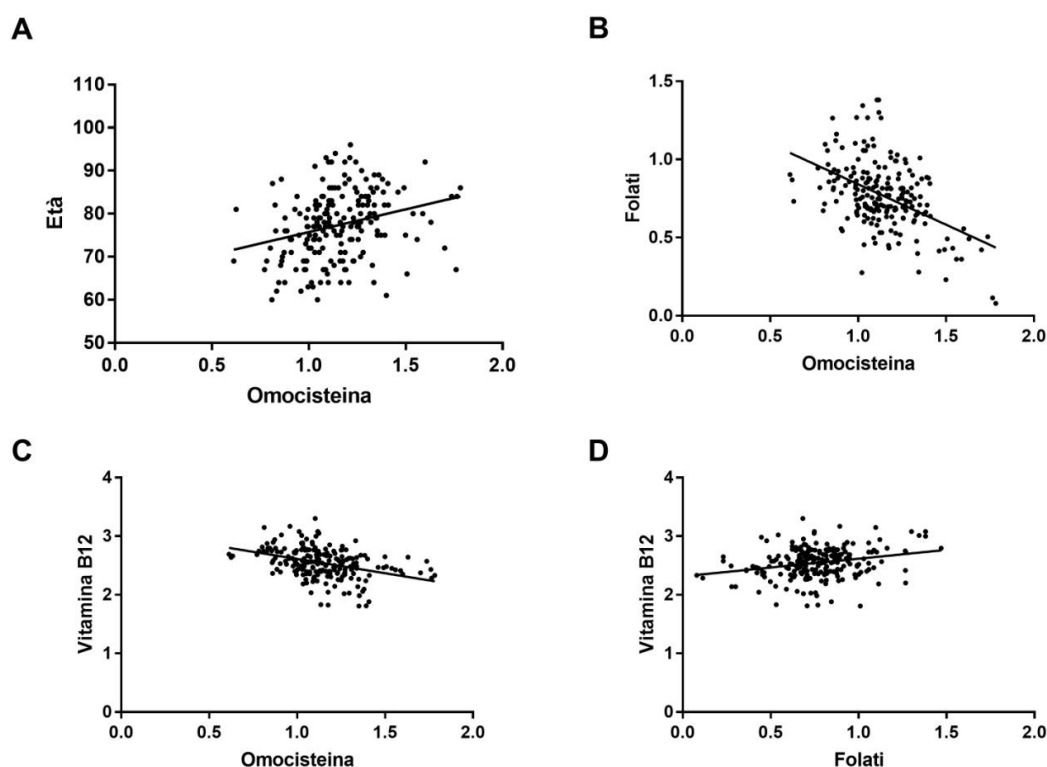
I livelli plasmatici di Hcy tendono ad essere più elevati nei pazienti MA rispetto ai controlli, e sia i livelli plasmatici di folati che di vitamina B12 più bassi nel gruppo MA, sebbene solo la vitamina B12 raggiunga una differenza statisticamente significativa ( $p = 0.0007$ ). I portatori dell'allele *APOE*  $\epsilon 4$  sono significativamente più numerosi nel gruppo MA rispetto ai controlli ( $p = 0.0001$ ).

| Variabile  | Pazienti MA (n=120) | Controlli (n=115) | p-value                   |
|--|---------------------|-------------------|---------------------------|
| Età al campionamento (anni, media $\pm$ DS)          | 76.9 $\pm$ 8.1      | 76.3 $\pm$ 8.3    | 0.56 <sup>a</sup>         |
| Sesso (M/F)  | 49/71               | 51/64             | 0.60 <sup>b</sup>         |
| Folati (ng/mL, media $\pm$ SEM)                      | 6.5 $\pm$ 0.4       | 6.8 $\pm$ 0.4     | 0.23 <sup>c</sup>         |
| Omocisteina ( $\mu$ mol/L, media $\pm$ SEM)          | 16.7 $\pm$ 0.8      | 14.3 $\pm$ 0.9    | 0.11 <sup>c</sup>         |
| Vitamina B12 (pg/mL, media $\pm$ SEM)                | 371.8 $\pm$ 24.3    | 462.2 $\pm$ 25.2  | <b>0.0007<sup>c</sup></b> |
| <i>APOE</i> $\epsilon 4^d$ (portatori/non portatori) | 46/61               | 16/86             | <b>0.0001<sup>b</sup></b> |

**Tabella 8.** Caratteristiche demografiche, dati biochimici e genotipizzazione di *APOE* dello studio 1. <sup>a</sup> Student's t Test. <sup>b</sup> test del  $\chi^2$ . <sup>c</sup> Analisi della varianza multifattoriale usando dati normalizzati e corretti per età e per sesso.

<sup>d</sup>Dati disponibili per 207 pazienti: 107 MA (45 maschi e 62 femmine, età media 76.8  $\pm$  6.4 anni) e 102 controlli (47 maschi e 55 femmine, età media 75.6  $\pm$  8.0 anni).

L'analisi di regressione lineare ha mostrato una correlazione significativa tra l'aumento dell'età ed i valori di Hcy ( $r = 0.32$ ;  $p = 0.0001$ ), e una correlazione inversa tra i livelli plasmatici di Hcy sia con i livelli di folati ( $r = -0.47$ ;  $p = 0.001$ ) che con i livelli di vitamina B12 ( $r = -0.38$ ;  $p = 0.001$ ). Inoltre i livelli sierici dei folati hanno mostrato una correlazione positiva con i livelli sierici di vitamina B12 ( $r = 0.26$ ;  $p = 0.001$ ) (figura 7). Nessun effetto significativo è stato osservato tra i livelli dei metaboliti analizzati e il sesso dei soggetti.



**Figura 7.** Analisi di regressione lineare. (A) correlazioni tra l'Hcy e l'età ( $r = 0.32$ ;  $p = 0.0001$ ), (B) tra l'Hcy e i folati ( $r = -0.47$ ;  $p = 0.001$ ), (C) tra l' Hcy e la vitamina B12 ( $r = -0.38$ ;  $p = 0.001$ ) e (D) tra i folati e la vitamina B12 ( $r = 0.26$ ;  $p = 0.001$ ). I livelli sierici di Hcy ( $\mu\text{mol/L}$ ), di folati ( $\text{ng/mL}$ ) e di vitamina B12 ( $\text{pg/mL}$ ) hanno mostrato una distribuzione non normale e sono quindi stati utilizzati i valori sottoposti a trasformazione logaritmica.

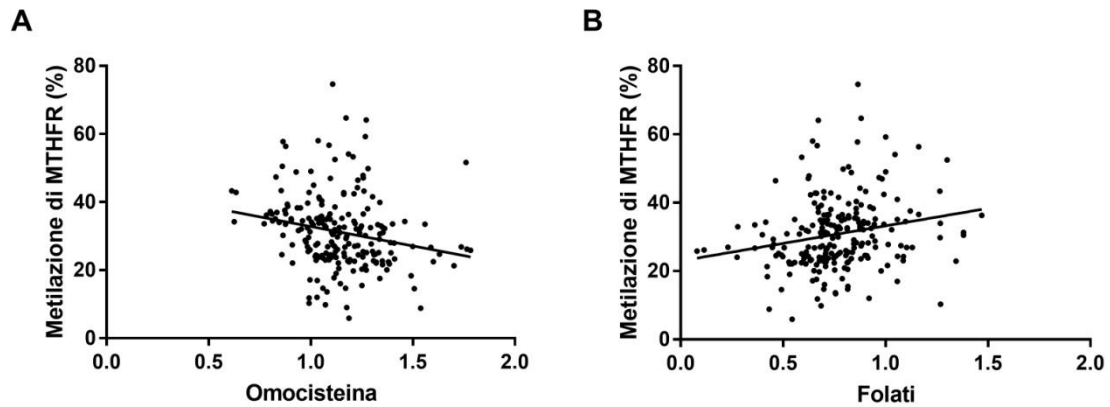
#### 4.1.1. Analisi di metilazione

In tabella 9 sono riportate le medie dei livelli di metilazione ottenute per i sei geni analizzati nello studio 1 mediante la tecnica MS-HRM. Tutti i geni sono risultati essere altamente ipometilati nelle regioni analizzate sia nei pazienti MA che nei controlli, eccetto per il gene *MTHFR* che ha mostrato una metilazione variabile tra il 5% e il 75% di metilazione ed una metilazione media di 31.1% nei pazienti MA e 30.7% nei controlli. Nessun gene ha mostrato una differenza di metilazione statisticamente significativa tra i due gruppi.

| Gene          | Pazienti MA<br>(media $\pm$ SEM) | Controlli<br>(media $\pm$ SEM) | <i>p</i> -value |
|---------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| <i>BACE1</i>  | 0.62 $\pm$ 0.11                  | 0.74 $\pm$ 0.11                | 0.12            |
| <i>PSEN1</i>  | 0.54 $\pm$ 0.14                  | 0.67 $\pm$ 0.15                | 0.51            |
| <i>DNMT1</i>  | 2.31 $\pm$ 0.27                  | 1.88 $\pm$ 0.28                | 0.41            |
| <i>DNMT3A</i> | 0.90 $\pm$ 0.25                  | 1.59 $\pm$ 0.26                | 0.10            |
| <i>DNMT3B</i> | 2.19 $\pm$ 0.37                  | 1.99 $\pm$ 0.38                | 0.81            |
| <i>MTHFR</i>  | 31.1 $\pm$ 1.03                  | 30.7 $\pm$ 1.08                | 0.89            |

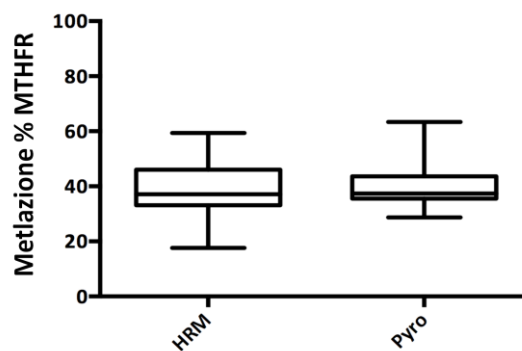
**Tabella 9.** Media dei livelli di metilazione (%) ottenuti con la MS-HRM.

Le uniche correlazioni trovate statisticamente significative tra i livelli di metilazione e le caratteristiche demografiche, dati biochimici e genotipizzazione di *APOE* sono state una correlazione inversa tra i livelli plasmatici di Hcy e la metilazione di *MTHFR* ( $r = -0.21$ ;  $p = 0.002$ , figura 8A) e una correlazione positiva tra i livelli plasmatici di folati e la metilazione di *MTHFR* ( $r = 0.21$ ;  $p = 0.002$ , figura 8B).



**Figura 8.** Correlazione tra la metilazione del gene *MTHFR* e i livelli sierici di omocisteina (A) e folati (B).

La metilazione del gene *MTHFR* è stata confermata mediante la tecnica del pirosequenziamento, la quale ha confermato i livelli di metilazione osservati con la MS-HRM (Figura 9).



