

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Neuroscienze

Corso di Dottorato in Fisiopatologia dell'invecchiamento

MED/09 Ciclo XXIII



FATTORI DI RISCHIO GENETICI

NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER E NELLA DEMENZA FRONTOTEMPORALE:

STUDIO DI ASSOCIAZIONE DI GENI CANDIDATI POSIZIONALI E FUNZIONALI

Tesi di dottorato di ricerca di:

Milena Alessandra De Riz

Matr. n° R07580

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Carlo Vergani

Tutor: Chiar.mo Prof Elio Scarpini

Anno Accademico: 2009-2010

## SOMMARIO

La malattia di Alzheimer (AD) e Degenerazione Frontotemporale Lobare (FTLD) sono due patologie neurodegenerative multifattoriali in cui diversi geni di molecole coinvolte nell'infiammazione, nello stress ossidativo e nella sopravvivenza neuronale sono stati proposti come fattori di suscettibilità. Date queste premesse, questo studio ha avuto il fine di analizzare l'associazione di geni candidati posizionali e funzionali in una popolazione di 374 pazienti con AD, 291 con FTLD e 344 controlli di pari età.

I primi candidati sono stati gli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (CDKN) 2A and 2B, coinvolti nella progressione in fase G1, poiché un anomalo rientro nel ciclo cellulare dei neuroni è stato osservato nelle malattie neurodegenerative, in particolare nell'AD. Sono state determinate le frequenze alleliche e genotipiche di tre tagging Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), rispettivamente rs3731239 T/C, rs2811710 C/T and rs3217992 G/A, che coprono il 100% della variabilità genetica dei rispettivi geni. In base ai dati ottenuti, CDKN2A e CDKN2B non sembrano agire come fattori di rischio nell'AD.

Data la potenziale importanza della chinesina KIF24, proteina espressa nei neuroni e legata al trasporto assonale e alla sopravvivenza neuronale, abbiamo studiato la distribuzione di cinque Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) localizzati sul cromosoma 9: UBAP1 rs7018487, UBAP2 rs1785506 e rs307658, e KIF24 rs17350674 e rs10814083. Un aumento statisticamente significativo della frequenza del genotipo KIF24 rs17350674 AA è stato osservato nei pazienti FTLD rispetto ai controlli, specialmente per la variante bvFTD e nelle pazienti femmine, supportando un ruolo del polimorfismo di KIF24 rs17350674 nella FTLD sporadica. BCL2-associated athanogene 1 (BAG1) è un fattore antiapoptotico, che interagisce con la proteina tau e ne regola la degradazione. Una ridotta frequenza di BAG-1 rs706118 SNP si è osservata nei pazienti con FTLD, ma non con AD. BAG-1 rs706118 SNP sembra agire pertanto come fattore protettivo per FTLD ma non per AD.

Infine ci siamo interessati ad una Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, la hnRNP-A1, che potrebbe avere un ruolo nell'AD, in quanto potrebbe influenzare la maturazione del mRNA della proteina precursore della beta-amiloide (APP, ma anche nella FTLD, perché contiene un dominio ricco di glicina che è comune anche alla TAR DNA binding protein (TDP)43. Nel nostro studio, il genotipo hnRNP-A1 rs7967622 C/C si comporta da fattore di rischio solamente nella popolazione FTLD maschile, mentre i livelli di espressione relativa di hnRNP-A1 appaiono aumentati nei pazienti AD, dove sono invece ridotti i livelli del suo regolatore trascrizionale hsa-miR-590-3p.

In conclusione, i risultati di questo studio confermano l'importanza di geni che influenzano i processi di trasporto, metabolismo e sopravvivenza neuronale in entrambe le patologie neurodegenerative AD ed FTLD. Le differenze osservate sono probabilmente legate allo specifico ruolo di tali geni in eventi patogenetici che si verificano unicamente nella FTLD.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) and Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) are two neurodegenerative and multifactorial diseases with complex etiology in which several genes involved in inflammation, oxidative damage and neuronal survival have been proposed to be candidate susceptibility factors. Given these premises, aims of this study have been to further analyze the association of candidate functional and positional genes in a population of 374 patient with AD, 291 with FTLD and 344 age matched controls.

The first candidates studied have been the cell-dependent kinase inhibitor (CDKN) 2A and 2B, involved in cell cycle G1 phase progression, because abnormal cell cycle re-entry has been hypothesized to play a role in neurodegenerative disease, primarily AD. Allelic and genotypic frequencies of three tagging Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), namely rs3731239 T/C, rs2811710 C/T and rs3217992 G/A, spanning CDKN2A and CDKN2B, and covering 100% gene variability, were analyzed. According to our data, CDKN2A and CDKN2B don't likely act as risk factors for AD.

Given the potential importance of kinesin KIF24, protein expressed in neurons and involved in axonal transport and neuron development, we studied the distribution of five Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) located in the chromosome 9 haplotype identified via linkage analysis, including UBAP1 rs7018487, UBAP2 rs1785506 and rs307658, and KIF24 rs17350674 and rs10814083. A statistically significant increased frequency of the KIF24 rs17350674 AA genotype was observed in FTLD patients compared with controls, particularly in bvFTD and female patients, showing that KIF24 rs17350674 polymorphism may act as a risk factor for sporadic FTLD.

BCL2-associated athanogene 1 (BAG1) is an anti-apoptotic factor interacting with tau and regulating its proteasomal degradation. A statistically significant decreased allelic frequency of the BAG-1 rs706118 SNP was observed in patients with FTLD, but not in AD. BAG-1 rs706118 SNP likely acts as protective factor for sporadic FTLD, but not for AD. Finally we studied the Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1, which may be linked to AD, because it could influence the maturation of the Amyloid Precursor Protein (APP) mRNA, but also to FTLD, because it contains a glycine-rich consensus domain included in TAR DNA binding protein (TDP)43. In our study, hnRNP-A1 rs7967622 C/C genotype acts as risk factor only for FTLD in male population, while hnRNP-A1 relative expression levels were increased in AD patients, together with decreased levels of its transcription regulatory factor hsa-miR-590-3p.

We confirmed the importance of genes influencing neuronal transport, metabolism and survival in both neurodegenerative diseases AD and FTLD; the observed differences are probably related to specific roles of these genes in pathogenic events occurring in FTLD only.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Le demenze e l'invecchiamento.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 La malattia di Alzheimer (AD).....</b>	<b>3</b>
1.1.1.1 <i>Caratteristiche cliniche</i> .....	4
1.1.1.2 <i>Diagnosi</i> .....	5
1.1.1.3 <i>Anatomia patologica</i> .....	7
1.1.1.4 <i>Biologia della proteina <math>\beta</math>-Amiloide</i> .....	10
1.1.1.5 <i>Ruolo delle preseniline</i> .....	14
1.1.1.6 <i>Aspetti biochimici</i> .....	16
1.1.1.7 <i>Genetica dell'AD</i> .....	16
1.1.1.7.1 <i>AD familiare (FAD)</i> .....	17
1.1.1.7.2 <i>AD sporadico (SAD)</i> .....	18
<b>1.1.2 La Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD).....</b>	<b>22</b>
1.1.2.1 <i>Diagnosi e caratteristiche neuropatologiche</i> .....	22
1.1.2.2 <i>Genetica della FTL D</i> .....	24
1.1.2.2.1 <i>Cromosoma 3</i> .....	25
1.1.2.2.2 <i>Cromosoma 9</i> .....	25
1.1.2.2.3 <i>Cromosoma 17q21</i> .....	26
1.1.2.2.4 <i>Preseniline e FTL D</i> .....	27
1.1.2.2.5 <i>Ruolo dell'Apolipoproteina E (ApoE)</i> .....	28
<b>1.2 Ipotesi infiammatoria nell'AD e nella FTL D.....</b>	<b>28</b>
1.2.1 <i>Citochine e chemochine nelle demenze</i> .....	31
1.2.2 <i>Polimorfismi genetici in citochine e chemochine</i> .....	33
<b>1.3 Lo stress ossidativo e le demenze</b> .....	<b>35</b>
1.3.1 <i>Marcatori dello stress ossidativo</i> .....	37
1.3.2 <i>Polimorfismi in molecole coinvolte nello stress ossidativo</i> .....	38
<b>1.4 Marcatori liquorali delle demenze.....</b>	<b>39</b>
1.4.1 <i>Proteina A<math>\beta</math> in CSF</i> .....	40
1.4.2 <i>Proteina tau totale (T-tau) in CSF</i> .....	40
1.4.3 <i>Proteina tau fosforilata (P-tau) in CSF</i> .....	40
<b>1.5 Regolazione del ciclo cellulare e malattia di Alzheimer.....</b>	<b>41</b>
1.5.1 <i>Geni regolatori del ciclo cellulare e demenze</i> .....	42
1.5.2 <i>microRNA, hnRNPs e malattia di Alzheimer</i> .....	43
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA.....</b>	<b>44</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>46</b>
3.1 <i>Arruolamento pazienti</i> .....	46
3.2 <i>Purificazione di DNA da sangue intero</i> .....	47
3.3 <i>Determinazione delle varianti alleliche</i> .....	48
3.3.1 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i> .....	48
3.3.2 <i>Discriminazione allelica mediante tecnologia Taqman</i> .....	49
3.4 <i>Analisi genetica di GRN</i> .....	50
3.5 <i>Estrazione mRNA totale e analisi trascrizionale quantitativa di hnRNP-A1 mediante tecnica Real-Time PCR</i> .....	51
3.6 <i>Estrazione di miRNA hsa-miR-590-3p e analisi quantitativa mediante tecnica Real-Time PCR</i> .....	51
3.7 <i>Analisi statistica</i> .....	52
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>53</b>
4.1 <i>studio di associazione di CDKN nell'AD</i> .....	53
4.2 <i>studio di associazione di KIF24 nella FTL D</i> .....	54

<i>4.3 studio di associazione di BAG1 nella FTLD e nell'AD.....</i>	<i>56</i>
<i>4.4 analisi genetica e di espressione genica di hnRNP-A1 e di miR-590-3p nella FTLD e nell'AD.....</i>	<i>58</i>
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>61</b>
<b>6.CONCLUSIONI.....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>66</b>
<b>APPENDICE.....</b>	<b>94</b>