**Figura 9.** Metilazione del gene *MTHFR* ottenuta con le tecniche MS-HRM e pirosequenziamento.

### 4.1.2. Mappa di connettività semantica

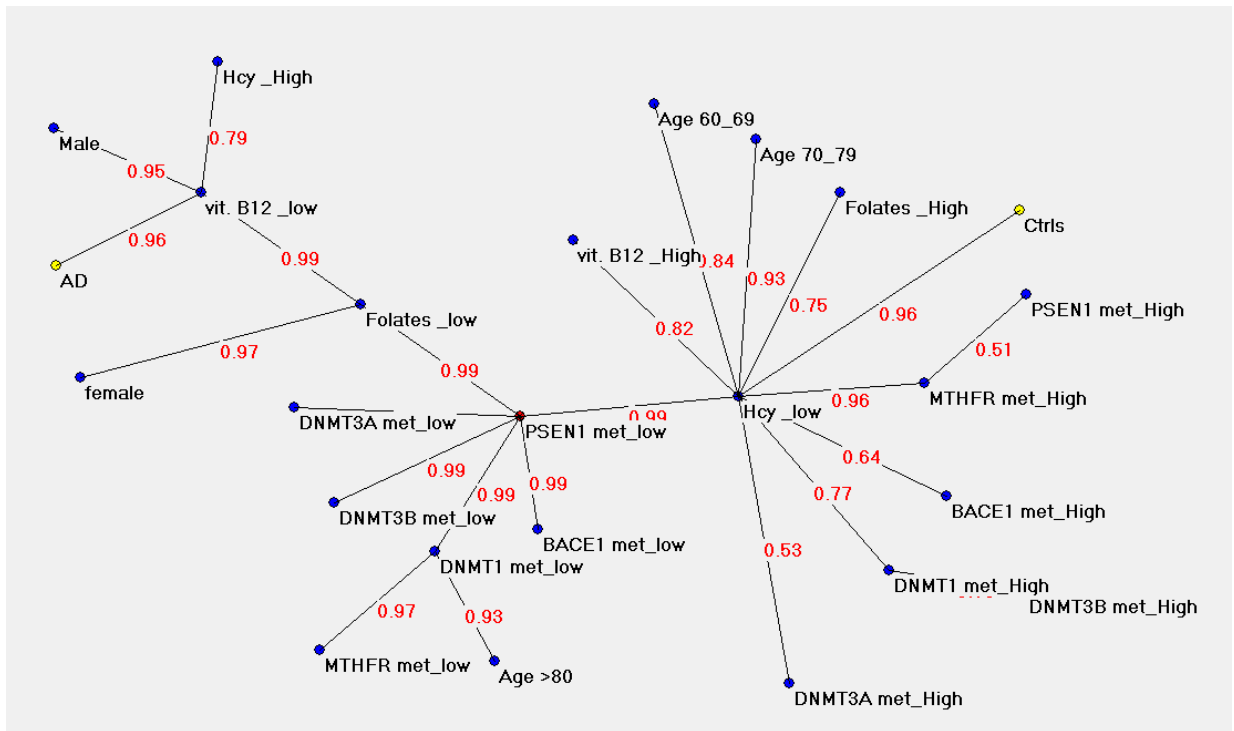
Nella tabella 10 sono riportate le caratteristiche demografiche, i dati biochimici e i livelli di metilazione dei 6 geni analizzati nei 100 pazienti MA e 100 controlli utilizzati per la costruzione della mappa di connettività semantica. Anche in questo sottogruppo di individui i livelli di vitamina B12 sono significativamente ridotti nei pazienti MA rispetto ai controlli.

| Variabile                                | Pazienti MA (n=100) | Controlli (n=100) | p-value <sup>a</sup> |
|--|---------------------|-------------------|----------------------|
| Età al campionamento (anni, media ± DS)  | 77.5 ± 8.1          | 76.8 ± 8.4        | 0.53                 |
| Sesso (M/F)                              | 46/54               | 46/54             | 1.00                 |
| Folati (ng/mL, media ± SEM)              | 6.8 ± 0.49          | 6.9 ± 0.47        | 0.77                 |
| Omocisteina (µmol/L, media ± SEM)        | 17.4 ± 1.18         | 14.8 ± 0.63       | 0.17                 |
| Vitamina B12 (pg/mL, media ± SEM)        | 403 ± 21.8          | 472 ± 31.0        | <b>0.04</b>          |
| <i>PSENI</i> %metilazione (media ± SEM)  | 0.6 ± 0.12          | 0.9 ± 0.19        | 0.18                 |
| <i>BACE1</i> %metilazione (media ± SEM)  | 0.5 ± 0.09          | 0.8 ± 0.12        | 0.06                 |
| <i>DNMT1</i> %metilazione (media ± SEM)  | 2.3 ± 0.29          | 1.9 ± 0.25        | 0.29                 |
| <i>DNMT3A</i> %metilazione (media ± SEM) | 0.9 ± 0.22          | 1.2 ± 0.22        | 0.33                 |
| <i>DNMT3B</i> %metilazione (media ± SEM) | 2.4 ± 0.41          | 2.7 ± 0.37        | 0.59                 |
| <i>MTHFR</i> %metilazione (media ± SEM)  | 30.8 ± 1.12         | 30.3 ± 0.99       | 0.74                 |

**Tabella 10.** Distribuzione delle variabili per le ANN tra casi e controlli. <sup>a</sup> p-value ottenuto mediante analisi  $\chi^2$  o test t di Student.

La figura 10 mostra la mappa di connettività semantica ottenuta con l'Auto-CM. Le variabili che mostrano il più grande numero di connessioni con le altre variabili vengono chiamate "hubs" (fulcri). Un valore numerico viene applicato ad ogni connessione che è proporzionale alla forza di connessione tra due variabili (f.a.= forza di associazione; 0= nessuna associazione, 1=alta associazione). I risultati mostrano chiaramente che i pazienti MA e i controlli sono ben separati tra di loro. In particolar modo i pazienti MA sono altamente connessi a bassi livelli di vitamina B12 (f.a.= 0.96), i quali a loro volta sono altamente connessi a bassi folati (f.a. = 0.99) ed alta Hcy (f.a. = 0.79). Al contrario i controlli sono altamente connessi a bassa Hcy (f.a. = 0.96), la quale è altamente connessa a bassi folati (f.a. = 0.75) ed alta vitamina B12 (f.a. = 0.82).





**Figura 10.** Mappa di connettività semantica ottenuta con il sistema Auto-CM.

Un dato interessante che emerge dalla mappa è che la metilazione della *PSEN1* funziona come un hub del sistema ed è altamente connessa a bassi livelli di metilazione di tutti gli altri geni investigati. Inoltre bassi livelli di metilazione di *PSEN1* sono altamente connessi a bassi folati (f.a.= 0.99) così come a bassi livelli di Hcy (f.a. = 0.99). I bassi livelli Hcy sono un altro hub del sistema, direttamente connesso non solo ai controlli neurologicamente sani e ad alti livelli di folati e di vitamina B12, ma anche ad alti livelli di metilazione della maggior parte dei geni studiati (f.a. = da 0.53 a 0.96). Il sesso non è direttamente legato alla metilazione del promotore, mentre l'incremento dell'età (> 80 anni) è direttamente correlato a bassi livelli di metilazione della *DNMT1*, e più giovane età a bassi livelli di Hcy.

## 4.2. Risultati Studio 2

In figura 11 sono mostrati i risultati ottenuti con l'array di metilazione.

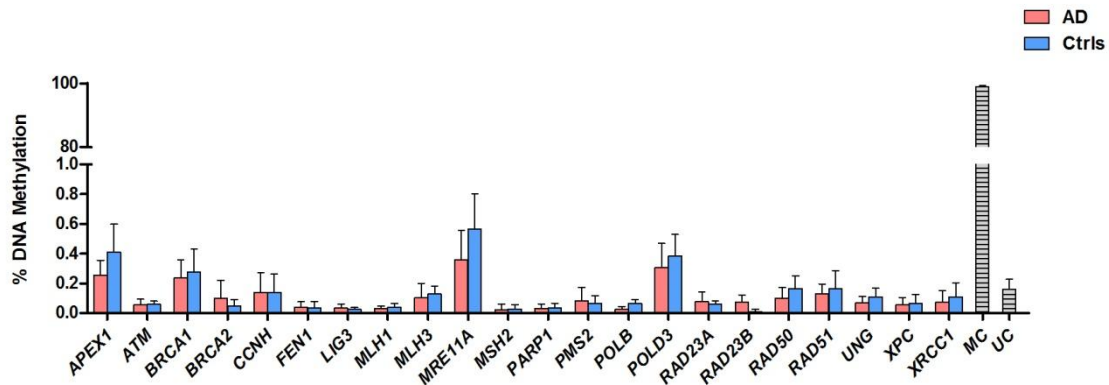


Figura 11. Risultati degli array di metilazione dello studio 2. MC= controllo metilato; UC controllo non metilato.

Tutti i 22 geni studiati sono risultati essere altamente demetilati e nessuna differenza significativa tra i due gruppi è stata osservata. La sequenza di controllo interna metilata (MC) è risultata essere ipermetilata (> 99% di metilazione), mentre la sequenza di controllo interna non metilata (UC) è risultata essere demetilata (< 1% di metilazione).

In tabella 11 sono mostrati le medie di metilazione ottenute sui 6 geni analizzati nello studio 2 mediante la tecnica MS-HRM.

| Gene          | Pazienti MA (media $\pm$ SEM) | Controlli (media $\pm$ SEM) | p-value |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------|---------|
| <i>BRCA1</i>  | 0.54 $\pm$ 0.08               | 0.89 $\pm$ 0.12             | 0.013   |
| <i>MGMT</i>   | 0.08 $\pm$ 0.03               | 0.34 $\pm$ 0.16             | 0.10    |
| <i>MLH1</i>   | 0.55 $\pm$ 0.10               | 0.46 $\pm$ 0.08             | 0.62    |
| <i>MRE11A</i> | 2.22 $\pm$ 0.40               | 2.03 $\pm$ 0.35             | 0.62    |
| <i>OGG1</i>   | 0.14 $\pm$ 0.03               | 0.15 $\pm$ 0.03             | 0.69    |
| <i>PARP1</i>  | 0.26 $\pm$ 0.04               | 0.30 $\pm$ 0.05             | 0.42    |

Tabella 11. Media dei livelli di metilazione (%) ottenuti con la MS-HRM.

Anche con questa tecnica tutti i geni sono risultati essere altamente demetilati e nessuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi è stata osservata. Il gene che ha mostrato la differenza maggiore tra gli individui con MA (0.54  $\pm$  0.08) e i controlli (0.89  $\pm$  0.12) è stato *BRCA1* ( $p = 0.013$ ), la cui significatività non raggiunge comunque quella stabilita a priori in seguito alla correzione di Bonferroni, e che è stata settata a  $p = 0,008$ .

## 5. Discussione

Nel presente lavoro di tesi sono stati indagati i profili di metilazione di numerosi geni in DNA estratto da cellule del sangue periferico di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer e in controlli neurologicamente sani. Nel primo studio sono stati indagati i livelli di metilazione di geni coinvolti nel processamento del peptide  $\beta$ -amiloide (*PSENI* e *BACE1*), nella metilazione del DNA (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) e nel metabolismo dei folati (*MTHFR*) e non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i pazienti e i controlli. Sono stati anche analizzati alcuni noti fattori di rischio per la MA, come l'età, il sesso, alcuni biomarcatori del ciclo dei folati e la presenza del genotipo *APOE4*, che non hanno mostrato avere nessun effetto sulle medie di metilazione dei geni studiati, con l'unica eccezione del gene *MTHFR* che ha mostrato correlazione con i livelli plasmatici di folati e Hcy.

Per quanto riguarda *BACE1*, Wang e collaboratori hanno analizzato i suoi livelli di metilazione in linfociti di sangue periferico e in tessuto cerebrale di una piccola coorte di soggetti senza trovare alcuna differenza di metilazione tra pazienti con MA e controlli neurologicamente sani, ed evidenziando solo una condizione di ipometilazione della regione in esame (Wang et al., 2008). Invece per quanto riguarda *PSENI* diversi studi oltre al nostro hanno valutato la metilazione di tale gene in relazione alla MA, sia su tessuto cerebrale che su sangue periferico ottenendo risultati contrastanti (Wang et al., 2008; Hou et al., 2013; Piaceri et al., 2014; Carboni et al., 2015). Analizzando i livelli di metilazione del gene *PSENI* in diverse aree di tessuto cerebrale non sono emerse differenze significative tra pazienti e controlli (Wang et al., 2008; Iwata et al., 2014), e questi risultati sono stati poi confermati in diversi studi su sangue periferico (Wang et al. 2008; Huo et al., 2013; Carboni et al., 2015), in pieno accordo ai nostri risultati. Tuttavia, uno studio ha mostrato un leggero aumento statisticamente significativo della metilazione nella regione del promotore di *PSENI* nei pazienti MA rispetto ai controlli (Piaceri et al., 2014). Le differenze tra i risultati ottenuti nei vari studi devono essere considerate alla luce di diverse variabili quali la tecnica utilizzata, il numero dei soggetti in studio e soprattutto la regione del gene analizzata che possono portare a risultati contrastanti.