## ABBREVIAZIONI

---

<b>A<math>\beta</math></b>	: amyloid $\beta$ protein
<b>AD</b>	: Alzheimer's disease
<b>ApoE</b>	: apolipoproteina E
<b>APP</b>	: amyloid protein precursor
<b>ASL</b>	: amyotrophic lateral sclerosis
<b>BACE</b>	: $\beta$ -site cleaving enzyme
<b>bvFTD</b>	: behavioural-variant frontotemporal dementia
<b>CCL</b>	: chemokine C-C motif ligand
<b>CDK</b>	: cell-dependent kinase
<b>CDKN</b>	: cell-dependent kinase inhibitor
<b>CSF</b>	: cerebrospinal fluid
<b>ELISA</b>	: enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EAD</b>	: early-onset Alzheimer's disease
<b>FAD</b>	: familial Alzheimer's disease
<b>FTLD</b>	: frontotemporal lobar degeneration
<b>GRN</b>	: progranulin
<b>hnRNP-A1</b>	: heterogeneous ribonuclear protein
<b>IL</b>	: interleuchina
<b>INF</b>	: interferone
<b>IP-10</b>	: interferon- $\gamma$ inducible protein-10
<b>IRCCS</b>	: istituto di ricovero e cura a carattere scientifico
<b>LPS</b>	: lipopolisaccaride
<b>LOAD</b>	: late-onset Alzheimer's disease

---

<b>MCI</b>	: mild cognitive impairment
<b>MCP-1</b>	: monocyte chemoattractant protein-1
<b>miRNA</b>	: microRNA
<b>MMSE</b>	: mini mental state evaluation
<b>MND-FTD</b>	: motor neurone disease with frontotemporal dementia
<b>NFTs</b>	: neuro-fibrillary tangles
<b>NO</b>	: ossido nitrico
<b>NOS</b>	: ossido nitrico sintasi
<b>OR</b>	: odds ratio
<b>PA</b>	: progressive aphasia
<b>PBMC</b>	: peripheral blood mononuclear cells
<b>PD</b>	: Parkinson's disease
<b>PNFA</b>	: progressive non-fluent aphasia
<b>P-tau</b>	: phospho-tau
<b>RFLP</b>	: restriction fragment length polymorphism
<b>SAD</b>	: sporadic Alzheimer's disease
<b>SD</b>	: semantic dementia
<b>SNC</b>	: sistema nervoso centrale
<b>SNP</b>	: single nucleotide polymorphism
<b>SP</b>	: senile plaques
<b>Taq</b>	: Thermus aquaticus
<b>TNF</b>	: tumor necrosis factor
<b>T-tau</b>	: total-tau
<b>VaD</b>	: vascular dementia
<b>VNTR</b>	: variable number tandem repeat

---

## INTRODUZIONE

---

### 1.1 Le demenze e l'invecchiamento

I miglioramenti ed il progresso della medicina a partire dal XX secolo hanno portato a una riduzione della mortalità infantile e a miglioramenti sostanziali nella prevenzione e terapia delle malattie, con un considerevole aumento dell'aspettativa media di vita dell'uomo, che ad oggi si aggira intorno ai 75 anni di vita per l'uomo e agli 80 per la donna. Tali miglioramenti hanno però prodotto negli ultimi anni un aumento considerevole dell'insorgenza di una particolare patologia: la demenza, che è caratterizzata dal deterioramento delle facoltà mentali.

Per molto tempo, essa è stata considerata una normale sequela dell'invecchiamento, come l'accentuazione di un normale e ineluttabile processo fisiologico. In realtà, le modificazioni delle funzioni cognitive che si possono riscontrare con l'età, quali ad esempio un rallentamento nei processi di apprendimento o modificazioni della velocità nella risoluzione di problemi, sono stabili e non hanno impatto funzionale poiché l'anziano normale riesce a compensare in modo efficace queste alterazioni.

La demenza ha un impatto considerevole sulla qualità della vita, sull'autonomia nello svolgimento delle attività quotidiane e sulla sopravvivenza, rappresentando un importante costo socio-economico che andrà sempre più aumentando. Il termine demenza fa riferimento ad una sindrome caratterizzata da perdita delle capacità cognitive a diversi livelli (Cummings and Benson, 1992), coinvolgendo la memoria e l'apprendimento, la facoltà di leggere e scrivere, la capacità di comprensione ed espressione del linguaggio, lo svolgimento delle attività quotidiane, la capacità di riconoscere gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno e di elaborare correttamente le informazioni, il tutto senza compromettere lo stato di coscienza. Inoltre, alterazioni della personalità e del comportamento possono insorgere più o meno precocemente. Le difficoltà incontrate dal soggetto demente compromettono le attività pratiche della vita quotidiana e le abilità precedentemente acquisite, oltre alla capacità di mantenere comportamenti socialmente adeguati e di controllare le proprie emozioni.

---



La demenza più frequente è la malattia di Alzheimer (AD), che rappresenta quasi l'80% di tutte le demenze, seguita dalla Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD) che rappresenta un gruppo eterogeneo di sindromi cliniche .

La possibilità di sviluppare questo tipo di patologia aumenta in maniera esponenziale tra i 65 e gli 85 anni, raddoppiando approssimativamente ogni cinque anni: essa, infatti, tra i 65 e i 69 anni è pari circa all'1% e raggiunge il 30% nella fascia 85–89. La crescita esponenziale della malattia con l'età ha portato alcuni ricercatori ad ipotizzare che il progressivo decadimento tipico della demenza sia, in effetti, un processo inevitabilmente legato all'invecchiamento: secondo questa ipotesi tutti dovrebbero sviluppare demenza ad un'età che però non è raggiunta dalla maggior parte degli individui. Tuttavia diversi studi sembrano suggerire che oltre gli 85 anni di età vi sia una riduzione dell'incidenza, e un punto di flessione intorno ai 95 anni, identificando quindi nella demenza una patologia (Khachaturian, 1997) e non un traguardo ineluttabile. Le cause della demenza possono essere molteplici e perciò la sua diagnosi non indica di per sé la presenza di una malattia specifica. La velocità e il tasso di insorgenza di queste patologie possono essere messi in relazione prevalentemente con due fattori:

- 1) il fattore genetico, cioè la "programmazione" insita nelle cellule a degenerare;
- 2) i fattori esogeni (alimentazione, lavoro fisico, clima, esposizione a tossici ambientali, abitudini voluttuarie, situazioni stressanti...) che, necessariamente, anche se in misura variabile da persona a persona, possono logorare e far invecchiare in maniera patologica i nostri organi.

### **1.1.1 La malattia di Alzheimer (AD)**

Originariamente la malattia di Alzheimer è stata descritta dal neuropatologo, Alois Alzheimer, e da un giovane ricercatore italiano, Gaetano Perusini, nel 1906. E' la demenza degenerativa più frequente e meglio conosciuta dal punto di vista anatomico-patologico. Rappresenta la causa più comune di demenza nella popolazione anziana dei paesi occidentali, essendo stata diagnosticata al riscontro autoptico nel 50-60% dei casi di decadimento cognitivo ad esordio tardivo (Tomlinson et al., 1970). Inoltre non raramente l'AD rende conto di casi di demenza in età tardo-adulta e presenile (45–65 anni). La patologia interessa maggiormente le donne in tutte le fasce d'età (Rocca et al., 1986): sebbene l'incidenza sia solo lievemente aumentata rispetto alla popolazione maschile, la prevalenza nella popolazione femminile è triplicata. L'incidenza della malattia è simile in tutto il mondo ed è stimata in tre nuovi casi su 100.000 nella popolazione con età inferiore a 60 anni, e 125/100.000 nella fascia d'età superiore ai 60 anni. La prevalenza è circa 300/100.000 tra 60 e 69 anni, 3.200/100.000 nella fascia 70–79 e 10.800/100.000 nei soggetti oltre gli 80 anni. In Italia sono presenti attualmente più di 500000 persone affette, con conseguente forte impatto sulle famiglie e la società. La sopravvivenza dei malati è ridotta a metà di quella attesa, dal momento che la maggior parte dei decessi avviene per complicanze cardiovascolari e respiratorie secondarie legate allo stato vegetativo.

### 1.1.1.1 Caratteristiche cliniche

La AD è una complessa sindrome al cui sviluppo concorrono fattori genetici e ambientali, che conducono ad un quadro clinico e anatomopatologico comune (Whitehouse, 1997). Dal punto di vista clinico l'AD ha generalmente un inizio insidioso ed un decorso cronico-progressivo.

Il primo sintomo è generalmente un lieve deficit di memoria, che progredisce gradualmente. Nelle fasi iniziali negli individui anziani la perdita della memoria tende ad essere più marcata per gli eventi recenti, il paziente diviene ripetitivo, tende a perdersi in ambienti nuovi, dimentica gli impegni, può essere disorientato nel tempo. Con l'avanzare della malattia anche la memoria remota viene invariabilmente persa ed il paziente è incapace persino di riconoscere i propri familiari. Si manifestano inoltre alterazioni delle altre funzioni superiori: il pensiero astratto risulta impoverito, con ridotta capacità di ragionamento logico e concettualizzazione, la capacità di giudizio è diminuita, cosicché il paziente manifesta un ridotto rendimento lavorativo e può essere incapace di affrontare e risolvere problemi anche semplici relativi ai suoi rapporti interpersonali o familiari. Si manifestano labilità emotiva e mutamento della personalità. Il paziente denuncia una progressiva incapacità a svolgere compiti prima per lui familiari. Più comunemente compare apatia, il paziente perde interesse per l'ambiente e per gli altri, richiudendosi in se stesso. Spesso si accentuano i caratteri premorbosi della personalità, quali atteggiamenti ossessivi o compulsivi, aggressività, paranoia. In altri casi vi è invece un mutamento della personalità, per cui soggetti solitamente controllati e misurati diventano impulsivi, intrattabili ed a volte anche violenti. Questa fase della malattia è più facilmente evidenziata in pazienti giovani o che svolgono ancora attività lavorativa, può invece sfuggire in pazienti anziani o che non svolgono compiti impegnativi da un punto di vista intellettuale. In alcuni casi la malattia si manifesta con un'afasia isolata o con difficoltà visuo-spaziali. L'afasia è più spesso di tipo fluente, con anomia e parafasia. L'aprassia (cioè l'incapacità ad eseguire attività motorie nonostante l'integrità della comprensione e della motricità) e l'agnosia (l'incapacità a riconoscere o identificare oggetti in assenza di deficit sensoriali) sono altri sintomi comuni nell'Alzheimer.