Analogamente anche per quanto riguarda lo studio dei livelli di metilazione dei geni *DNMT*, non sono presenti lavori in letteratura atti a valutare il loro stato di metilazione in pazienti con MA tranne che nel lavoro di Wang e collaboratori. Questi autori hanno analizzato sia su tessuto cerebrale che su sangue periferico di pazienti MA e controlli sani

la metilazione della *DNMT1* trovando una condizione di ipometilazione in entrambi i tessuti e confermando quello che emerge dai nostri risultati (Wang et al., 2008). Alcuni studi hanno valutato l'espressione e l'attività delle DNMTs in cellule di neuroblastoma umane e in modelli murini di MA mostrando come condizioni ambientali quali restrizione da vitamine del gruppo B, condizioni di ipossia ed esposizione a metalli pesanti, come il piombo, possono portare a cambiamenti dell'espressione e dell'attività delle DNMTs (Fuso et al., 2011; Bihagi e Zawia et al., 2012; Liu et al., 2015). Tali evidenze suggeriscono che la modulazione dell'attività di questi enzimi potrebbe contribuire ai cambiamenti globali della metilazione osservati in esperimenti *in vitro*, in modelli murini di MA e in sangue prelevato da pazienti affetti da tale patologia (Fuso et al., 2011; Wang et al., 2014b).

Infine, tra i geni considerati nello studio 1, *MTHFR* è l'unico che ha mostrato una accentuata variabilità inter-individuale dei livelli di metilazione nella popolazione oggetto dello studio (range 5-75%), livelli di metilazione ottenuti mediante la tecnica MS-HRM e confermati con il pirosequenziamento. Questa variabilità è confermata da altri lavori in letteratura sia in tessuto cerebrale che in tessuto tumorale polmonare e sangue periferico (Wang et al., 2008; Vaissière et al., 2009). Alcuni lavori hanno inoltre mostrato che la metilazione del promotore di *MTHFR* influenza l'espressione del gene stesso (Wang et al., 2007; Vaissiere et al., 2009) e può inoltre essere associata a diverse malattie come alcune patologie tumorali, pre-eclampsia e infertilità maschile (Khazamipour et al., 2009; Wu et al., 2010; Ge et al., 2015) sottolineando così un possibile ruolo delle alterazioni dei livelli di metilazione di tale gene nello sviluppo di diverse patologie. Interessanti sono inoltre la correlazione negativa tra la metilazione di *MTHFR* e i livelli di Hcy e la correlazione positiva con i livelli di folati osservati in questo lavoro. In un recente studio condotto in pazienti con ictus è stata osservata una correlazione simile tra i livelli di folati e la metilazione di *MTHFR* nel sangue (Wei et al., 2015), ed uno studio precedente ha mostrato che trattamenti con alte dosi di Hcy inducevano demetilazione del gene *MTHFR* ed una sua incrementata espressione in cellule muscolari lisce (Wang et al., 2007). In letteratura non si trovano altri studi che prendono in considerazione il contributo dell'Hcy e dei folati sui livelli di metilazione di *MTHFR* nella MA. Tuttavia tale correlazione è stata studiata in altre patologie come il cancro evidenziando una correlazione dei biomarker biochimici di folati e Hcy con i livelli di metilazione di tale gene (Vineis et al., 2011).

Inoltre in un sottogruppo di pazienti per i quali erano disponibili per ogni paziente i valori completi di Hcy, folati, vitamina B12 e la metilazione dei sei geni analizzati, è stata applicata un particolare tipo di ANN, la Auto-CM che ci ha permesso di mostrare

graficamente le connessioni tra le variabili studiate. La Auto-CM ha mostrato che bassi livelli di vitamina B12 erano direttamente connessi alla condizione di avere la MA, così come a bassi livelli di folati e ad alti livelli di Hcy. Al contrario bassi livelli di Hcy erano connessi ad alti livelli folati e di vitamina B12, a loro volta direttamente correlati ai controlli. Risultati simili sono già stati ottenuti con l'Auto-CM in due precedenti studi (Gallucci et al., 2014; Coppedè et al., 2013) e confermano i risultati di una recente meta-analisi di un gran numero di risultati di letteratura che nel complesso suggerisce che ridotti folati e alti livelli di Hcy sono fattori di rischio per la MA (Shen e Ji, 2015). Inoltre i risultati ottenuti con le ANN confermano osservazioni fatte in precedenti lavori condotti *in vitro* e in animali modello che suggerivano uno stretto rapporto tra i folati e le vitamine del gruppo B e i livelli di metilazione dei geni coinvolti nella produzione del peptide  $\beta$ -amiloide, come *PSENI* e *BACE1* (Fuso et al., 2005; Fuso et al., 2011; Li et al., 2015a; Li et al., 2015b). Infatti la riduzione di folati e vitamina B12 in colture cellulari di neuroblastoma era legata a demetilazione della *PSENI*, incrementati livelli delle proteine PSEN1 e BACE1, e aumentata produzione di peptide A $\beta$  (Fuso et al., 2005). Risultati simili sono stati osservati nelle cellule cerebrali di topi alimentati con una dieta povera di folati, vitamina B12 e vitamina B6 (Fuso et al., 2008).

L'analisi con le reti neuronali ha anche correlato bassi livelli di Hcy ad alta metilazione dei geni richiesti per le reazioni di metilazione del DNA (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *MTHFR*), mentre bassi folati ed età avanzata erano correlati ad una loro bassa metilazione. Questi risultati confermano precedenti studi condotti in colture cellulari i quali hanno rivelato che l'acido folico può avere un impatto sui livelli di metilazione del DNA attraverso la modulazione di proteine richieste per le reazioni di metilazione del DNA (Fuso et al., 2011; Li et al., 2015a; Li et al., 2015b).

Nel loro insieme i dati emersi dallo studio 1 indicano che condizioni di riduzione dei folati ed aumentati livelli di Hcy, situazione spesso osservata nei pazienti con MA, potrebbero contribuire a modificazioni dei livelli di metilazione del DNA che sono stati spesso osservati nel sangue e nel cervello di questi individui (Millan, 2014).

Nel secondo studio di questo lavoro di tesi è stato analizzato lo stato di metilazione di numerosi geni codificanti per proteine coinvolte nella riparazione del DNA, il cui deficit è stato associato da numerosi studi alla MA (Coppedè e Migliore, 2015). Sia l'analisi mediante gli array di metilazione che la MS-HRM hanno evidenziato che i geni analizzati sono altamente ipometilati nel DNA estratto da cellule del sangue periferico di individui affetti da MA e nei controlli sani e nessuna differenza è stata osservata tra i due gruppi. Il

fatto che due tecniche indipendenti, una richiedente il trattamento con sodio bisolfito e l'altra no, abbiamo fornito il medesimo risultato rappresenta una valida conferma della bontà del risultato ottenuto. Il gene che ha mostrato la differenza maggiore tra gli individui con MA e i controlli è stato *BRCA1* ( $p = 0.013$ ), la cui significatività non raggiunge comunque quella stabilita a priori in seguito alla correzione di Bonferroni ( $p = 0,008$ ). Il gene *BRCA1* codifica per una proteina coinvolta nella trascrizione e nella riparazione del danno al DNA a doppio filamento e rappresenta il maggiore fattore di rischio genetico per il cancro al seno (Zhang e Long, 2015). Incrementati livelli di danno a doppio filamento sono stati riportati nella MA (Adamec et al., 1999), e un recente studio ha evidenziato che vi è una diminuzione di *BRCA1* nei cervelli di pazienti con MA (Suberbielle et al., 2015). Nel presente lavoro di tesi *BRCA1* è risultato essere ipometilato sia con l'array di metilazione che con la MS-HRM. Un simile pattern di metilazione è stato osservato per altri geni coinvolti nella riparazione del danno al DNA a doppio filamento, inclusi *BRCA2*, *FEN1*, *MRE11A*, *RAD50* e *RAD51*. Di questi è stato riportato che il complesso Mre11 è ridotto nella corteccia di individui con MA rispetto ai controlli neurologicamente sani (Jacobsen et al., 2004). Tra gli altri geni analizzati nello studio 2 di particolare interesse per la MA è *OGG1* che codifica per la 8-oxoguanosina DNA glicosidasi, la cui funzione è quella di rimuovere le guanine ossidate (8-oxo-G) dal DNA nel meccanismo BER. La 8-oxo-G rappresenta la più frequente lesione ossidativa osservata nel nDNA e mtDNA in cervelli post-mortem, così come nel CSF e nei linfociti del sangue di pazienti con MA e MCI (Coppedè e Migliore, 2015; Mecocci et al., 1994). Molti ricercatori hanno riportato diminuita attività di *OGG1* in regioni cerebrali di pazienti con MA e MCI (Iida et al., 2002; Lovell et al., 2007; Shao et al., 2008; Weissman et al., 2007). Inoltre una diminuita espressione di *OGG1* è stata osservata nei linfociti di pazienti con MA durante la progressione dagli stadi più precoci a quelli più tardivi della malattia, rare mutazioni di *OGG1* sono state trovate in campioni cerebrali così come comuni polimorfismi di *OGG1* sono stati investigati come potenziali fattori di rischio per la MA (Coppedè et al. 2007b; Dorzewska et al., 2009; Jacob et al., 2013; Mao et al., 2007). Inoltre uno studio condotto in cellule gliali murine ha rivelato che l'inibizione dell'attività delle DNMT mediante la somministrazione di SAH induce modificazioni nella metilazione di *OGG1* ed incrementa il danno ossidativo (Lin et al., 2011). Altre proteine del BER sono risultate essere alterate nei cervelli di pazienti con MA o MCI e in cellule in coltura, incluse l'APE1, la quale è stata trovata sovraespressa in regioni cerebrali danneggiate e in cellule del sangue, e sia i livelli della Pol $\beta$  che dell'uracil DNA glicosidasi (UDG) risultano ridotti in campioni

cerebrali (Maynard et al., 2015; Tan et al., 1998; Weissman et al., 2007). Inoltre polimorfismi del gene *XRCC1*, codificanti per la proteina XRCC1 (X-ray repair cross complementing protein 1) sono stati associati ad un incrementato rischio di sviluppare la MA (Dogru-Abbasoglu et al., 2007; Kwiatkowski et al., 2015).

Alcuni polimorfismi della *PARP-1* sono stati associati all'insorgenza della MA (Kwiatkowski et al., 2015; Liu et al., 2010). In letteratura non sono riportati lavori atti a valutare la metilazione di *PARP-1* in individui affetti dalla MA ed i dati ottenuti per questo gene, sia con gli array di metilazione che con la MS-HRM mostrano demetilazione del gene.

Nel presente lavoro è stato anche deciso di studiare il gene *MGMT*, in quanto un recente lavoro ha riportato che i livelli della proteina MGMT nel CSF di individui con MA sono ridotti rispetto ai controlli (Olàh et al., 2015). Anche per questo gene è stata osservata demetilazione sia nel sangue dei pazienti con MA che dei controlli. Il gene *MLH1* codifica per una proteina coinvolta nel MMR ed è silenziato nel 15-20% dei casi sporadici di cancro al colon (Coppedè et al., 2014; Li et al., 2013). Sia l'array che la MS-HRM hanno mostrato che il gene è demetilato sia negli individui MA che nei controlli. Analogamente anche altri geni coinvolti nel MMR, come *MLH3*, *MSH2*, *PMS2*, *POLD3* sono risultati essere ipometilati.

Al momento non sono disponibili in letteratura studi in cui sia stato indagato il potenziale ruolo dell'epigenetica sui meccanismi di riparazione al DNA. Tuttavia è stato proposto un modello nel 2009, in seguito a studi condotti su primati non umani e roditori, che ha messo in relazione l'esposizione ad inquinanti neurotossici nelle prime fasi dello sviluppo e l'induzione di modificazioni epigenetiche che potrebbero risultare in deficit nella riparazione di DNA ossidato in età avanzata in grado di determinare lo sviluppo di malattie neurodegenerative (Zawia et al., 2009). Questo modello mostra come l'esposizione al piombo durante le prime fasi dello sviluppo possa avere un impatto sull'espressione di geni chiave della MA, sul danno al DNA e sui fenomeni neurodegenerativi in senescenza. È stato infatti osservato che l'esposizione al piombo induce inibizione della metilazione delle isole CpG contenute nella regione promotrice di geni della coinvolti nella MA portando ad una sovraespressione dei geni stessi, durante la senescenza, con conseguente maggior produzione del peptide  $\beta$ -amiloide. Il peptide  $\beta$ -amiloide da un lato va ad aumentare la formazione delle placche senili, dall'altro invece induce la formazione di radicali liberi. I radicali liberi di conseguenza possono causare un danno ossidativo a carico della guanina contenuta nelle isole CpG portando alla formazione della 8Oxo-dG. Le modificazioni

epigenetiche subite da questi geni durante lo sviluppo renderebbero i neuroni più sensibili al danno cellulare durante la senescenza. Questo perché a livello delle isole CpG nelle regioni promotrici, la citosina metilata adiacente a una guanina ossidata potrebbe impedire agli enzimi di riparazione del danno ossidativo di svolgere la loro funzione probabilmente a causa dell'ingombro sterico del gruppo metilico aggiunto alla citosina (Zawia et al., 2009).

Lo studio del ruolo della metilazione del DNA nella MA ha finora dato risultati contrastanti ed è molto difficile poter definire il contributo di questo meccanismo epigenetico nella MA (Bennett et al., 2015; Sanchez-Mut e Gräff, 2015). Sebbene modificazioni della metilazione globale del DNA siano stati osservati in regioni cerebrali di cervelli post-mortem di individui con MA (Mastroeni et al., 2009), nessuno dei geni maggiormente implicati nella MA (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) è emerso come chiaro biomarcatore della malattia in grandi studi caso-controllo (De Jager et al., 2014; Lunnon et al., 2014; Yu et al., 2015). Differenze di metilazione sono state osservate in diversi geni, come ad esempio *ANK1*, *SORBS3*, *SORL1*, *ABCA7*, *BIN1* e *TMEM59*, tra i cervelli di MA e controlli (De Jager et al., 2014; Lunnon et al., 2014; Yu et al., 2015), ma è ancora altamente dibattuto se i cambiamenti osservati siano coinvolti nello sviluppo della malattia o siano piuttosto una conseguenza del processo neurodegenerativo.

Uno degli ostacoli maggiori nella ricerca di marcatori epigenetici in malattie neurodegenerative come la MA è la difficoltà nel reperire il tessuto cerebrale. Infatti i marcatori epigenetici sono prevalentemente tessuto specifici e la metilazione osservata a livello periferico potrebbe non riflettere quella presente a livello cerebrale (Silva et al., 2014). Tuttavia un importante vantaggio nell'utilizzo di tessuti periferici, di più agevole reperibilità, nello studio di malattie del SNC è quello di poter studiare gli eventi molecolari associati alla MA in differenti stadi della malattia, mentre lo studio sui cervelli post-mortem fornisce solo una istantanea del risultato dei processi patogenetici della MA, i quali non riflettono necessariamente i meccanismi che portano alla malattia. Studi condotti sul sangue periferico di pazienti diagnosticati con uno stadio precoce di MA, come gli MCI o con una forma preclinica di MA, sono scarsi e quelli condotti su pazienti con MA hanno fornito dati non chiarificatori (Bennett et al., 2015; Sanchez-Mut e Gräff, 2015). Sebbene differenze nella metilazione globale del DNA estratto da sangue di pazienti MA e controlli siano state riportate (Bollati et al., 2011), i principali geni della MA sono sempre risultati essere altamente demetilati sia nei pazienti MA che nei controlli (Carboni et al., 2015; Piaceri et al., 2015). Molti altri loci genici sono stati suggeriti come potenziali biomarcatori



periferici di metilazione, ma le osservazioni non sono state replicate (Bennet et al., 2015; Sanchez-Mut e Gräff, 2015), così che la ricerca di biomarcatori di metilazione periferici per la MA è ancora in atto. Risultati interessanti sono emersi da uno studio mediante approccio epigenome-wide eseguito su tessuto cerebrale post-mortem e sangue periferico pre-mortem degli stessi individui (Lunnon et al., 2014). Questi autori hanno osservato un gran numero di loci differenzialmente metilati nel sangue dei pazienti con MA, molti dei quali in prossimità di geni implicati nella patogenesi della MA. Sebbene questi siti differenzialmente metilati erano diversi da quelli identificati nei cervelli post-mortem, erano comunque associati a geni noti per essere differenzialmente espressi nel sangue periferico di pazienti con MA e MCI (Lunnon et al., 2013; Lunnon et al., 2014).

In un recente lavoro mediante un approccio epigenome-wide sono stati analizzati i livelli di metilazione del DNA estratto da linfociti CD4+ del sangue periferico e da tessuto cerebrale post-mortem di 41 individui anziani, dei quali più della metà è stato diagnosticato come affetto da MA all'esame autoptico (Yu et al., 2016). Da questo lavoro è emerso che il 46,8% dei 420,131 siti CpG analizzati mostravano una metilazione differente tra i due tessuti e nessuna correlazione con la patologia è stata osservata nel tessuto periferico. Gli autori hanno quindi concluso che biomarcatori epigenetici nelle cellule periferiche CD4+ non riflettono quelli presenti a livello cerebrale e hanno suggerito che ulteriori studi debbano essere eseguiti per meglio comprendere l'utilità dell'uso di tessuti periferici per ricercare marcatori di malattie del SNC. Tra i maggiori limiti di questo lavoro, si ritrova l'uso di un solo sottotipo di cellule presenti nel sangue periferico, e il fatto che sia stato utilizzato tessuto cerebrale post-mortem, il quale potrebbe non riflettere l'assetto epigenetico del tessuto cerebrale di una persona ancora in vita. Ci sono infatti evidenze che diversi fattori, come il pH, l'intervallo che intercorre tra la morte cerebrale e il recupero del DNA e i metodi di conservazione dei campioni, potrebbero avere degli effetti importanti sulla metilazione del DNA (Pidsley et al., 2016). In questo senso in un altro recente lavoro è stata analizzata mediante un approccio epigenome-wide, la metilazione del DNA estratto da biopsie del lobo temporale e da cellule del sangue periferico di 12 pazienti affetti da epilessia (Walton et al., 2016). Il maggior punto di forza di questo lavoro è stato quello di poter analizzare la metilazione del DNA estratto da cervelli di pazienti viventi e da DNA estratto dal loro stesso tessuto periferico. Gli autori hanno osservato che solo il 7.9 % dei siti CpG analizzati mostrava un'alta correlazione nei livelli di metilazione tra i due tessuti, una proporzione, che sebbene piccola, era comunque maggiore di quella prevista. Quindi, sebbene la metilazione del DNA a livello del tessuto periferico non rifletta completamente

la metilazione a livello cerebrale, possono essere comunque identificati dei marker specifici la cui metilazione periferica coincide con quella del tessuto cerebrale o che correli con i meccanismi fisiopatologici della MA. Ad esempio in uno studio di quest'anno è stato osservato che la regione genica *NCAPH2/LMF2* è ipometilata in pazienti con MA e MCI rispetto ai controlli neurologicamente sani (Kobayashi et al., 2016). Lo stesso gruppo ha in seguito osservato che l'atrofia ippocampale tipica dei pazienti con MA è correlata con i livelli di metilazione di *NCAPH2/LMF2* (Shinagawa et al., 2016). Questi geni sono associati alla mitosi e alla maturazione e il trasporto delle lipoproteine e sarebbero in grado di indurre apoptosi delle cellule neuronali.

Concludendo, in questo lavoro di tesi sono state ricercate differenze nella metilazione di alcuni geni critici nel sangue periferico di pazienti affetti dalla MA e in controlli neurologicamente sani, e i risultati suggeriscono che per i geni indagati non vi sia differenza tra i pazienti con MA e i controlli neurologicamente sani. Non è comunque possibile escludere che altri geni non considerati in questo studio potrebbero mostrare differenze di metilazione a livello del sangue periferico di pazienti con MA. Inoltre altri meccanismi epigenetici, come la modificazione delle code istoniche o la regolazione dell'espressione genica da parte degli RNA non codificanti, potrebbero essere utilizzati come biomarcatori di malattia. I risultati ottenuti con le analisi delle ANN hanno evidenziato interessanti correlazioni tra i valori ematici di metaboliti del ciclo dei folati e lo stato di metilazione di geni implicati nella MA, evidenze che fino ad ora erano emerse solo da studi *in vitro* e su modelli animali e che per la prima volta vengono osservate anche in studi sull'uomo.

Nel loro insieme questi studi, che sono stati recentemente pubblicati (Tannorella et al., 2015; Coppedè et al., 2016; Grossi et al., 2016), rivelano uno stretto legame tra il metabolismo dei folati e la metilazione di geni critici per la MA che meritano di essere ulteriormente investigati.

## 6. Bibliografia

- Adamec, E., Vonsattel, J.P., Nixon, R.A. (1999). DNA strand breaks in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 849, 67–77.
- Andreassi M.G., Botto N., Cocci F., Battaglia D., Antonioli E., Masetti S., Manfredi S., Colombo M.G., Biagini A., Clerico A. (2003). Methylene tetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease, *Hum. Genet.* 112 171–177.
- Arendt T., Brückner M.K., Mosch B., Lösche A. (2010). Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 177 15–20.
- Arispe N, Pollard HB, Rojas E. (1993). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90(22):10573-7.
- Ashford J et al. (2007). Should older adults be screened for dementia? It is important to screen for evidence of dementia! *Alzheimer's and Dementia*; 2: 75-80.
- Bailey LB, Gregory JF 3rd., (1999). Folate metabolism and requirements. *J Nutr.* Apr;129(4):779-82.
- Bakulski KM, Dolinoy DC, Sartor MA, Paulson HL, Konen JR, Lieberman AP, Albin RL, Hu H, Rozek LS. (2012). Genomewide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *J Alzheimers Dis*; 29: 1– 28.
- Basha M.R., Wei W., Bakheet S.A., Benitez N., Siddiqi H.K., Ge Y.W., Lahiri D.K., Zawia N.H. (2005). The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain, *J. Neurosci.* 25 823–829.
- Beetstra S., Thomas P., Salisbury C., Turner J., Fenech M. (2005) Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei, *Mutat. Res.* 578 317–326.
- Beffert U, Poirier J. (1998). ApoE associated with lipid has a reduced capacity to inhibit beta-amyloid fibril formation. *Neuroreport.*; 9(14):3321-3.
- Beharry C., Cohen L.S., Di J., Ibrahim K., Briffa-Mirabella S., Alonso Adel C., (2014). Tau-induced neurodegeneration: mechanisms and targets, *Neurosci. Bull.* 30346–358.
- Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, Aggarwal NT, Arnold SE, Cochran EJ, Berry-Kravis E, Bienias JL. (2003). Apolipoprotein E epsilon4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology.*;60(2):246-52.
- Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, Beckett LA, Aggarwal NT, Barnes LL, Fox JH, Bach J (2002). Natural history of mild cognitive impairment in older persons. *Neurology* 59:198–205.
- Bennett, D.A., Yu, L., Yang, J., Srivastava, G.P., Aubin, C., De Jager, P.L. (2015). Epigenomics of Alzheimer's disease. *Transl. Res.* 165, 200–220.
- Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horré K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem.*; 96(3):732-42.
- Bettens K, Slegers K, Van Broeckhoven C. (2010). Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet.* Apr 15;19(R1):R4-R11. doi: 10.1093/hmg/ddq142.
- Bharathi, Vasudevaraju P, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KS. (2008). Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J Med Res.* 128(4):545-56.
- Bignamini M. e Stefanini M. (2004). I sistemi di riparazione, capitolo del libro *Mutagenesi Ambientale*, a cura di Lucia Migliore, Ed. Zanichelli
- Bihaqi SW, Huang H, Wu J, Zawia NH. (2011). Infant exposure to lead (Pb) and epigenetic modifications in the aging primate brain: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*;27(4):819-33.
- Bihaqi SW, Zawia NH. (2012). Alzheimer's disease biomarkers and epigenetic intermediates following exposure to pb in vitro. *Curr Alzheimer Res.* Jun 1;9(5):555-62.
- Bird AP. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321(6067):209–213.
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Björkhem I (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett.*; 314(1-2):45-8.