In una fase intermedia della malattia il paziente diviene incapace di apprendere nuove informazioni, spesso si perde, anche in ambienti a lui familiari. La memoria remota è compromessa. Il paziente è a rischio di cadute, può richiedere assistenza nelle attività della vita quotidiana (quali lavarsi, vestirsi, alimentarsi), generalmente è in grado di deambulare autonomamente. Il comportamento diviene ulteriormente compromesso e normalmente si manifesta un completo disorientamento spaziotemporale.

Nelle fasi avanzate dell'AD, il paziente è incapace di svolgere qualsiasi attività della vita quotidiana, compare generalmente incontinenza. La memoria a breve e lungo termine è totalmente persa ed il paziente può divenire mutaco ed acinetico. Si manifesta disfagia e può essere necessario alimentare il paziente artificialmente. Il rischio di complicanze, quali malnutrizione, disidratazione, malattie infettive (polmoniti soprattutto), fratture e piaghe da decubito diviene elevato (Khachaturian et al., 1997).

Nell'AD sono comuni manifestazioni che ricordano comportamenti tipici dei disordini psicotici funzionali, quali depressione, sintomi psicotici e disturbi del sonno. La frequenza di depressione del

---

---

tono dell'umore è più elevata nell'AD, soprattutto nelle forme lievi o moderate, diminuendo man mano che la malattia diventa più severa. La sopravvivenza media è di 8-10 anni, sebbene questo intervallo sia molto variabile (Larsson et al., 1963). La morte interviene generalmente per l'insorgenza di complicanze.

### 1.1.1.2 Diagnosi

La fase diagnostica nella valutazione di un soggetto con apparenti disturbi cognitivi ha inizio con l'anamnesi, analizzando le eventuali difficoltà relative alla memoria e agli altri ambiti cognitivi, e le loro ripercussioni sulla vita di tutti i giorni (indagine ecologica). Se i sospetti si delineano chiaramente, il passo successivo è un'indagine neuropsicologica volta alla conferma e quantificazione dei deficit nei diversi ambiti cognitivi, e che si configura anche come parametro confrontabile nel tempo per il follow-up. Appurata l'esistenza del disturbo cognitivo, il clinico deve escludere le forme secondarie con le idonee indagini strumentali e quindi definire la tipologia di decadimento di natura degenerativa primaria con il miglior livello possibile di sensibilità e specificità diagnostica.

Sebbene l'unica diagnosi "definita" di malattia di Alzheimer sia quella autoptica, livelli di sensibilità e specificità sempre maggiori sono stati raggiunti mediante la messa a punto di criteri di diagnosi clinica universalmente accettati.

Secondo i criteri NINCDS – ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work Group) (McKhann et al., 1984) e del DSM IV, il sintomo iniziale ed essenziale per porre diagnosi di AD è il deficit di memoria, cui deve associarsi la compromissione di almeno un'altra area cognitiva (orientamento spazio-temporale, ragionamento astratto, capacità di giudizio, linguaggio, calcolo, prassia, gnosis, abilità visuo-spaziali e costruttive). L'impiego di tali criteri porta a formulare diagnosi di AD probabile o possibile (McKhann et al., 1984). La diagnosi di AD "probabile" si basa sul riscontro di: deterioramento mentale stabilito clinicamente e mediante tests neuropsicologici, deficit in due o più aree cognitive tra cui la memoria, assenza di alterazione della coscienza, inizio dei sintomi dopo i 40 anni, esordio insidioso, decorso progressivo, esclusione di altre patologie capaci di compromettere le funzioni cognitive. La diagnosi di AD "possibile" è riservata alle forme con caratteristiche cliniche atipiche (insorgenza brusca, segni neurologici focali, scoordinazione motoria precoce, crisi epilettiche precoci) o con malattie sistemiche o cerebrali coesistenti, che tuttavia non si ritiene possano essere causa della demenza.

Le tecniche di neuroimmagine assumono un ruolo importante nell'iter diagnostico delle demenze e dell'AD, da un lato escludendo sindromi e condizioni in grado di generare un quadro patologico simile, quali tumori cerebrali, ematomi sottodurali, idrocefalo e lesioni ischemiche, dall'altro evidenziando un quadro d'atrofia che, sebbene non specifico, è d'aiuto nel formulare la diagnosi. La tomografia computerizzata (CT) e la risonanza magnetica (MRI) infatti, sono in grado di dimostrare nei pazienti in fase avanzata una dilatazione dei ventricoli laterali e del terzo ventricolo fino al doppio delle dimensioni normali, nonché un ampliamento dei solchi corticali; la MRI in sezione sottile dimostra una sproporzionata atrofia degli ippocampi e un allargamento dei corni temporali dei ventricoli laterali. Nelle fasi precoci della malattia invece le alterazioni spesso non sono distinguibili da quelle che si osservano in anziani con funzioni cognitive inalterate, infatti, un certo grado d'atrofia

cerebrale è presente anche nell'invecchiamento normale e la differenza con i quadri di AD è di tipo quantitativo. Le indagini neuroradiologiche funzionali, come PET (tomografia ad emissione di positroni) e SPECT (tomografia ad emissione di fotone singolo), rilevano rispettivamente un ipometabolismo ed un ipoafflusso nelle regioni associative temporo-parietali già nelle fasi precoci della malattia con risparmio delle regioni sensitive e motorie primarie, dei gangli della base, del talamo e del cervelletto (Friedland et al., 1983; Kuhl et al., 1985). Il deficit di perfusione e metabolismo cerebrale presenta una buona correlazione con le caratteristiche del deterioramento cognitivo del paziente. La presenza di asimmetria funzionale emisferica è frequente e si correla con le asimmetrie nella compromissione alle valutazioni neuropsicologiche: un'alterazione prevalente dell'emisfero sinistro si accompagna a maggiori difficoltà nelle prove linguistiche, mentre i pazienti con asimmetria opposta si dimostrano deficitari soprattutto nelle prove visuoperceptive. La riduzione del metabolismo cerebrale non è una semplice conseguenza dell'atrofia, come dimostra la capacità di SPECT e PET di evidenziare aree a ridotto metabolismo ben prima che le modificazioni morfo-strutturali siano evidenti. All'EEG si riscontra un diffuso rallentamento con onde  $\theta$  e  $\delta$ , sebbene solo nelle fasi avanzate della malattia. L'analisi convenzionale del liquor è normale, e solo occasionalmente si può evidenziare un lieve aumento delle proteine totali. Durante le prime fasi diagnostiche è importante valutare attentamente la presenza di patologie internistiche capaci di rendere conto del quadro di deterioramento cognitivo, quali l'insufficienza epatica, renale o respiratoria, le alterazioni della funzione tiroidea, il diabete e l'ipertensione arteriosa, il deficit di acido folico o vitamina B12: tali quadri sistemici, come altre patologie neurologiche, tra cui l'idrocefalo normoteso, sono trattabili ed il decadimento cognitivo da essi determinato è, almeno parzialmente, reversibile. Sono inoltre da escludere l'abuso di alcolici o di altre sostanze (compresi i farmaci) e l'esposizione a tossici ambientali. Una corretta diagnosi è inoltre essenziale per determinare un trattamento mirato, una prognosi realistica ed i possibili rischi genetici (Geldmacher and Whitehouse, 1996).

Esistono molti motivi che hanno condotto a una revisione dei criteri diagnostici per l'AD. Innanzitutto non vi è una specificità diagnostica sufficiente, la differenziazione dell'AD da altri tipi di demenze risulta difficoltosa ed è inoltre complicato identificare il fenotipo dell'AD. Tali motivazioni hanno portato Dubois e collaboratori nel 2007 a proporre una revisione dei criteri NINCDS-ADRDA (Dubois et al., 2007). Questi nuovi criteri ribadiscono la presenza come segno cardine della malattia di Alzheimer del deficit di memoria precoce e progressivo, della durata di almeno 6 mesi, confermato da test neuropsicologici, isolato o associato ad altri deficit cognitivi. Inoltre, sottolineano l'aumento di sensibilità e specificità diagnostica per l'AD fornito dai marcatori biologici, che sono rappresentati dagli esami di neuroimaging (atrofia temporale mesiale alla RMN, riduzione di metabolismo temporoparietale alla PET, positività della PET con ligandi specifici per la Beta-amiloide) e dai parametri liquorali (riduzione di beta-amiloide, aumento della proteina tau e tau fosforilata), oltre che dal riscontro di mutazioni causali autosomiche dominanti (APP, PS1, PS2). Molto recentemente, gli stessi autori (Dubois et al., 2010) propongono un'ulteriore revisione del concetto di malattia di Alzheimer e del lessico usato per l'inquadramento diagnostico. In tale proposta si chiarifica che esiste una neuropatologia dell'AD, che può sussistere anche in assenza di manifestazioni cliniche

---

(stati preclinici: 1) stato asintomatico di rischio, se vi è presenza di biomarcatori specifici di AD; 2) stato presintomatico, se vi è mutazione genetica causale), ma che, quando si esprime clinicamente, può essere diagnosticata come AD prodromico (deficit cognitivi, tra cui perdita di memoria episodica del tipo ippocampale, senza impatto sul funzionamento quotidiano del soggetto, ma con positività dei marcatori biologici specifici) o come demenza AD (se vi è impatto ecologico dei deficit e positività dei biomarcatori) tipica (fenotipo classico ippocampale) e atipica (varianti focali corticali non amnesiche: afasia progressiva non fluente, afasia logopenica, variante frontale di AD, atrofia corticale posteriore). Questa proposta di revisione dei criteri, pur non risolvendo ancora del tutto problemi di classificazione dovuti alla sovrapposizione della patologia cerebrovascolare o Lewy con l'AD (AD misto) e dei quadri clinici che non soddisfano i criteri dell'AD prodromico per la negatività dei biomarcatori, permetterebbe di sottoporre ai trattamenti farmacologici in via di sviluppo una fascia più ampia di soggetti rispetto al passato.

### 1.1.1.3 Anatomia patologica

Il quadro anatomopatologico macroscopico della malattia di Alzheimer è caratterizzato da una notevole atrofia del cervello, con circonvoluzioni cerebrali ristrette, solchi e ventricoli ampliati; il peso del cervello soprattutto nelle fasi avanzate della malattia, può essere ridotto anche del 20%. L'atrofia coinvolge i lobi frontali, temporali e parietali, e in modo marcato l'ippocampo, la cui atrofia è talmente caratteristica da essere ritenuta, da alcuni autori, come diagnostica (Fig. 1). Microscopicamente si può osservare una cospicua perdita cellulare soprattutto a livello corticale; particolarmente colpiti risultano l'ippocampo, la corteccia entorinale, il giro paraippocampale e il subiculum. Sono depauperati anche il nucleo anteriore del talamo, i nuclei settali e la banda diagonale di Broca, l'amigdala e le porzioni del tronco cerebrale appartenenti ai sistemi monoaminergici. Anche i neuroni colinergici del nucleo basale di Meynert e del locus coeruleus sono numericamente ridotti. La perdita neuronale interessa sia le grosse cellule piramidali sia gli interneuroni.

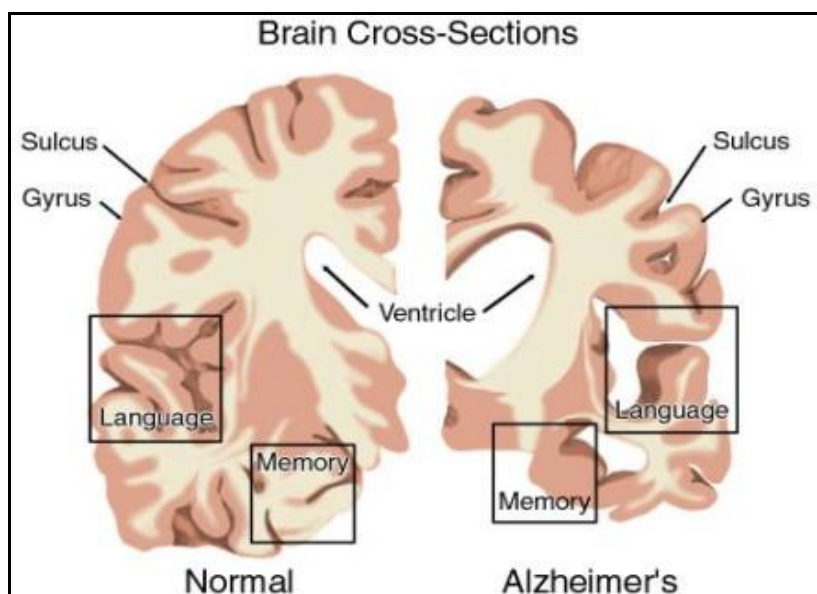


Figura 1: Sezione frontale del cervello normale e con Alzheimer

Molti dei neuroni superstiti sono di volume ridotto e con minore numero di dendriti, i quali, a loro volta, si presentano addossati l'uno all'altro, a causa della perdita di sinapsi e neuropilo; la perdita sinaptica che accompagna la degenerazione neuronale è correlata ai deficit mnesici dell'AD. Alle alterazioni neuronali si associa una proliferazione astrocitaria, di significato verosimilmente riparativo o compensatorio, soprattutto negli strati III e IV della corteccia. Sebbene l'atrofia cerebrale sia un reperto relativamente costante nell'AD, la considerevole variabilità che si può osservare tra i diversi casi ne impedisce l'utilizzo come marcatore diagnostico affidabile. Gli aspetti tipici all'esame neuropatologico sono rappresentati dalle placche senili (SP), dagli ammassi neurofibrillari (NTF) (Fig. 2) e dall'angiopatia amiloide (congofila), il riscontro dei quali post mortem consente la diagnosi definitiva. Tali lesioni si possono riscontrare, sebbene in misura minore e diversamente associate, anche in anziani normali, ed in altre patologie degenerative cerebrali, risultando quindi tipiche ma non patognomoniche di AD: è la valutazione quantitativa più che quella qualitativa a permettere la diagnosi.

Le placche senili sono costituite da depositi extracellulari di amiloide associati a danno assonale e dendritico, generalmente rappresentati in grande numero nella corteccia limbica e associativa (Dickson, 1997); queste formazioni contengono depositi insolubili di proteina A $\beta$ , principalmente in forma filamentosa, che nella parte centrale della placca si addensano a formare un core compatto, e neuriti distrofiche, i quali si localizzano sia dentro, sia in prossimità dei depositi amiloidei. Le placche di amiloide che si accumulano nel cervello sono irregolari, approssimativamente sferiche ed hanno dimensioni molto variabili che possono andare da 10 a parecchie centinaia di micrometri. La sostanza amiloide è formata da fibrille con conformazione a foglietto  $\beta$  di 6-10nm di diametro presenti nello spazio extracellulare, costituite da una proteina, chiamata A $\beta$  [1-42] che deriva da un precursore di maggiori dimensioni (Amyloid Protein Precursor: APP). Tale precursore della proteina  $\beta$  amiloide è una proteina integrale di membrana che possiede un grande tratto di catena extracellulare e una piccola coda citoplasmatica. Si ritiene che i diversi tratti extracellulari della proteina esercitino azioni particolari in condizioni normali e patologiche.

I neuriti danneggiati si presentano dilatati, con alterazioni ultrastrutturali, tra cui lisosomi rigonfi, aumentato numero di mitocondri e filamenti elicoidali accoppiati, generalmente indistinguibili da quelli che compongono gli ammassi neurofibrillari. I neuriti che partecipano alla formazione della placca senile possono provenire da neuroni di diverse classi neurotrasmettitoriali. La placca senile è inoltre associata ad elementi microgliali ed astrocitari attivati. La componente microgliale esprime antigeni di superficie tipici dello stato attivato come CD45 e HLA-DR ed è localizzata soprattutto dentro il core o nei suoi pressi. Gli elementi astrocitari circondano invece la placca e mostrano abbondanti processi che si estendono verso il core. Nella placca senile si trovano colocalizzate sia la proteina A $\beta$  [1-42] più idrofobica e particolarmente incline all'aggregazione (Jarrett et al., 1993), sia la forma A $\beta$  [1-40], che è normalmente prodotta in maggiore quantità rispetto alla A $\beta$  [1-42]. Le indagini immunostochimiche mostrano agglomerati di A $\beta$  localizzati diffusamente nella corteccia, comprese quelle aree non chiaramente implicate nella tipica sintomatologia della malattia di Alzheimer (come talamo, caudato, putamen, cervelletto), caratterizzati da una leggera e amorfa immunoreattività,

senza un core compatto né chiaramente fibrillare (placche diffuse). Inoltre nella maggior parte di questi agglomerati non è possibile dimostrare la presenza di neuriti distrofici o se ne può riconoscere solo una piccola quantità.

Le placche diffuse sono costituite quasi esclusivamente da A $\beta$  [1-42] (Iwatsubo et al., 1994; Gowing et al., 1994; Iwatsubo et al., 1995; Lemere et al., 1996), e sono le uniche forme riconoscibili in quelle regioni nelle quali mancano o si ritrovano in piccola quantità i neuriti distrofici, le modificazioni gliali e gli ammassi neurofibrillari, e che non sono chiaramente implicate nella sintomatologia tipica della AD. Esse possono essere anche messe in evidenza come uniche lesioni nella corteccia limbica e associativa di soggetti della stessa età non affetti da demenza e sono presenti già durante l'età adolescenziale in soggetti con trisomia 21 (Sindrome di Down, Lemere et al., 1996). Queste evidenze hanno portato ad ipotizzare per queste lesioni un significato di precursori delle placche senili, ipotesi supportata anche da esperimenti su topi transgenici esprimenti il gene mutante umano per la proteina precursore dell'amiloide (APP), i quali sviluppano depositi diffusi prima della forma fibrillare associata alle modificazioni neuritiche e gliali. Molti neuroni nelle regioni tipicamente coinvolte nell'AD (corteccia entorinale, ippocampo, giro paraippocampale, amigdala, corteccia associativa frontale, parietale, temporale e occipitale, e alcuni nuclei sottocorticali che proiettano a queste regioni) contengono grandi ammassi di fibre anomale, non legate alla membrana, che occupano lo spazio perinucleare, aventi forma globosa o a fiamma, spesso estese fino ai prolungamenti cellulari. La maggior parte di queste fibre (di dimensione ~10nm) consistono in coppie di filamenti elicoidali con un periodo pari a ~160nm. Le fibre che realizzano gli ammassi neurofibrillari sono composte da aggregati della proteina tau (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986; Nukina e Ihara, 1986; Wood et al., 1986), che nella cellula normale si trova associata ai microtubuli, e che negli ammassi neurofibrillari si trova in forma iperfosforilata e insolubile. In vitro, numerose chinasi sono in grado di fosforilare la proteina tau in vari siti (Goedert et al., 1991; Illenberger et al., 1998), tuttavia non è ancora chiaro quante e quali chinasi siano responsabili in vivo nell'iniziare il processo di iperfosforilazione che conduce alla dissociazione della proteina tau dai tubuli e alla sua aggregazione in filamenti elicoidali appaiati insolubili. Negli ammassi neurofibrillari, associate alla proteina tau iperfosforilata si localizzano altre proteine anomale, quali l'ubiquitina, la proteina associata ai microtubuli e una proteina dei neurofilamenti. Le due lesioni classiche dell'AD possono essere presenti indipendentemente l'una dall'altra; ammassi neurofibrillari molto simili o addirittura indistinguibili da quelli riscontrati nell'AD sono stati descritti in più di una dozzina di altre patologie neurodegenerative, quasi in tutti i casi in assenza di depositi di A $\beta$  o placche senili.