- Bolin C.M., Basha R., Cox D., Zawia N.H., Maloney B., Lahiri D.K., Cardozo-Pelaez F. (2006). Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain, *FASEB J.* 20 788–790.
- Bollati V, Galimberti D, Pergoli L, Dalla Valle E, Barretta F, Cortini F, Scarpini E, Bertazzi PA, Baccarelli A. (2011). DNA methylation in repetitive elements and Alzheimer disease. *Brain Behav Immun.* Epub ahead of print.
- Botezatu A, Socolov D, Iancu IV, Huica I, Plesa A, Ungureanu C, Anton G. (2013). Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. *J Cell Mol Med.* Apr;17(4):543-9.
- Botezatu A, Socolov R, Socolov D, Iancu IV, Anton G. (2014). Methylation pattern of methylene tetrahydrofolate reductase and small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N promoters in oligoasthenospermia: a case-control study. *Reprod Biomed Online*; 28(2): 225-31.
- Botto, L. D., and Yang, Q., (2000). 5,10 Methylene tetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151, 862– 877.
- Bradley WG, Polinsky RJ, Pendlebury WW, Jones SK, Nee LE, Bartlett JD, et al. (1989). DNA repair deficiency for alkylation damage in cells from Alzheimer's disease patients. *Prog Clin Biol Res* 317: 715-32.
- Bradley-Whitman M.A., Timmons M.D., Beckett T.L., Murphy M.P., Lynn B.C., Lovell M.A. (2014). Nucleic acid oxidation: an early feature of Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* 128 294–304.
- Brickell KL, Leverenz JB, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Schellenberg GD, Nochlin D, Lampe TH, Holm IE, Van Deerlin V, Yuan W, Bird TD (2007). Clinicopathological concordance and discordance in three monozygotic twin pairs with familial Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 78(10):1050-55.
- Buscema M, Grossi E, Snowdon D, Antuono P (2008) Auto-Contractive Maps: an artificial adaptive system for data mining. An application to Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res* 5, 481- 98.
- Bush AI, Pettingell WH, Multhaup G, d Paradis M, Vonsattel JP, Gusella JF, Beyreuther K, Masters CL, Tanzi RE. (1994). Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science.* 265(5177):1464-7.
- Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med.*; 7(12):548-54.
- Butterfield DA, Lauderback CM. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* ;32(11):1050-60.
- Campisi J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.*;75:685–705
- Candore G, Bulati M, Caruso C, Castiglia L, Colonna-Romano G, Di Bona D, Duro G, Lio D, Matranga D, Pellicano M, et al. (2010). Inflammation, cytokines, immune response, apolipoprotein E, cholesterol, and oxidative stress in Alzheimer disease: therapeutic implications. *Rejuvenation Res.*;13:301–13.
- Canugovi C., Shamanna R.A., Croteau D.L., Bohr V.A. (2014). Base excision DNA repair levels in mitochondrial lysates of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 35:1293–1300.
- Carboni L, Lattanzio F, Candeletti S, Porcellini E, Raschi E, Licastro F, Romualdi P., (2015). Peripheral leukocyte expression of the potential biomarker proteins Bdnf, Sirt1, and Psen1 is not regulated by promoter methylation in Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* Sep 25;605:44-8.
- Cedazo-Mínguez A, Cowburn RF. (2001). Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J Cell Mol Med.*; 5(3):254-66.
- Chen KL, Wang SS, Yang YY, Yuan RY, Chen RM, Hu CJ (2009). The epigenetic effects of amyloid-beta (1–40) on global DNA and neprilysin genes in murine cerebral endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 378(1) 57–61.
- Chetelat G, Villemagne VL, Bourgeat P, Pike KE, Jones G, Ames D, et al. (2010). Relationship between atrophy and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease. *Ann Neurol*;67:317–24.
- Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, et al. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*; 34(9): 2091-9.

- Colonna, M. (2003). TREMs in the immune system and beyond. *Nat. Rev.Immunol.* 3, 445–453.
- Condliffe D, Wong A, Troakes C, Proitsi P, Patel Y, Chouliaras L, et al. (2014). Cross-region reduction in 5-hydroxymethylcytosine in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging*; 35(8): 1850-4.
- Coppedè F. (2010). One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: focus on epi-genetics, *Curr. Genomics* 11 246–260.
- Coppedè F. (2012). Advances in the Genetics and Epigenetics of Neurodegenerative Diseases, *Epigenetics of Neurodegenerative Diseases*, 3–31.
- Coppedè F. (2015). The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Front Genet.* 25;6:223.
- Coppedè F, Grossi E, Buscema M, Migliore L (2013) Application of artificial neural networks to investigate one-carbon metabolism in Alzheimer's disease and healthy matched individuals. *PLoS One* 8, e74012
- Coppedè F, Mancuso M, Lo Gerfo A, Manca ML, Petrozzi L, Migliore L, et al. (2007b). A Ser326Cys polymorphism in the DNA repair gene hOGG1 is not associated with sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 414(3): 282-5.
- Coppedè F, Migliore L. (2015). DNA damage in neurodegenerative diseases. *Mutat Res.*776:84-97.
- Coppedè F, Migliore L. (2010b). DNA repair in premature aging disorders and neurodegeneration. *Curr Aging Sci.*;3(1):3-19.
- Coppedè F., Migliore L., (2010a). Evidence linking genetics, environment, and epigenetics to impaired DNA repair in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 20 953–966.
- Coppedè F., Bosco P., Lorenzoni V., Denaro M., Anello G., Antonucci I., Barone C., Stuppia L., Romano C., Migliore L. (2014). The MTRR 66A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome in Caucasian women: a case–control study and a meta-analysis, *Mol. Biol. Rep.* 5571–5583.
- Coppedè F., Colognato R., Bonelli A., Astrea G., Bargagna S., Siciliano G., Migliore L. (2007c). Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children, *Am. J. Med.Genet. A* 143A 2006–2015.
- Coppedè F., Lorenzoni V., Migliore L. (2013). The reduced folate carrier (RFC-1) 80A>G polymorphism and maternal risk of having a child with Down syndrome: a meta-analysis, *Nutrients* 5 2551–2563.
- Coppedè F., Mancuso M., Lo Gerfo A., Manca M.L., Petrozzi L., Migliore L., Siciliano G., Murri L. (2007a) A Ser326Cys polymorphism in the DNA repair gene hOGG1 is not associated with sporadic Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 414 282–285.
- Coppedè, F., Migheli, F., Lopomo, A., Failli, A., Legitimo, A., Consolini, R., Fontanini, G., Sensi, E., Servadio, A., Seccia, M., Zocco, G., Chiarugi, M., Spisni, R., Migliore, L., (2014). Gene promoter methylation in colorectal cancer and healthy adjacent mucosa specimens: correlation with physiological and pathological characteristics, and with biomarkers of one-carbon metabolism. *Epigenetics* 9, 621–633.
- Coppedè F, Tannorella P, Stoccoro A, Chico L, Siciliano G, Bonuccelli U, Migliore L. (2016). Methylation analysis of DNA repair genes in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* Apr 11. pii: S0047-6374(16)30045-8.
- Coppieters N, Dieriks BV, Lill C, Faull RL, Curtis MA, Dragunow M. (2014). Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiol Aging*; 35(6): 1334-44.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* Jun;7(2):180-4.
- Corral-Debrinski M., Horton T., Lott M.T., Shoffner J.M., McKee A.C., Beal M.F., Graham B.H., Wallace D.C. (1994). Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains, *Genomics* 23 471–476.
- Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, et al. (2014). Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*; 505: 550–54.

D'Addario C, Di Francesco A, Arosio B, Gussago C, Dell'Osso B, Bari M, Galimberti D, Scarpini E, Altamura AC, Mari D, Maccarrone M. (2012). Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease. *PLoS One*.7(6):e39186.

Davignon J, Gregg RE, Sing CF. (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*.; 8(1):1-21.

Davydov V, Hansen LA and Shackelford DA. (2003). Is DNA repair compromised in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 24: 953-68.

De Jager CA., (2014). Critical levels of brain atrophy associated with homocysteine and cognitive decline. *Neurobiol Aging*; 35 Suppl 2: S35-9.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*.; 391(6665):387-90.

Dhillon V., Thomas P., Fenech M. (2009). Effect of common polymorphisms in folateuptake and metabolism genes on frequency of micronucleated lymphocytes in a South Australian cohort, *Mutat. Res.* 665 1–6.

Di Fede G., Catania M., Morbin M., Rossi G., Suardi S., Mazzoleni G., Merlin M., Giovagnoli A.R. et al., (2009). A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science*, Vol. 323, no. 5920, pp. 1473-7.

Di Francesco A, Arosio B, Falconi A, Micioni Di Bonaventura MV, Karimi M, Mari D, Casati M, Maccarrone M, D'Addario C. (2015). Global changes in DNA methylation in Alzheimer's disease peripheral blood mononuclear cells. *Brain Behav Immun.* Mar;45:139-44.

Dogru-Abbasoglu, S., Aykac-Toker, G., Hanagasi, H.A., Gurvit, H., Emre, M., Uysal, M. (2007). The Arg194Trp polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and the risk for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.* 28, 31–34.

Dorszewska J, Kempisty B, Jaroszewska-Kolecka J, Rózycka A, Florczak J, Lianeri M, Jagodziński PP, Kozubski W. (2009). Expression and polymorphisms of gene 8-oxoguanine glycosylase 1 and the level of oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* Nov;28(11):579-88.

Dubois B, et al. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* Jun;13(6):614-29. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70090-0.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* Nov;9(11):1118-27.

Dufouil C, Richard F, Fievet N, Dartigues JF, Ritchie K, Tzourio C, Amouyel P, Alperovitch A. (2005). APOE genotype, cholesterol level, lipid-lowering treatment, and dementia: the Three-City Study. *Neurology*; 64(9): 1531–1538.

Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schüssel K, Müller WE. (2003). Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 66(8):1627-34.

Eden A., F.Gaudet, A.Waghmare, R.Jaenisch, (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*; 300(5618):455.

Ferri E, Arosio B, D'Addario C, Galimberti D, Gussago C, Pucci M, Casati M, Fenoglio C, Abbate C, Rossi PD, Scarpini E, Maccarrone M, Mari D. (2016). Gene promoter methylation and expression of Pin1 differ between patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* Mar 15;362:283-6.

Fischer, A., (2014). Epigenetic memory: the Lamarckian brain: *Embo Journal*, v. 33, p. 945-967.

Fossati P, Harvey PO, Le Bastard G, Ergis AM, Jouvent R, Allilaire JF. (2004). Verbal memory performance of patients with a first depressive episode and patients with unipolar and bipolar recurrent depression. *J Psychiatr Res*; 38: 137–44.

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10604–10609.