Inoltre depositi di A $\beta$  possono essere riscontrati nella corteccia cerebrale di anziani cognitivamente normali in assenza di ammassi neurofibrillari. Nelle placche senili si può dimostrare la presenza di numerose altre molecole, la maggior parte delle quali di significato infiammatorio. Vi sono evidenze che ApoE4, C1q e altre molecole possano legarsi alla A $\beta$  e accelerare la formazione di fibrille (Strittmatter et al., 1993; Webster et al., 1997; Snow et al., 1995); altre invece, come la clusterina, possono inibirla (Ghisso et al., 1993). La fibrillogenesi potrebbe essere quindi determinata da uno squilibrio tra i fattori che la favoriscono e quelli che la inibiscono (Verbeek et al., 1997). È interessante

---

notare che la densità di placche senili e di ammassi neurofibrillari in alcune aree corticali è stata correlata con la gravità del decadimento cognitivo (Caramelli et al., 1998). Nelle arteriole e venule meninge e in quelle che attraversano la corteccia cerebrale sono presenti depositi di A $\beta$  (Angiopatia Amiloide Congofila; Glenner et al., 1984; Glenner et al., 1984), localizzati nella membrana basale e che si estendono nel tessuto circostante (Verbeek et al., 2000), costituiti principalmente da A $\beta$  [1-40] (Suzuki et al., 1994). Esperimenti sia in vivo che in vitro dimostrano che i depositi di A $\beta$  provocano degenerazione delle cellule muscolari lisce e, come conseguenza, un difetto dell'integrità della barriera ematoencefalica. Questo, a sua volta, potrebbe contribuire all'alterazione della microcircolazione e ai problemi energetici cerebrali dei pazienti AD (Kalaria, 1992). Associati ai depositi amiloidei sono riscontrabili cellule della serie monocitomacrofagica che in alcuni casi sembrano precedere la deposizione di A $\beta$ , facendo ipotizzare per quest'ultima un significato di conseguenza più che di causa; queste considerazioni, cui si aggiunge l'evidenza di cellule microgliali associate alle placche senili, richiamano l'attenzione sul significato delle popolazioni di origine monocitomacrofagica (di cui anche gli elementi microgliali fanno parte) nella genesi ed evoluzione delle lesioni tipiche dell'AD. I depositi amiloidei si interrompono bruscamente quando il vaso passa nella sostanza bianca sottocorticale, ove infatti solo rari vasi presentano i depositi di A $\beta$ ; l'estensione dell'angiopatia amiloide varia considerevolmente anche tra individui con una quantità di A $\beta$  parenchimale confrontabile.

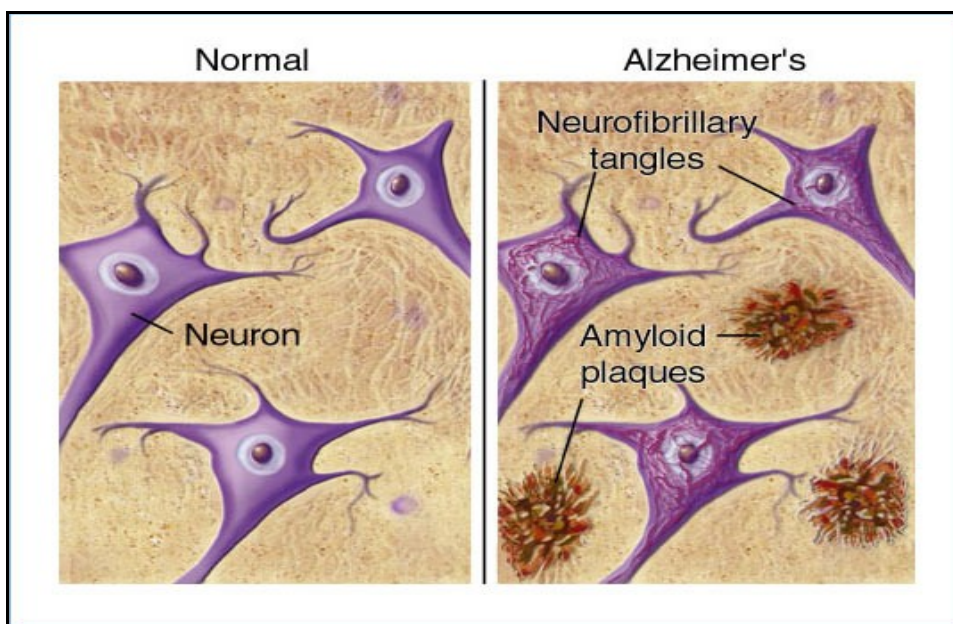


Figura 2 : Esempio schematico di placche di amiloide e grovigli neurofibrillari

#### 1.1.1.4 Biologia della proteina $\beta$ -Amiloide

La proteina A $\beta$  deriva dal suo precursore APP a seguito di tagli sequenziali da parte di diversi enzimi. Il termine APP comprende un gruppo eterogeneo di polipeptidi espressi ubiquitariamente nell'organismo, eterogenei sia per la presenza di diverse isoforme (le tre maggiormente rappresentate di 695, 751 e 770 residui) sia per modificazioni post-traduzionali, tra cui glicosilazioni, solfatazioni e fosforilazioni (Oltersdorf et al., 1990; Hung e Selkoe, 1994; Walter et al., 1997;



Weidemann et al., 1997). Le isoforme contenenti 751 e 770 residui sono largamente espresse sia dalle cellule non neuronali che da quelle neuronali, invece l'isoforma contenente 695 residui è espressa in maggiore quantità dai neuroni (Haass et al., 1991). La differenza tra le isoforme 770/751 e 695 consiste nella presenza nelle prime due di un esone codificante un enzima inibitore della serina proteasi (KPI); nelle piastrine umane le isoforme contenenti il dominio KPI hanno la funzione di inibitori del fattore XIa, serina proteasi, implicata nella cascata della coagulazione (Smith et al., 1990). La APP è una proteina a singolo dominio transmembrana traslocata in sede tradizionale nel reticolo endoplasmico; sia durante che dopo il transito nella via secretoria può andare incontro a tagli sequenziali con la produzione di derivati secreti nel lume vescicolare o nello spazio extracellulare. Il taglio proteolitico operato dalla  $\alpha$ -secretasi (Esch et al., 1990; Sisodia et al., 1990) porta al rilascio di un grosso frammento solubile ( $\alpha$ -APPs) nello spazio extracellulare (o nel lume); residua un frammento transmembranario di 83 residui aminoacidici (C83; Esler e Wolfe, 2001). Alternativamente la APP può essere scissa da una  $\beta$ -secretasi, che taglia un frammento solubile di dimensioni ridotte rispetto a quello generato dalla  $\alpha$ -secretasi, residuando un frammento transmembranario di 99 residui (C99; Seubert et al., 1993). L'enzima che opera l'attività  $\beta$ -secretasica è stato identificato e denominato BACE ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme; Vassar e Citron, 2000). L'attività del BACE risulta essere ottimale a pH acido e l'enzima preferenzialmente è attivo all'interno degli endosomi.

Per rispondere a questo requisito è necessario che la APP sia trasportata dalla superficie all'interno della cellula (Perez et al., 1999). Il prodotto del BACE può essere in seguito trasferito sulla superficie cellulare dove diventa substrato per la  $\gamma$ -secretasi (Selkoe, 2001). L'azione della  $\gamma$ -secretasi sui frammenti transmembranari residuati dall'azione della  $\alpha$  e  $\beta$  -secretasi porta al taglio e secrezione di due frammenti proteici: rispettivamente p3 (Haass et al., 1992) e A $\beta$  (Fig. 3).

Il peptide p3 non si trova generalmente nel "core" delle placche di amiloide, ma va soprattutto ad accumularsi in depositi di amiloide in aree selezionate del cervello di pazienti AD (Higgins et al., 1996).

Il peptide A $\beta$  (che esiste in due isoforme: A $\beta$  [1-40] e A $\beta$  [1-42]) è costitutivamente prodotto e rilasciato dalle cellule in condizioni di normalità (Haass et al., 1992, Seubert et al., 1992; Busciglio et al., 1993), ed è misurabile nel liquido cefalorachidiano e nel plasma di soggetti normali durante tutta la vita. Non è ancora precisamente determinato in quale punto della catena sintetica dell'APP avvenga il taglio enzimatico operato dalla  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ -secretasi; una consistente parte della  $\alpha$ -APPs può essere generata dall'azione dell' $\alpha$ -secretasi sulla APP inserita nella membrana plasmatica (Sisodia, 1992), ma può essere generata anche durante la catena sintetica intracellulare della APP (Sambamurti et al., 1992; De Strooper et al., 1993). L'azione della  $\beta$ -secretasi può avvenire, almeno in parte, durante le ultime fasi dei processi sintetici post-traduzionali (Haass et al., 1995); i siti in cui è operato il taglio dei frammenti C99 e C83 da parte della  $\gamma$ -secretasi sono ancora oggetto di studio.

Sembra che i frammenti A $\beta$ [1-40] e A $\beta$ [1-42] siano generati in percentuale considerevole durante l'internalizzazione e la processazione endosomiale dell'APP (Koo e Squazzo, 1994; Perez et al., 1999). I livelli di A $\beta$  nel CSF umano sono compresi nell'intervallo 3–8nM (Motter et al., 1995), mentre la quantità plasmatica è generalmente minore di 500pM. Sia la forma A $\beta$  [1-40] che A $\beta$  [1-42]

possono essere identificate nel CSF e nel plasma. È stato dimostrato che i frammenti C99 e C83 (substrati della  $\gamma$ -secretasi) originano da molecole di APP completamente glicosilate (Haass et al., 1995; Weidemann et al., 1997), suggerendo che l'attività  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -secretasica avvenga principalmente sulla superficie cellulare o in prossimità di essa, probabilmente in gran parte durante il ricircolo endosomiale (Perez et al., 1999). Nella cellula neuronale, che esprime livelli di APP tra i più alti dell'intero organismo (soprattutto APP695), la molecola APP può essere trasportata lungo l'assone sia in senso anterogrado, sia in senso retrogrado verso il corpo cellulare e essere quindi traslocata sulla superficie somatodendritica (Yamazaki et al., 1995). La APP è presente in vescicole nei terminali assonali, anche se non specificamente nelle vescicole sinaptiche. Nonostante sia stato ipotizzato che il terminale assonale sia uno dei siti principali di produzione della A $\beta$ , non esistono ancora prove definitive al riguardo, essendo tutt'altro che remota la possibilità che la produzione di A $\beta$  avvenga durante il ricircolo endosomiale in altri siti neuronali. Inoltre, nonostante il neurone esprima abbondantemente la APP e sia in grado di secernere A $\beta$  in notevole quantità (Haass et al., 1992), anche altri stipiti cellulari nel tessuto cerebrale esprimono quantità variabili di APP (astrociti, microglia, cellule endoteliali e muscolari lisce) e potrebbero contribuire al processo di secrezione e deposizione della A $\beta$ . Inoltre, poiché in periferia praticamente tutte le cellule esprimono APP e sono in grado di generare la A $\beta$ , ed essendo la A $\beta$  presente nel plasma, non è da escludere la possibilità che quest'ultima sia in grado di superare la barriera ematoencefalica e depositarsi nel tessuto cerebrale (Poduslo et al., 1999).

Sono state proposte numerose funzioni per la famiglia di proteine della APP (APP Like proteins: APPLPs) e dei suoi derivati principali ( $\alpha$ -APPs): in particolare  $\alpha$ -APPs sembra avere proprietà autocrine (Saitoh et al., 1989) ed essere in grado di agire come fattore neuroprotettivo e probabilmente anche neurotrofico (Mattson et al., 1992; Mattson et al., 1993). Le isoforme di APP con 751 e 770 residui (contenenti il dominioKPI -inibitore della serina proteasi; Tanzi et al., 1988) sono in grado, negli studi in vitro, di inibire enzimi con proprietà serina proteasiche come la tripsina e la chimotripsina (Sinha et al., 1990); inoltre inibiscono il fattore IXa nella cascata coagulativa. Le isoforme secrete di APP possono conferire proprietà adesive cellula - cellula e cellula - substrato in coltura (Schubert et al., 1989). È stato suggerito sulla base dei risultati di studi in vitro che la APP inserita nella membrana plasmatica possa avere un ruolo nelle interazioni cellulari.

Non vi sono evidenze che nei soggetti affetti da AD vi sia una perdita di funzione della APP, viceversa sembra più probabile che mutazioni conferiscano alla APP proprietà tossiche, incrementando la produzione del frammento A $\beta$ , potenzialmente citotossico.

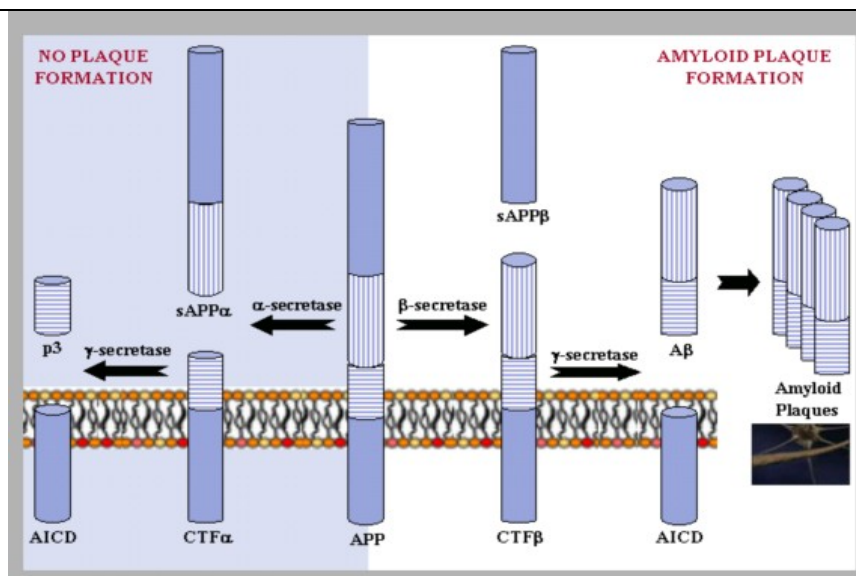


Figura 3: APP e suo processamento

Probabilmente l'accumulo di amiloide è solo il punto di confluenza cui giungono vie patogenetiche diverse. Molte ipotesi sono state formulate: alcune propendono per un'eccessiva produzione di A $\beta$ , altre per un ridotto catabolismo del precursore che provocherebbe la formazione e l'accumulo di molecole con la spontanea tendenza ad aggregarsi (per ridotta attività degli enzimi del catabolismo o a causa di mutazioni della APP che ne ostacolano il metabolismo). Secondo alcuni autori (Teller et al., 1996) nei soggetti sani la forma A $\beta$  [1-42] non si accumulerebbe grazie ad una più rapida clearance. La glicosilazione della molecola di A $\beta$  può facilitarne l'aggregazione rendendola più resistente alle proteasi e meno solubile (Tabaton et al., 1997). Anche le mutazioni genetiche identificate non sono dirimenti, in quanto, fatta eccezione per quelle riguardanti il gene per APP sul cromosoma 21 che deporrebbero per un problema qualitativo o quantitativo dell'APP, le altre sembrano essere associate ad un'APP normale.

Studi di genetica molecolare relativi all'APP in forme di AD familiare hanno permesso di dimostrare che qualunque mutazione presente nel gene va ad aumentare la tendenza di A $\beta$  ad aggregare in vitro (Chartier-Harlin et al., 1991; Hendriks et al., 1992). Invece studi più recenti, condotti su topi transgenici *Tg2576* (che esprimono la proteina APP mutata e rappresentano il modello murino dell'AD), hanno messo in evidenza che deficit cognitivi significativi nell'AD sono attribuibili direttamente ad una forma di A $\beta$  secreta naturalmente (Lesnè and Kotilinek, 2005; Lesnè et al., 2006). L'ipotesi che questa forma di amiloide solubile possa essere importante nella fase di esordio della patologia è attualmente presa in esame da parecchi gruppi (Watson et al., 2005; Oddo et al., 2006; Townsend et al., 2006). Inoltre, Postina e colleghi, usando topi transgenici, dimostravano che la attivazione dell' $\alpha$ -secretasi potrebbe costituire un'opportunità terapeutica perchè ostacolerebbe l'accumulo di A $\beta$  a livello cerebrale (Postina et al., 2004). Infatti, dall'azione dell' $\alpha$ -secretasi sull'APP viene liberato un frammento solubile N-terminale (APPs $\alpha$ ), che ha proprietà neurotrofiche e neuroprotettive (Furukawa et al., 1996). Risulta interessante evidenziare il fatto che è stata sottolineata una evidente riduzione di APPs $\alpha$  nel liquido cerebrospinale di pazienti AD (Lannfelt et al. 1995; Sennvik et al. 2000).

---

### 1.1.1.5 Ruolo delle preseniline

La presenilina in forma di oloproteina (del peso di circa 44 kDa) va incontro costitutivamente a endoproteolisi in molti tessuti, compreso il cervello, e nella maggior parte dei casi si trova sotto forma di eterodimeri stabili, composti dal frammento NH<sub>2</sub> terminale (NTF) e COOH terminale (CTF). I livelli tissutali e cellulari estremamente bassi della oloproteina, insieme all'evidenza che questa è rapidamente convertita in frammenti (Podlisny et al., 1997), probabilmente nel reticolo endoplasmatico, e stabilizzata nel Golgi (Zhang et al., 1998), suggeriscono che la principale forma in cui le preseniline si trovano a livello cellulare e tissutale sia quella frammentata. I livelli medi dei frammenti NTF e CTF sembrano essere rigidamente controllati, infatti anche in caso di aumentata espressione del gene *PSEN1* in topi transgenici o in cellule transfettate, la quantità dei frammenti non varia significativamente (Borchelt et al., 1996; Thinakaran et al., 1997) e il loro eccesso è rapidamente rimosso, soprattutto dai proteosomi (Kim et al., 1997; Steiner et al., 1998). Una volta formati, i frammenti delle preseniline possono associarsi in complessi di 100 – 200 kDa che potrebbero rappresentare la loro principale forma (Capell et al., 1998; Yu et al., 1998).

Studi effettuati su animali hanno portato a riconoscere alle preseniline un ruolo nella segnalazione cellulare mediata dal Notch (Levitan et al., 1996; Baumeister et al., 1997), ed hanno inoltre dimostrato che, sebbene in piccola quantità, le preseniline entrano a far parte di complessi molecolari siti in corrispondenza della superficie cellulare, in associazione alla nicastrina (Kaether et al., 2002) e a proteine della famiglia delle caderine (Georgakopoulos et al., 1999), molecole implicate nella adesione cellulare. Topi knock out per i geni delle preseniline esprimono livelli normali della oloproteina APP e normali derivati secretori delle  $\alpha$  e  $\beta$ -secretasi, mentre la funzione della  $\gamma$ -secretasi risulta essere compromessa (De Strooper et al., 1998). Il tessuto cerebrale di questi topi e i loro stessi neuroni in coltura accumulano elevate quantità dei substrati della  $\gamma$ -secretasi derivati dalla APP, C83 e C99 (Xia et al., 1998): in concomitanza con questi eventi si osserva anche una marcata riduzione (fino al 70%) della produzione di A $\beta$  [1-40] e A $\beta$  [1-42] (De Strooper, et al., 1998; Herreman et al., 2000; Zhang et al., 2000). Le evidenze del ruolo giocato dalle preseniline nel processo proteolitico della  $\gamma$ -secretasi sono rafforzate dai risultati di numerosi esperimenti. Già in precedenza era stato dimostrato che le preseniline si possono legare con la APP in diversi tipi cellulari e con essa tendono ad immunoprecipitare, e che le interazioni tra le due molecole sono mediate verosimilmente dai rispettivi domini transmembrana (Weidemann et al., 1997; Xia et al., 1997).

Per spiegare il ruolo delle preseniline nell'attività della  $\gamma$ -secretasi sono state proposte due ipotesi generali: la prima, basandosi sulla capacità di preseniline e APP di coprecipitare, suggerisce che queste facciano parte del processo catalitico, presumibilmente come cofattori (Xia et al., 1997), la seconda suppone che abbiano solo un ruolo nel traffico di membrana di alcune proteine, inclusi i componenti della reazione della  $\gamma$ -secretasi (Naruse et al., 1998; Thinakaran et al., 1998).

Vi sono sempre più dati a sostegno dell'evidenza che le preseniline sono inseparabili dalla reazione della  $\gamma$ -secretasi, incluso il fatto che eterodimeri di presenilina in vescicole isolate sono in grado di produrre A $\beta$  (Xia et al., 1998). La mutazione di una o entrambe le molecole di aspartato nella regione transmembrana, residui conservati in tutte le preseniline, porta all'espressione di una oloproteina non più in grado di andare incontro alla endoproteolisi (Wolfe et al., 1999); si osserva inoltre una riduzione

---

di A $\beta$ [1-40] e A $\beta$ [1-42] e un rispettivo aumento dei substrati C83 e C99, in modo indistinguibile dalla delezione del gene *PSEN1* (De Strooper et al., 1998; Wolfe et al., 1999). L'interpretazione di questi risultati è controversa, la presenilina, infatti, potrebbe rappresentare un cofattore indispensabile per la  $\gamma$ -secretasi, oppure la presenilina stessa potrebbe identificarsi con la  $\gamma$ -secretasi, una proteasi intramembrana attivata mediante autoproteolisi (Wolfe et al., 1999). La questione ad oggi rimane irrisolta ma il fatto che sia stato possibile dimostrare che gli inibitori della  $\gamma$ -secretasi si legano specificamente e selettivamente agli eterodimeri di presenilina (Esler et al., 2000; Li et al., 2000) sembrerebbe supportare la seconda ipotesi.