- Frisoni GB, Prestia A, Zanetti O, Galluzzi S, Romano M, Cotelli M, Gennarelli M, Binetti G, Bocchio L, Paghera B, Amicucci G, Bonetti M, Benussi L, Ghidoni R, Geroldi C. (2009). Markers Of Alzheimer's disease in a population attending a memory clinic. *Alzheimers Dement.*; 5(4):307-17.
- Frosst, P., H. J. Blom, R. Milos, P. Goyette, C. A. Sheppard, R. G. Matthews, G. J. H. Boers, M. d. Heijer, L. A. J. Kluijtmans, L. P. v. d. Heuve, and R. Rozen, (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase: *Nature Genetics*, v. 10, p. 111-113.
- Furuta A, Iida T, Nakabeppu Y and Iwaki T. (2001). Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12: 2895-9.
- Furuya TK, Silva PN, Payao SL, Bertolucci PH, Rasmussen LT, De Labio RW, et al. (2012). Analysis of SNAP25 mRNA expression and promoter DNA methylation in brain areas of Alzheimer's Disease patients. *Neuroscience*; 220: 41-6.
- Fuso A, Nicolìa V, Cavallaro RA, Ricceri L, D'Anselmi F, Coluccia P, Calamandrei G, Scarpa S (2008). B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances PS1 and BACE expression and amyloid-beta deposition in mice. *Mol Cell Neurosci* 37, 731-746.
- Fuso A, Nicolìa V, Cavallaro RA, Scarpa S (2011). DNA methylase and demethylase activities are modulated by one-carbon metabolism in Alzheimer's disease models. *J Nutr Biochem* 22, 242-251.
- Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S (2005). Sadenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* 28,195-204.
- Fuso A., Nicolìa V., Ricceri L., Cavallaro R.A., Isopi E., Mangia F., Fiorenza M.T., Scarpa S., (2012). S-adenosylmethionine reduces the progress of the Alzheimer-like features induced by B-vitamin deficiency in mice, *Neurobiol. Aging* 33,1482.e1–1482.e16.
- Gabbita S.P., Lovell M.A., Markesbery W.R., (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* 71 2034–2040.
- Gackowski D., Rozalski R., Siomek A., Dziaman T., Nicpon K., Klimarczyk M., Araszkiwicz A., Olinski R., (2008). Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia, *J. Neurol. Sci.* 266 57–62.
- Galli C, Piccini A, Ciotti MT, Castellani L, Calissano P, Zaccheo D, Tabaton M (1998). Increased amyloidogenic secretion in cerebellar granule cells undergoing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;95(3):1247-52.
- Gallucci M, Zanardo A, Bendini M, Di Paola F, Boldrini P, Grossi E (2014) Serum folate,
- Gatz, M., Fratiglioni, L., Johansson, B., Berg, S., Mortimer, J.A., Reynolds, C.A., Fiske, A., Pedersen, N.L., (2005). Complete ascertainment of dementia in the Swedish Twin Registry: the HARMONY study. *Neurobiol. Aging* 26, 439–447.
- Ge J, Wang J1, Zhang F1, Diao B, Song ZF1, Shan LL, Wang W1, Cao HJ, Li XQ, (2015). Correlation between MTHFR gene methylation and pre-eclampsia, and its clinical significance. *Genet Mol Res.* Jul 17;14(3):8021-8.
- Ghattas M, El-Shaarawy F, Mesbah N, Abo-Elmatty D. (2014). DNA methylation status of the methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter in peripheral blood of end-stage renal disease patients. *Mol Biol Rep*; 41(2): 683-8.
- Goll M.G., Bestor T.H.; (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases, *Annu.Rev. Biochem.*; 74:481–514.
- Goyette, P., Christensen, B., Rosenblatt, D.S., and Rozen, R. (1996). Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and description of five novel mutations in MTHFR. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 1268–1275.
- Griñán-Ferré C, Sarroca S, Ivanova A, Puigoriol-Illamola D, Aguado F, Camins A, Sanfeliu C, Pallàs M. (2016). Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging (Albany NY)*. Apr;8(4):664-84.
- Grossi E, Stoccoro A, Tannorella P, Migliore L, Coppedè F. (2016). Artificial Neural Networks Link One-Carbon Metabolism to Gene-Promoter Methylation in Alzheimer's Disease.

- Guerreiro , Gustafson DR, Hardy J., (2012). The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging*. 2012 Mar;33(3):437-56
- Guerreiro R, Hardy J. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*; 11: 732–37.
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. (2013a). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*; 368: 117–27.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S., Younkin, S., et al.; Alzheimer Genetic Analysis Group, (2013b). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127.
- Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem.*;283:1197–208.
- Håkansson K, Rovio S, Helkala EL, Vilksa AR, Winblad B, Soininen H, Nissinen A, Mohammed AH, Kivipelto M; (2009). Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study. *BMJ.*; 339:b2462. doi: 10.1136/bmj.b2462.
- Hardy JA, Higgins GA. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256(5054):184-5.
- Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekoni L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scarce-Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW, Huang Y. (2003). Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 100(19):10966-71.
- Harwood DG, Kalechstein A, Barker WW, Strauman S, St George-Hyslop P, Iglesias C, Loewenstein D, Duara R, (2009). The effect of alcohol and tobacco consumption, and apolipoprotein E genotype, on the age of onset in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 25(5):511-8.
- Hegde ML, Mantha AK, Hazra TK, Bhakat KK, Mitra S, Szczesny B. (2012). Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev.*;133:157–68.
- Henderson AS, Eastel S, Jorm AF, Mackinnon AJ, Korten AE, Christensen H, Croft L, Jacomb PA (1995). Apolipoprotein E allele epsilon 4, dementia, and cognitive decline in a population sample. *Lancet.*;346(8987):1387-90.
- Hernandez HG, Mahecha MF, Mejia A, Arboleda H, Forero DA. (2014). Global long interspersed nuclear element 1 DNA methylation in a colombian sample of patients with late-onset Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*;29:50–3.
- Hixson JE, Vernier DT. (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res.* Mar;31(3):545-8.
- Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB. (2001). Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem.* Jul;78(2):249-53.
- Holmes C (2002). Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry*; 180:131-4. homocysteine, brain atrophy, and auto-CM system: The Treviso Dementia (TREDDEM) study. *J Alzheimers Dis* 38,581-587
- Hou Y, Chen H, He Q, Jiang W, Luo T, Duan J, et al., (2013). Changes in methylation patterns of multiple genes from peripheral blood leucocytes of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropsychiatr*; 25(2): 66-76.
- Hyman BT. (1998). Biomarkers in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*;19(2):159-60.
- I.Y. Iourov, S.G. Vorsanova, T. Liehr, A.D. Kolotii, Y.B. Yurov. (2009). Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain. *Hum. Mol. Genet.* 18 2656–2669.
- Iida T, Furuta A, Nishioka K, Nakabeppu Y and Iwaki T. (2002). Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 103: 20-5.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Yurov Y.B., (2009). Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. *Neurobiol. Dis.* 34 212–220.



- Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K, Tamaoka A, Murayama S, Saido T, Tsuji S. (2014). Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet.* Feb 1;23(3):648-56
- Iyama T, Wilson 3rd DM. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and nondividing cells. *DNA Repair (Amst).*;12:620–36.
- Jack CR Jr, Lowe VJ, Senjem ML, Weigand SD, Kemp BJ, Shiung MM, et al. (2008). 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain*;131:665–80.
- Jacob KD, Noren Hooten N, Tadokoro T, Lohani A, Barnes J, Evans MK. (2013). Alzheimer's disease-associated polymorphisms in human OGG1 alter catalytic activity and sensitize cells to DNA damage. *Free Radic Biol Med.* Oct;63:115-25. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.010.
- Jacobsen E, Beach T, Shen Y, Li R, Chang Y. (2004). Deficiency of the Mre11 DNA repair complex in Alzheimer's disease brains. *Brain Res Mol Brain Res.*;128:1–7.
- Jin K., Peel A.L., Mao X.O., Xie L., Cottrell B.A., Henshall D.C., Greenberg D.A. (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.* 101 343–347.
- Joachim CL, Selkoe DJ. (1989). Amyloid protein in Alzheimer's disease. *J Gerontol.*; 44(4):B77-82.
- Jost E, Lin Q, Weidner CI, Wilop S, Hoffmann M, Walenda T, Schemionek M, Herrmann O, Zenke M, Brümmendorf TH, Koschmieder S, Wagner W. (2014). Epimutations mimic genomic mutations of DNMT3A in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* Jun;28(6):1227-34.
- Jurevics H, Morell P (1995). Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem.*; 64(2):895-901.
- Kadioglu E., Sardas S., Aslan S., Isik E., Esat Karakaya A., (2004). Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease, *Biomarkers*9 203–209.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*; 19-25;325(6106):733-6.
- Karch CM, Goate AM. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*; 77: 43–51.
- Katzman R (1993). Le demenze. *Trattato di neurologia Merrit*, Ed. L.P. Rowland; 111:531-536.
- Kauppinen TM and Swanson RA. (2007). The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* 145: 1267-72.
- Kaut O, Ramirez A, Pieper H, Schmitt I, Jessen F, Wüllner U. (2014). DNA methylation of the TNF- $\alpha$  promoter region in peripheral blood monocytes and the cortex of human Alzheimer's disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord.*;38(1-2):10-5.
- Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP. (1997). Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem.* Jul;69(1):273-84.
- Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhaneh M, Pujol P., (2009). MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod.*24(9):2361-4.
- Kidd PM. (2005). Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev.* 13(2):85-115.
- Kingsbury M.A., Yung Y.C., Peterson S.E., Westra J.W., Chun J. (2006). Aneuploidy in the normal and diseased brain, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 2626–2641.
- Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. (2001). Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* May 8;56(9):1143-53.
- Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N, Ohnuma T, Kasanuki K, Arai H, Yamada H, Nakayama K, Kondo K. (2016). Development of Biomarkers Based on DNA Methylation in

the NCAPH2/LMF2 Promoter Region for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLoS One*. 7;11(1):e0146449.

Krantic S, Mechawar N, Reix S and Quirion R. (2005). Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci*; 28: 670-6.

Kulkarni A and Wilson DM 3rd. (2008). The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction. *Am J Hum Genet*; 82: 539-66.

Kwiatkowski D, Czarny P, Toma M, Jurkowska N, Sliwinska A, Drzewoski J, Bachurska A, Szemraj J, Maes M, Berk M, Su KP, Galecki P, Sliwinski T. (2016). Associations between DNA Damage, DNA Base Excision Repair Gene Variability and Alzheimer's Disease Risk. *Dement Geriatr Cogn Disord*.;41(3-4):152-71. doi: 10.1159/000443953.

Kwiatkowski, D., Czarny, P., Galecki, P., Bachurska, A., Talarowska, M., Orzechowska, A., Bobinska, K., Bielecka-Kowalska, A., Pietras, T., Szemraj, J., Maes, M., Sliwinski, T., (2015). Variants of base excision repair genes MUTYH, PARP1 and XRCC1 in Alzheimer's disease risk. *Neuropsychobiology* 71, 176–186.

Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*.

Lane RM, Farlow MR (2005). Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res.*; 46(5):949-68.

Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, et al. (1995). Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol* 89: 35-41.

Lavenu I, Pasquier F, Lebert F, Pruvo JP, Petit H. (1998). Explicit memory in frontotemporal dementia: the role of medial temporal atrophy. *Dement Geriatr Cogn Disord*; 9: 99–102.

Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science.*; 248(4959):1124-6.

Li JC and Kaminskas E. (1985). Deficient repair of DNA lesions in Alzheimer's disease fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 733-38.

Li W, Jiang M, Zhao S, Liu H, Zhang X, Wilson JX, Huang G (2015b) Folic Acid Inhibits Amyloid  $\beta$ -Peptide Production through Modulating DNA Methyltransferase Activity in N2a-APP Cells. *Int J Mol Sci* 16, 25002-25013

Li W, Liu H, Yu M, Zhang X, Zhang M, Wilson JX, et al. (2015a). Folic acid administration inhibits amyloid beta-peptide accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *J Nutr Biochem*.

Li YY, Chen T, Wan Y, Xu SQ. (2012). Lead exposure in pheochromocytoma cells induces persistent changes in amyloid precursor protein gene methylation patterns. *Environ Toxicol*. Aug;27(8):495-502.

Li, X., Yao, X., Wang, Y., Hu, F., Wang, F., Jiang, L., Liu, Y., Wang, D., Sun, G., Zhao, Y. (2013). MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One* 8, e59064.

Lillenes MS, Rabano A, Støen M, et al., (2016). Altered DNA base excision repair profile in brain tissue and blood in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. May 28;9(1):61. doi: 10.1186/s13041-016-0237-z.

Lim, A.M., Candiloro, I.L., Wong, N., Collins, M., Do, H., Takano, E.A., Angel, C., Young, R.J., Corry, J., Wiesenfeld, D., Kleid, S., Sigston, E., Lyons, B., Rischin, D., Solomon, B., Dobrovic, A., (2014). Quantitative methodology is critical for assessing DNA methylation and impacts on correlation with patient outcome. *Clin. Epigenet*. 6, 22.

Lin H.C., Song T.Y., Hu M.L., (2011). S-adenosylhomocysteine enhances DNA damage through increased  $\beta$ -amyloid formation and inhibition of the DNA-repair enzyme OGG1b in microglial BV-2 cells, *Toxicology* 290 342–349.