E' stato successivamente dimostrato che la nicastrina (NCT), APH-1 e PEN-2 (Presenilin-Enhancer 2) sono dei componenti del complesso proteico delle preseniline essenziali per l'attività della  $\gamma$ -secretasi (Yu et al., 2000; Chung e Struhl, 2001; Levitan et al., 2001; Edbauer et al., 2002; Lopez-Schier e Johnston, 2002; Walker et al., 2006) (Fig. 4).

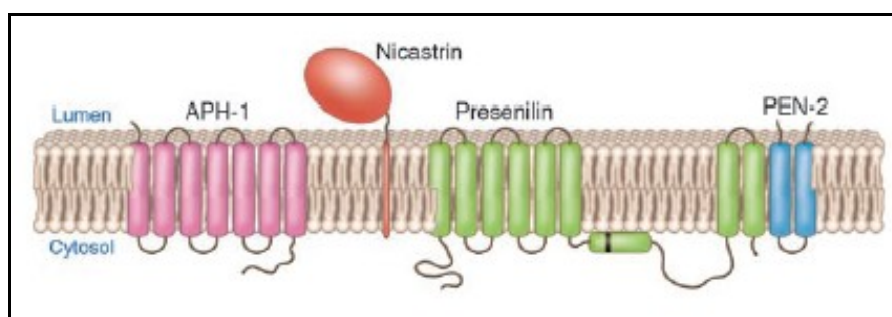


Figura 4: Complesso delle preseniline

Queste componenti proteiche sono necessarie e sufficienti per ripristinare l'attività della  $\gamma$ -secretasi nel lievito, un organismo privo di ogni attività endogena della  $\gamma$ -secretasi (Edbauer et al., 2003). La rimozione anche di una sola di queste proteine, impiegando la tecnologia Knock-out, comporta la perdita di attività della  $\gamma$ -secretasi e una ridotta espressione delle restanti componenti proteiche (Steiner et al. 2002, Li et al. 2003, Ma et al. 2005).

La NCT è una proteina transmembrana contenente siti di glicosilazione multipli, verosimilmente implicata nel trasporto delle preseniline sulla superficie cellulare (Chung et al., 2001): è quindi possibile che una piccola porzione delle preseniline legate alla NCT sia in grado di lasciare il reticolo endoplasmatico per localizzarsi in superficie e interagire con la  $\gamma$ -secretasi (Kaether et al., 2002).

Un altro importante ruolo della presenilina è legato alla segnalazione cellulare mediata da Notch, essenziale nello scambio di informazioni tra le cellule durante lo sviluppo (Greenwald, 1998; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Analisi genetiche hanno dimostrato, infatti, che il corretto funzionamento del complesso recettoriale del Notch è indispensabile per un corretto sviluppo di vertebrati e invertebrati (Kopan et al., 1996).

Studi su linee cellulari hanno messo in luce che le preseniline hanno un ruolo essenziale nel processo proteolitico di attivazione del Notch. La presenilina e il Notch interagiscono presumibilmente a livello della membrana plasmatica (Lah et al., 1997; Georgakopoulos et al., 1999; Ray et al., 1999;

---

Schwarzman et al., 1999).

Mutazioni che rendono priva di funzione la presenilina della *Drosophila* aboliscono il segnale impedendo che il NICD venga tagliato dalla membrana (Struhl e Greenwald, 1999; Ye et al., 1999), inoltre il fenotipo somatico e neurale del moscerino è molto simile a quello causato dalla delezione del Notch. Anche cellule murine prive di *PSEN1* presentano una marcata riduzione del taglio proteolitico del NICD (De Strooper et al., 1999; Song et al., 1999). Ulteriori evidenze dimostrano che le preseniline mutanti per un aspartato, bloccando la proteolisi dei frammenti C83 e C99, inibiscono anche il rilascio del NICD (Ray et al., 1999; Berezovska et al., 2000) portando all'ipotesi che la presenilina abbia un ruolo di cofattore essenziale nel processo proteolitico del Notch da parte della  $\gamma$ -secretasi, oppure che rappresenti essa stessa la proteasi ( $\gamma$ -secretasi).

#### 1.1.1.6 Aspetti biochimici

Il sistema colinergico è particolarmente colpito sia nell'invecchiamento normale sia nel processo patologico della malattia di Alzheimer. Nell'ippocampo e nella neocorteccia di pazienti con AD vi è, infatti, una marcata riduzione sia della colinoacetil-transferasi (ChAT) che dell'acetilcolina. La maggior parte dell'attività della ChAT della neocorteccia si riscontra nelle terminazioni presinaptiche del sistema ascendente originante dal nucleo basale di Meynert, i cui neuroni colinergici ricevono afferenze dall'ipotalamo, dall'amigdala, dal nucleo peripeduncolare, dal mesencefalo e dai nuclei del tronco encefalico. Essi proiettano a loro volta alla neocortex, alla corteccia entorinale, all'amigdala, all'ippocampo, al bulbo olfattivo, al talamo, all'ipotalamo e al tronco encefalico. Inizialmente, la riduzione dell'attività colinergica è stata attribuita a perdita neuronale a carico del nucleo basale di Meynert e correlata con la presenza delle alterazioni istopatologiche dell'AD. Tale ipotesi è stata poi ridimensionata, in seguito al riscontro di una riduzione dell'attività della ChAT anche in zone prive d'alterazioni istopatologiche tipiche, come il nucleo caudato, dove non si riscontrano, infatti, né placche senili né ammassi neurofibrillari. In antitesi alla stessa ipotesi è anche l'evidenza che, non raramente, in pazienti AD manca la degenerazione del nucleo di Meynert, e che i deficit colinergici divengono apparenti relativamente tardi nel corso della patologia (Davis et al., 1999). La specificità stessa delle alterazioni delle proiezioni colinergiche corticali a partenza dal nucleo basale è stata messa in discussione da alcuni autori. Inoltre, è possibile dimostrare nel cervello dei soggetti AD una perdita anche di neuroni monoaminergici e delle funzioni noradrenergiche, GABAergiche, glutammatergiche e serotoninergiche. A carico della corteccia colpita inoltre è riscontrabile una marcata riduzione della concentrazione di numerosi neurotrasmettitori neuropeptidici quali la sostanza P, la colecistochinina e la somatostatina; tuttavia ancora non è chiaro quale delle sopra elencate anomalie (comprese quelle a carico del sistema colinergico) sia primaria o secondaria alla perdita neuronale, che è risulta, di fatto, eterogenea.

#### 1.1.1.7 Genetica dell'AD

Negli ultimi decenni è risultato chiaro che la malattia di Alzheimer può essere considerata anche una patologia genetica (dato che è stata riscontrata in molte famiglie) che si trasmette in maniera autosomica dominante. Si calcola che la prevalenza di questa forma genetica di AD vari da un 2-3% fino a una percentuale superiore al 30%. Dal punto di vista fenotipico la forma familiare di AD (FAD) e

---

i casi sporadici della stessa patologia (SAD) sono molto simili e spesso indistinguibili, tranne per l'età d'esordio che risulta più precoce per le forme autosomiche dominanti conosciute.

#### 1.1.1.7.1 AD familiare (FAD)

Benché l'AD sia tipicamente una patologia tardiva legata all'invecchiamento vi sono casi ad insorgenza precoce. Questo ha permesso di suddividere la malattia in forme ad esordio precoce (EOAD: Early Onset AD) e ad esordio tardivo (Late Onset AD). Soggetti che esordiscono entro i 65 anni rientrano nella categoria EOAD e costituiscono circa 1% dei casi totali (Rocca et al., 1986). Le forme ad esordio precoce sono generalmente familiari (FAD) di tipo autosomico dominante.

Ad oggi le mutazioni identificate come responsabili delle forme familiari ad esordio precoce sono localizzate in tre geni codificanti per l'APP sul cromosoma 21 (Goate et al., 1991), sul gene della presenilina 1 (*PSEN1*) sul cromosoma 14 (Sherrington et al., 1995) e sul gene per la presenilina 2 (*PSEN2*) sul cromosoma 1 (Levy-Lahad et al. 1995).

La prima causa genetica riconosciuta di AD è stata una mutazione missenso di APP scoperta attraverso studi di linkage (Goate et al., 1991). Sono state descritte 32 mutazioni sul gene per la proteina APP riscontrate in 85 famiglie, i cui membri sviluppano solitamente la malattia prima dei 65 anni, spesso nella sesta decade ([www.molgen.ua.ca.be](http://www.molgen.ua.ca.be)). Le mutazioni correlate all'AD sono localizzate in prossimità dei siti di taglio della  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -secretasi e sono state correlate ad una aumentata produzione di  $A\beta$ , suggerendo che nella patogenesi giochi un ruolo determinante un'alterazione dei processi proteolitici operati dalle secretasi. Un'altra possibilità, con cui alterazioni nella APP predispongono allo sviluppo di AD, riguarda la sovra-espressione di una proteina APP strutturalmente inalterata. Nella trisomia del cromosoma 21 (su cui si trova il gene della APP) che provoca Sindrome di Down, le alterazioni neuropatologiche tipiche della malattia di Alzheimer compaiono quasi invariabilmente nella media età adulta, e si può riscontrare un'aumentata produzione di peptidi  $A\beta$  [1-40] e  $A\beta$  [1-42] durante tutta la vita del paziente: placche diffuse (costituite da  $A\beta$  [1-42]) possono essere messe in evidenza già in età adolescenziale (Lemere et al., 1996). In effetti, questi soggetti presentano inizialmente depositi di soli peptidi  $A\beta$  [1-42], mentre solo alla fine della terza decade di vita iniziano ad associarsi accumuli di  $A\beta$  [1-40], microgliosi, astrocitosi, neuriti distrofiche e ammassi neurofibrillari. Le lesioni tipiche dell'AD in questi soggetti si associano spesso alla perdita progressiva delle funzioni cognitive e ad alterazioni comportamentali dalla quarta decade di vita (Lemere et al., 1996; Mann et al., 1995). Sebbene sia difficile dimostrare che le alterazioni neuropatologiche nei soggetti con trisomia 21 siano da attribuire specificamente alla duplicazione del gene APP e non ad altri loci sul cromosoma 21 sovranumerario, indizi in questo senso sono forniti da casi di traslocazione del cromosoma 21 con punto di rottura telomerico rispetto al gene APP, risultando nella non duplicazione di questo gene, che pur producendo un fenotipo compatibile con Sindrome di Down non porta alle alterazioni neuropatologiche tipiche dell'AD né alle alterazioni comportamentali nella quarta decade di vita.