Lin H.C., Song T.Y., Hu M.L., (2011). S-adenosylhomocysteine enhances DNA damage through increased  $\beta$ -amyloid formation and inhibition of the DNA-repair enzyme OGG1b in microglial BV-2 cells, *Toxicology* 290 342–349.

Liu H, Qiu H, Yang J, Ni J, Le W., (2015). Chronic hypoxia facilitates Alzheimer's disease through demethylation of  $\gamma$ -secretase by downregulating DNA methyltransferase 3b. *Alzheimers Dement*. pii: S1552-5260(15)00217-4.

- Liu, H.P., Lin, W.Y., Wu, B.T., Liu, S.H., Wang, W.F., Tsai, C.H., Lee, C.C., Tsai, F.J., (2010). Evaluation of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene variants in Alzheimer's disease. *J. Clin. Lab. Anal.* 24, 182–186.
- Love S, Barber R and Wilcock GK. (1999). Increased poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in Alzheimer's disease. *Brain* 122:247-53.
- Lovell M.A., Gabbita S.P., Markesbery W.R. (1999). Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF, *J. Neurochem.* 72 771–776.
- Lovell M.A., Soman S., Bradley M.A. (2011). Oxidatively modified nucleic acids in preclinical Alzheimer's disease (PCAD) brain, *Mech. Ageing Dev.* 132 443–448.
- Lovell MA, Markesbery WR. (2007). Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.*;35:7497–504.
- Lovell MA, Xie C and Markesbery WR. (2000). Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 855: 116-23.
- Lunnon K, Sattlecker M, Furney SJ, Coppola G, Simmons A, Proitsi P, et al. (2013). A blood gene expression marker of early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*; 33(3): 737-53.
- Lunnon K, Smith R, Hannon E, De Jager PL, Srivastava G, Volta M, et al. (2014). Methylopic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*; 17(9): 1164-70.
- Luo Y, Zhou X, Yang X, Wang J., (2007). Homocysteine induces tau hyperphosphorylation in rats. *Neuroreport*. 2007 Dec 3;18(18):2005-8.
- Lyras L., Cairns N.J., Jenner A., Jenner P., Halliwell B., (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* 68 2061–2069.
- Mancuso M., Coppedè F., Murri L., Siciliano G., (2007). Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease: myth or reality? *Antioxid. Redox Signal.* 9 1631–1646.
- Mancuso M., Orsucci D., LoGerfo A., Calsolaro V., Siciliano G., (2010). Clinical features and pathogenesis of Alzheimer's disease: involvement of mitochondria and mitochondrial DNA, *Adv. Exp. Med. Biol.* 685 34–44.
- Mao G, Pan X, Zhu BB, Zhang Y, Yuan F, Huang J, et al. (2007). Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35: 2759-66.
- Marr R.A., Rockenstein E., Mukherjee A., Kindy M.S., Hersh L.B., Gage F.H., Verma I.M., Masliah E. (2003). Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice, *J. Neurosci.*; 23 1992–1996.
- Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. (2010). Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging*; 31(12): 2025-37.
- Mastroeni D, McKee A, Grover A, Rogers J, Coleman PD. (2009). Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PLoS One* 4, e6617.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.*; 12(2):376-89.
- Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, Hyman BT, Crain B, Tang MX, Phelps CH. (1998). Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.*;338(8):506-11.
- Maynard S, Keijzers G, Gram M, Desler C, Bendix L, Budtz-Jorgensen E, Molbo D, Croteau DL, Osler M, Stevnsner T, et al. (2013). Relationships between human vitality and mitochondrial respiratory parameters, reactive oxygen species production and dNTP levels in peripheral blood mononuclear cells. *Aging (Albany NY).*;5:850–64.
- Maynard, S., Hejl, A.M., Dinh, T.S., Keijzers, G., Hansen, A.M., Desler, C., Moreno-Villanueva, M., Burkle, A., Rasmussen, L.J., Waldemar, G., Bohr, V.A. (2015). Defective mitochondrial respiration, altered dNTP pools and reduced APendonuclease 1 activity in peripheral blood mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. *Aging (Milano)* 7, 793–815.
- McCrory P, Zazryn T, Cameron P. (2007). The evidence for chronic traumatic encephalopathy in boxing. *Sports Med.*; 37 (6): 467–476.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*; 34: 939–44.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* May;7(3):263-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.

McNulty, H., Strain, J.J., Pentieva, K., and Ward, M., (2012). C(1)metabolism and CVD outcomes in older adults. *Proc. Nutr. Soc.* 71, 213–221.

Mecocci P., MacGarvey U., Beal M.F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 36 747–751.

Mecocci P., Polidori M.C., Cherubini A., Ingegni T., Mattioli P., Catani M., Rinaldi P., Cecchetti R., Stahl W., Senin U., et al., (2002). Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 59 794–798.

Mecocci P., Polidori M.C., Ingegni T., Cherubini A., Chionne F., Cecchetti R., Senin U. (1998). Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients, *Neurology*51 1014–1017.

Migheli, F., Stoccoro, A., Coppède, F., Wan Omar, W.A., Failli, A., Consolini, R., Seccia, M., Spisni, R., Miccoli, P., Mathers, J.C., Migliore, L., (2013). Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation. *PLoS One* 8, e52501.

Migliore L, Coppède F. (2009). Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res.*; 667(1-2):82-97.

Migliore L., Fontana I., Trippi F., Colognato R., Coppède F., Tognoni G., Nucciarone B., Siciliano G. (2005). Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients, *Neurobiol. Aging* 26 567–773.

Millan MJ (2014). The epigenetic dimension of Alzheimer's disease: causal, consequence, or curiosity? *Dialogues Clin Neurosci* 16, 373-393.

Moreira PI, Nunomura A, Honda K, Aliev G, Casadenus G, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2007). The key role of oxidative stress in Alzheimer's disease, in: G. Ali Qureshi, S. Hassan Parvez (Eds.), *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*, Elsevier, Amsterdam, pp. 451–466.

Morishima-Kawashima M, Ihara Y. (2002). Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res.* ;70(3):392-401.

Mórocz M., Kálmán J., Juhász A., Sinkó I., McGlynn A.P., Downes C.S., Janka Z., Raskó I. (2002). Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 23 47–53.

Mortusewicz O, Ame JC, Schreiber V, Leonhardt H. (2007). Feedback-regulated poly(ADP-ribose)ylation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.*;35:7665–75.

Nagata T, Kobayashi N, Ishii J, Shinagawa S, Nakayama R, Shibata N, Kuerban B, Ohnuma T, Kondo K, Arai H, Yamada H, Nakayama K. (2015). Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* Mar 4;5(1):64-73.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease., *Brain Res.*; 541(1):163-6.

Nussbaum RL, Ellis CE. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.*; 348(14):1356-64.

Oláh, Z., Kalman, J., Toth, M.E., Zvara, A., Santha, M., Ivitz, E., Janka, Z., Pakaski, M. (2015). Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease: wanted dead or alive. *J. Alzheimers Dis.* 44, 1303–1312.

- Pacheco-Quinto J, Rodriguez de Turco EB, DeRosa S, Howard A, Cruz-Sanchez F, Sambamurti K, Refolo L, Petanceska S, Pappolla MA. (2006). Hyperhomocysteinemic Alzheimer's mouse model of amyloidosis shows increased brain amyloid beta peptide levels. *Neurobiol Dis.* Jun;22(3):651-6.
- Peña F, Gutiérrez-Lerma A, Quiroz-Baez R, Arias C (2006). The role of beta-amyloid protein in synaptic function: implications for Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol.*; 4(2):149-63.
- Peng Q, Lao X, Huang X, Qin X, Li S, Zeng Z. (2015). The MTHFR C677T polymorphism contributes to increased risk of Alzheimer's disease: evidence based on 40 case-control studies. *Neurosci Lett*; 586: 36-42.
- Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG. (2003). Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):409-17.
- Petersen RC, Smith G, Kokmen E, Ivnik RJ, Tangalos EG. (1992). Memory function in normal aging. *Neurology*; 42: 396–401.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.*, 56(3):303-8.
- Petersen RC. (2007). Mild cognitive impairment: Current research and clinical implications. *Semin Neurol.* 27(1):22–31.
- Pfriegeer FW. (2003). Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays.*; 25(1):72-8.
- Phillips N.R., Simpkins J.W., Roby R.K. (2014). Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer's brains: a review, *Alzheimers Dement.* 10 393–400.
- Piaceri I, Raspanti B, Tedde A, Bagnoli S, Sorbi S, Nacmias B. (2015). Epigenetic modifications in Alzheimer's disease: cause or effect? *J Alzheimers Dis* 43,1169-7113.
- Pidsley R, Mill J. (2011). Epigenetic studies of psychosis: current findings, methodological approaches, and implications for postmortem research. *Biol Psychiatry.*;69:146–156.
- Pillon B, Deweer B, Michon A, Malapani C, Agid Y, (1994). Dubois B. Are explicit memory disorders of progressive supranuclear palsy related to damage to striatofrontal circuits? Comparison with Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. *Neurology*; 44: 1264–70.
- Praticò D, Clark C M, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. (2002). Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol.*; 59(9):1475.
- Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L. (2007). The epidemiology of the dementias: an update. *Curr Opin Psychiatry.* 20(4):380-5.
- Rabadi MH, Jordan BD. The cumulative effect of repetitive concussion in sports (2001). *Clin. J. Sport Med.*; 11 (3): 194–198
- Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. (2012). Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*; 2: e132.
- Rasmussen LJ, Shiloh Y, Bergersen LH, Sander M, Bohr VA, Tonjum T. (2013). DNA damage response, bioenergetics, and neurological disease: the challenge of maintaining brain health in an aging human population. *Mech Ageing Dev.*;134:427–33.
- Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.*; 8(5):890-9.
- Regland B, Abrahamsson L, Gottfries CG, Magnus E. (1990). Vitamin B12 analogues, homocysteine, methylmalonic acid, and transcobalamins in the study of vitamin B12 deficiency in primary degenerative dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1: 272–277.
- Ringman J.M., Rao P.N., Lu P.H., Cederbaum S., (2008). Mosaicism for trisomy 21 in a patient with young-onset dementia: a case report and brief literature review, *Arch. Neurol.* 65 412–415.
- Robison SH, Munzer JS, Tandan R and Bradley WG. (1987). Alzheimer's disease cells exhibit defective repair of alkylating agent-induced DNA damage. *Ann Neurol* 21:250-8.
- Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Esteller M, Capellà G, Ribas M, Peinado MA. (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res.* 66(2006)8462–9468.

- Rollins RA, Haghghi F, Edwards JR, Das R, Zhang MQ, Ju J, Bestor TH. (2006). Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res.*;16(2):157-63.
- Rotondo JC, Bosi S, Bazzan E, Di Domenico M, De Mattei M, Selvatici R, et al. (2012). Methylentetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod*; 27(12): 3632-8.
- Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer.*;10:293–301.
- Russo R, Borghi R, Markesbery W, Tabaton M, Piccini A. (2005). Neprylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Lett.* 579(27) 6027–6030.
- Sabuncu MR, Desikan RS, Sepulcre J, Yeo BT, Liu H, Schmansky NJ, Reuter M, Weiner MW, Buckner RL, Sperling RA, Fischl B. (2011). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. The dynamics of cortical and hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* Aug;68(8):1040-8. doi: 10.1001/archneurol.2011.167.
- Sanchez-Mut JV, Aso E, Heyn H, Matsuda T, Bock C, Ferrer I, et al. (2014). Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates PKA-dependent TAU phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease. *Hippocampus*; 24(4): 363-8.
- Sanchez-Mut JV, Aso E, Panayotis N, Lott I, Dierssen M, Rabano A, Urduingio RG, Fernandez AF, Astudillo A, Martin-Subero JI, Balint B, Fraga MF, Gomez A, Gurnot C, Roux JC, Avila J, Hensch TK, Ferrer I, Esteller M. (2013). DNA methylation map of mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease. *Brain.*136(Pt 10):3018-27.
- Sanchez-Mut, J.V., Gräff, J. (2015). Epigenetic alterations in Alzheimer's disease. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 347.
- Sando, S. B., S. Melquist, A. Cannon, M. Hutton, O. Sletvold, I. Saltvedt, L. R. White, S. Lydersen, and J. Aasly. (2008). Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease: *International Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 23, p. 1156-1162.
- Santibáñez M, Bolumar F, García AM. (2007). Occupational risk factors in Alzheimer's disease: a review assessing the quality of published epidemiological studies. *Occup Environ Med.* 64(11):723-32.
- Santos R.X., Correia S.C., Zhu X., Smith M.A., Moreira P.I., Castellani R.J., Nunomura A., Perry G. (2013). Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease, *Antioxid. Redox Signal.* 18 2444–2457.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.*;21:172–88.
- Scarpa S, Fuso A, D'Anselmi F, Cavallaro RA. (2003). Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Lett.* 541(1-3), 145–148.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet.* Feb 23. pii: S0140-6736(15)01124-1. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1.
- Scheltens P. et al., (2016). Alzheimer's disease, *The Lancet*, Seminar
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G. (2001). Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the Amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 276(36):33923-9
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 90(20):9649-53.
- Seeberg E, Eide L, Bjoras M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci.*;20:391–7.
- Selkoe DJ. (1994). Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53(5):427-8.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 14;346(7):476-83.
- Shackelford DA. (2006). DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*;27:596–605.

Shao, C., Xiong, S., Li, G.M., Gu, L., Mao, G., Markesbery, W.R., Lovell, M.A. (2008). Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 813–819.

Shen L, Ji HF (2015) Associations between Homocysteine, Folic Acid, Vitamin B12 and Alzheimer's Disease: Insights from Meta-Analyses. *J Alzheimers Dis.* 46,777-790.

Shinagawa S, Kobayashi N, Nagata T, Kusaka A, Yamada H, Kondo K, Nakayama K. (2016). DNA methylation in the NCAPH2/LMF2 promoter region is associated with hippocampal atrophy in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment patients. *Neurosci Lett.* pii: S0304-3940(16)30464-5.

Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 4(12):841-52.

Siegmund K.D., C.M. Connor, M. Campan, T.I. Long, D.J. Weisenberger, D. Bin-iskiewicz, R. Jaenisch, P.W. Laird, S. Akbarian, (2007). DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons, *PLoS One* 2 e895.

Silva PN, Furuya TK, Braga IL, Rasmussen LT, Labio RW, Bertolucci PH, et al. (2014). Analysis of HSPA8 and HSPA9 mRNA expression and promoter methylation in the brain and blood of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*; 38(1): 165-70.

Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 26;1502(1):139-44.

Solfrizzi V, Panza F, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo BP, Pilotto A. (2011). Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: the current evidence. *Expert Rev Neurother.* May;11(5):677-708. doi: 10.1586/ern.11.56.

Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, Diaz-Arrastia R, Ogris E, Dayal S, Lentz SR, Arning E, Bottiglieri T., (2007). Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. *J Neurosci.* 2007 Mar 14;27(11):2751-9.

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* May;7(3):280-92.

Stern, Y., (2012). Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease: *Lancet Neurology*, v. 11, p. 1006-1012.

Stolk L, Bouwland-Both MI, van Mil NH, Verbiest MM, Eilers PH, Zhu H, Suarez L, Uitterlinden AG, Steegers-Theunissen RP., (2013). Epigenetic profiles in children with a neural tube defect; a case-control study in two populations. *PLoS One.* Nov 5;8(11):e78462.

Stoltenberg M, Bush AI, Bach G, Smidt K, Larsen A, Rungby J, Lund S, Doering P, Danscher G. (2007). Amyloid plaques arise from zinc-enriched cortical layers in APP/PS1 transgenic mice and are paradoxically enlarged with dietary zinc deficiency. *Neuroscience.* 150(2):357-69.

Strachan MW. (2003). Insulin and cognitive function. *Lancet.*;362(9392):1253.

Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT, (2003). In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis.* Jun;18(2):147-54.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, and Roses AD. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 90: 1977–1981.

Suberbielle E, Djukic B, Evans M, Kim DH, Taneja P, Wang X, Finucane M, Knox J, Ho K, Devidze N, Masliah E, Mucke L. (2015). DNA repair factor BRCA1 depletion occurs in Alzheimer brains and impairs cognitive function in mice. *Nat Commun.* Nov 30;6:8897.

Swerdlow R.H., Khan S.M. (2004). A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease, *Med. Hypotheses* 63 8–20.

Sykora P, Misiak M, Wang Y, et al. (2015). DNA polymerase  $\beta$  deficiency leads to neurodegeneration and exacerbates Alzheimer disease phenotypes. *Nucleic Acids Res.* Jan;43(2):943-59. doi: 10.1093/nar/gku1356.

- Tabaton M, Piccini A. (2005). Patogenesi della malattia di Alzheimer. *Neurol Sci* 26:S223-S226.
- Tan Z, Sun N and Schreiber SS. (1998). Immunohistochemical localization of redox factor-1 (Ref-1) in Alzheimer's hippocampus. *Neuroreport* 9: 2749-52.
- Tan, Z., Sun, N., Schreiber, S.S., (1998). Immunohistochemical localization of redoxfactor-1 (Ref-1) in Alzheimer's hippocampus. *Neuroreport* 9, 2749–2752.
- Tannorella P, Stoccoro A, Tognoni G, Petrozzi L, Salluzzo MG, Ragalmuto A, Siciliano G, Haslberger A, Bosco P, Bonuccelli U, Migliore L, Coppedè F. (2015). Methylation analysis of multiple genes in blood DNA of Alzheimer's disease and healthy individuals. *Neurosci Lett*. Jul 23;600:143-7.
- Tanzi RE, Bertram L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*.; 120(4):545-55.
- Taupin P., Neurogenesis, NSCs, pathogenesis and therapies for Alzheimer's disease, *Front. Biosci.* 3 (2011) 178–190.
- Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Genda Y, et al. (1999). Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex. *Brain Res Mol Brain Res* 70: 288–292.
- Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC, Smith GE, Schaid DJ, Kokmen E, Ivnik RJ, Thibodeau SN. (1994). Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. Apr;54(4):643-9.
- Urduingio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. (2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*. 8(11):1056-72.
- Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. (2009). Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*; 69(1): 243-52.
- Van Dam F, Van Gool WA., (2009). Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. *Arch Gerontol Geriatr*. 48(3):425-30.
- Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al., (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62(5): 1044-51.
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci*.;29(41):12787-94.
- Vaya J, Schipper HM. (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem*.;102(6):1727-37.
- Vaya J, Song W, Khatib S, Geng G, Schipper HM. (2007). Effects of heme oxygenase-1 expression on sterol homeostasis in rat astroglia. *Free Radic Biol Med*.;42(6):864-71.
- Vineis P, Chuang SC, Vaissière T, Cuenin C, Ricceri F; Genair-EPIC Collaborators, Johansson M, Ueland P, Brennan P, Herceg Z., (2011). DNA methylation changes associated with cancer risk factors and blood levels of vitamin metabolites in a prospective study. *Epigenetics*. 2011 Feb;6(2):195-201.
- Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, Battaglia F, Arancio O, Shelanski M. (2002). Amyloid beta-peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*.; 99(20):13217-21.
- Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, Kirsch M, Schackert G, Calhoun V, Ehrlich S. (2016). Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull*. Mar;42(2):406-14.
- Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, et al. (2004a). Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 24: 10963-73.
- Wang J., Markesbery W.R., Lovell M.A., (2006). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment, *J. Neurochem*. 96 825–832.
- Wang J., Xiong S., Xie C., Markesbery W.R., Lovell M.A., (2005). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease, *J. Neurochem*. 93 953–962.
- Wang L, Zhang J, Wang S, (2007). Demethylation in the promoter region of MTHFR gene and its mRNA expression in cultured human vascular smooth muscle cells induced by homocysteine]. *Wei Sheng Yan Jiu*.36(3):291-4.



- Wang SC, Oelze B, Schumacher A (2008). Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One* 3, e2698
- Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H.G., Zhu X., (2014a). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1842:1240–1247.
- Wang Y, Xu S, Cao Y, Xie Z, Lai C, Ji X, et al. (2014b). Folate deficiency exacerbates apoptosis by inducing hypomethylation and resultant overexpression of DR4 together with altering DNMTs in Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Med*; 7(8): 1945-57.
- Wei LK, Sutherland H, Au A, Camilleri E, Haupt LM, Gan SH, Griffiths LR., (2015). A potential epigenetic marker mediating serum folate and vitamin B12 levels contributes to the risk of ischemic stroke. *Biomed Res Int*.
- Wei W., Liu Y.H., Zhang C.E., Wang Q., Wei Z., Mousseau D.D., Wang J.Z., Tian Q., Liu G.P. (2011). Folate/vitamin-B12 prevents chronic hyperhomocysteinemia-induced tau hyperphosphorylation and memory deficits in aged rats, *J. Alzheimers Dis.* 27 639–650.
- Weissman L, Jo DG, Sørensen MM, de Souza-Pinto NC, Markesbery WR, Mattson MP, et al. (2007). Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res* 35: 5545-55.
- Weissman, L., Jo, D.G., Sorensen, M.M., de Souza-Pinto, N.C., Markesbery, W.R., Mattson, M.P., Bohr, V.A., (2007). Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res.* 35, 5545–5555.
- West RL, Lee JM, Maroun LE. (1995). Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J. Mol. Neurosci.*; 6, 141–146.
- Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL., (2008). Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1903-8.
- Wu J, Basha MR, Brock B, Cox DP, Cardozo-Pelaez F, McPherson CA, Harry J, Rice DC, Maloney B, Chen D, Lahiri DK, Zawia NH. (2008). Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *J Neurosci.* Jan 2;28(1):3-9.
- Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu C, Xia Y, Song L, Wang S, Wang X., (2010). Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS One.*5(11):e13884.
- Wu, Y.L., Yang, H.Y., Ding, X.X., Zhao, X., Chen, J., Bi, P., et al., (2014). Association between methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and epilepsy susceptibility: a meta-analysis. *Seizure* 23, 41.
- Xu W, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, Zhao QF, Li JQ, Wang J, Yu JT. (2015). Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Dec;86(12):1299-306. doi: 10.1136/jnnp-2015-310548. Epub 2015 Aug 20.
- Yang M., Gong T., Lin X., Qi L., Guo Y., Cao Z., Shen M., Du Y., (2013). Maternal genopolymorphisms involved in folate metabolism and the risk of having a Down syndrome offspring: a meta-analysis, *Mutagenesis* 28 661–671.
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*; 13(8):335–340.
- Yu L, Chibnik LB, Srivastava GP, Pochet N, Yang J, Xu J, et al. (2015). Association of Brain DNA methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 with pathological diagnosis of Alzheimer disease. *JAMA Neurol*; 72(1): 15-24.
- Yu L, Chibnik LB, Yang J, McCabe C, Xu J, Schneider JA, De Jager PL, Bennett DA. (2016). Methylation profiles in peripheral blood CD4+ lymphocytes versus brain: The relation to Alzheimer's disease pathology. *Alzheimers Dement.* Mar 24. pii: S1552-5260(16)00084-4.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y., (2011). The DNA replication stress hypothesis of Alzheimer's disease, *Scientific World Journal* 11 2602–2612.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Liehr T., Kolotii A.D., Iourov I.Y., (2014). X chromosome aneuploidy in the Alzheimer's disease brain, *Mol. Cytogenet.* 7 20.
- Zawia N.H., Lahiri D.K., Cardozo-Pelaez F., (2009). Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease, *Free Radic. Biol. Med.* 46 1241–1249.

Zhang CE, Wei W, Liu YH, Peng JH, Tian Q, Liu GP, Zhang Y, Wang JZ., (2009). Hyperhomocysteinemia increases beta-amyloid by enhancing expression of gamma-secretase and phosphorylation of amyloid precursor protein in rat brain. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1481-91.

Zhang, L., Long, X., (2015). Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: evidence from 40 studies. *Sci. Rep.* 5, 17869.

Zolezzi JM, Bastías-Candia S, Santos MJ, Inestrosa NC. (2014). Alzheimer's disease: relevant molecular and pathophysiological events affecting amyloid- $\beta$  brain balance and the putative role of PPARs. *Front Aging Neurosci.* Jul 28;6:176. doi: 10.3389/fnagi.2014.00176. eCollection 2014.