Lo studio di famiglie con FAD non legata alle mutazioni sul cromosoma 21 ha portato alla localizzazione sul cromosoma 14 di mutazioni in grado di causare una forma familiare autosomica dominante di AD nella sesta, quinta e a volte quarta decade di vita. Il gene mutato è stato chiamato

Presenilina 1 (*PSEN1*), del quale oggi si conoscono almeno 176 mutazioni (Schellenberg et al., 1992; Sherrington et al., 1995), che sono state descritte in 390 famiglie di diversa origine etnica con FAD ad esordio precoce. Sul cromosoma 1, poco tempo dopo, è stato scoperto un altro gene, chiamato Presenilina 2 (che presenta il 67% di omologia con il gene *PSEN1*), riconosciuto responsabile dei casi di FAD ad esordio precoce in famiglie tedesche e italiane (Levy-Lahad et al., 1995), del quale si conoscono almeno 14 mutazioni descritte in 23 famiglie ([www.molgen.ua.ca.be](http://www.molgen.ua.ca.be)).

Mutazioni missenso che producono la sostituzione di un aminoacido in questi due geni sono responsabili diversi casi di FAD in tutto il mondo. Le mutazioni del gene della Presenilina 1 (*PSEN1*) provocano le forme più aggressive di AD, causando il decesso del paziente di solito durante la settima decade di vita. Le mutazioni dei geni delle Preseniline producono un aumento della produzione di frammenti A $\beta$  [1-42], i cui livelli raddoppiano sia nel plasma che nel medium di coltura di fibroblasti di pazienti affetti (Scheuner et al., 1996; Duff et al., 1996; Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997; Tomita et al., 1997; Xia et al., 1997). Topi transgenici per la APP mutata umana incrociati con topi esprimenti una forma mutata della *PSEN1* generano una progenie con lesioni tipiche della AD molto accelerate (a 3-4 mesi di vita; Holcomb et al., 1998) sottolineando l'importanza delle preseniline nel processamento della APP.

Recentemente è stato dimostrato che nei pazienti FAD mutazioni delle preseniline agiscono sinergicamente con mutazioni dell'APP andando ad incrementare nel tessuto cerebrale la concentrazione extracellulare delle placche contenenti A $\beta$  [1-42] di 1,5–3 volte rispetto ai casi con AD sporadica (Lemere et al., 1996; Mann et al., 1996). Le funzioni del prodotto del gene delle preseniline sono verosimilmente legate alla proteolisi dell'APP; nei topi la delezione omozigote di *PSEN1* è patogena, mentre la delezione eterozigote porta ad un fenotipo normale. Inoltre, i topi nati dall'incrocio di eterozigoti knock-out per il gene della presenilina con topi esprimenti il gene *PSEN1* umano mutato, sopravvivono e presentano solo minime alterazioni (Davis et al., 1998; Probst et al., 1989). Questi dati suggeriscono che le mutazioni missenso dei geni delle preseniline che causano una FAD ad esordio precoce agiscono tramite acquisto di funzione piuttosto che per perdita. Inoltre sono state identificate altre tipologie di mutazioni sul gene per *PSEN1* come ad esempio piccole delezioni o mutazioni nei siti di splicing. La mutazione più dannosa è stata riscontrata in un sito donatore-accettore di splicing che causa la sostituzione di due aminoacidi e una delezione dell'esone 9 (Bentahir et al., 2006).

#### **1.1.1.7.2 AD sporadico (SAD)**

La SAD è considerata una patologia multifattoriale. I principali fattori di rischio di carattere non genetico per l'insorgenza dell'AD sono: il basso tasso di scolarità, il trauma cerebrale, le malattie cardiovascolari, gli alti livelli di colesterolo e il fumo. Nessuno di questi tuttavia si è dimostrato essere il fattore causale della patologia. L'unico fattore di rischio accertato è l'invecchiamento anche se la probabilità di sviluppare AD oltre i 95 anni di età risulta essere molto bassa.

Fra i fattori genetici, diversi geni candidati sono stati proposti. Ad oggi, il fattore di rischio più noto è rappresentato dall'allele  $\epsilon 4$  della ApoE.

Il gene che codifica per la apolipoproteina E (ApoE) è localizzato sul cromosoma 19q13.32, un sito

---



che già in precedenza era stato dimostrato avere un linkage genetico con FAD ad esordio tardivo in alcune famiglie (Strittmatter et al., 1993). La relazione tra malattia di Alzheimer e ApoE è stata confermata da più di 100 studi condotti in differenti gruppi di popolazioni. Il gene per l'ApoE è polimorfico, presenta tre diversi alleli,  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$ , le cui frequenze nella popolazione caucasica sono rispettivamente 8%, 78% e 14% (Corder et al., 1993).

L'allele  $\epsilon 4$  si presenta con una frequenza maggiore nei soggetti con AD rispetto alla popolazione generale, inoltre è associato con un aumentato rischio di sviluppare la malattia nonché con una più precoce età di insorgenza rispetto ai soggetti che presentano gli alleli  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 2$  (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993); esistono inoltre evidenze che la presenza dell'allele  $\epsilon 2$  protegga dallo sviluppo della AD (Corder et al., 1994). L'allele  $\epsilon 4$  è associato principalmente con un esordio della malattia tra la settima e l'ottava decade di vita; la presenza di un singolo allele aumenta il rischio di sviluppare la malattia da 2 a 5 volte, mentre la presenza di  $\epsilon 4$  in forma omozigote aumenta questo rischio ben oltre le 5 volte.

Tuttavia è doveroso sottolineare che la presenza dell'allele  $\epsilon 4$  del gene della ApoE è solo un fattore di rischio e che non porta necessariamente al manifestarsi della patologia. La presenza in elevata percentuale della proteina ApoE in associazione con i depositi di  $A\beta$  nel tessuto cerebrale era stata dimostrata ancora prima di riconoscere nell'allele  $\epsilon 4$  un fattore di rischio per AD (Namba et al., 1991); ulteriori studi hanno dimostrato che il tessuto cerebrale di pazienti esprimenti l'ApoE4 presenta una maggiore quantità di depositi di  $A\beta$  rispetto ai controlli non portatori dell'allele  $\epsilon 4$  (Rebeck et al., 1993; Schmechel et al., 1993; Gearing et al., 1996). Anche i depositi neurofibrillari sembrano essere presenti in maggiore quantità nei pazienti con ApoE4, sebbene senza la significatività statistica mostrata invece dall'aumento dei depositi di amiloide.

Un riscontro interessante è che nel tessuto cerebrale di ultraottantenni senza chiari sintomi della malattia ed esprimenti ApoE4 si possono trovare depositi di amiloide  $A\beta$  [1-42] in aumentata quantità, suggerendo che l'allele  $\epsilon 4$  possa essere associato ad una aumentata attività amiloidogena in periodo presintomatico o in soggetti che non svilupperanno la patologia (Polvikoski et al., 1995).

Il meccanismo mediante il quale l'ApoE4 favorisce un'aumentata produzione di amiloide non è facile da riconoscere, ma sembra che ApoE4 sia in grado di aumentare i livelli medi dei peptidi  $A\beta$ , soprattutto di  $A\beta$  [1-40] (Gearing et al., 1996) nel tessuto cerebrale, presumibilmente riducendone la clearance dal tessuto stesso. Studi in vitro dimostrano un aumento della fibrillogenesi di peptidi sintetici di  $A\beta$  in presenza della proteina ApoE4 rispetto alle altre forme, sebbene non sia chiaro se ApoE4 agisca come stimolatore della fibrillogenesi o funga da inibitore meno efficace (Evans et al., 1995). Su colture neuronali, derivate da topi transgenici esprimenti ApoE4 o ApoE3, la crescita neuritica è significativamente diminuita in presenza della ApoE4, suggerendo come ipotesi alternativa che la patogenesi sia legata ad una maggiore vulnerabilità del neurone. Tuttavia, il fatto che nei soggetti esprimenti ApoE4 si riscontri un'aumentata deposizione di amiloide anche in sede vascolare meningea (extraparenchimale), anche in assenza di AD, sembra separare i due effetti (aumento della deposizione di  $A\beta$  e danneggiamento neuronale) e supportare maggiormente l'ipotesi della aumentata produzione/ridotta clearance della  $A\beta$ . Va inoltre tenuto presente che tutti gli studi in vitro sull'ApoE richiedono che questa sia assemblata in lipoproteine, e ciò fa sospettare che anche il

metabolismo lipidico possa essere coinvolto nella patogenesi della AD.

Nonostante ci sia una forte associazione tra l'insorgenza dell'AD sporadico e presenza dell'allele  $\epsilon 4$ , il 50% dei soggetti AD non possiede tale variante allelica. Ciò designa l'allele  $\epsilon 4$  come marcatore di suscettibilità che agendo sinergicamente con altri fattori genetici o ambientali diviene in grado di incrementare il rischio di insorgenza della patologia e, verosimilmente, altri fattori di rischio genetici contribuiscono all'insorgenza dell'AD (Kamboh, 2004).

Recentemente diversi studi di associazione di tipo genome-wide (GWAS: Genome-Wide Association Studies, Fig. 5) hanno evidenziato la presenza di altri possibili loci di suscettibilità per l'insorgenza della malattia di AD, tra cui i cromosomi: 1, 4, 6, 9, 10, 12 e 19. I loci più promettenti sono quelli posizionati sui cromosomi 9 e 10 (Grupe et al., 2006; Li et al., 2008). Questo tipo di studio è basato sull'analisi di SNP dell'intero genoma, ovvero di quelle sequenze di DNA che variano da individuo ad individuo e che si pensano responsabili della suscettibilità individuale a manifestare determinate malattie (Coon et al., 2007).

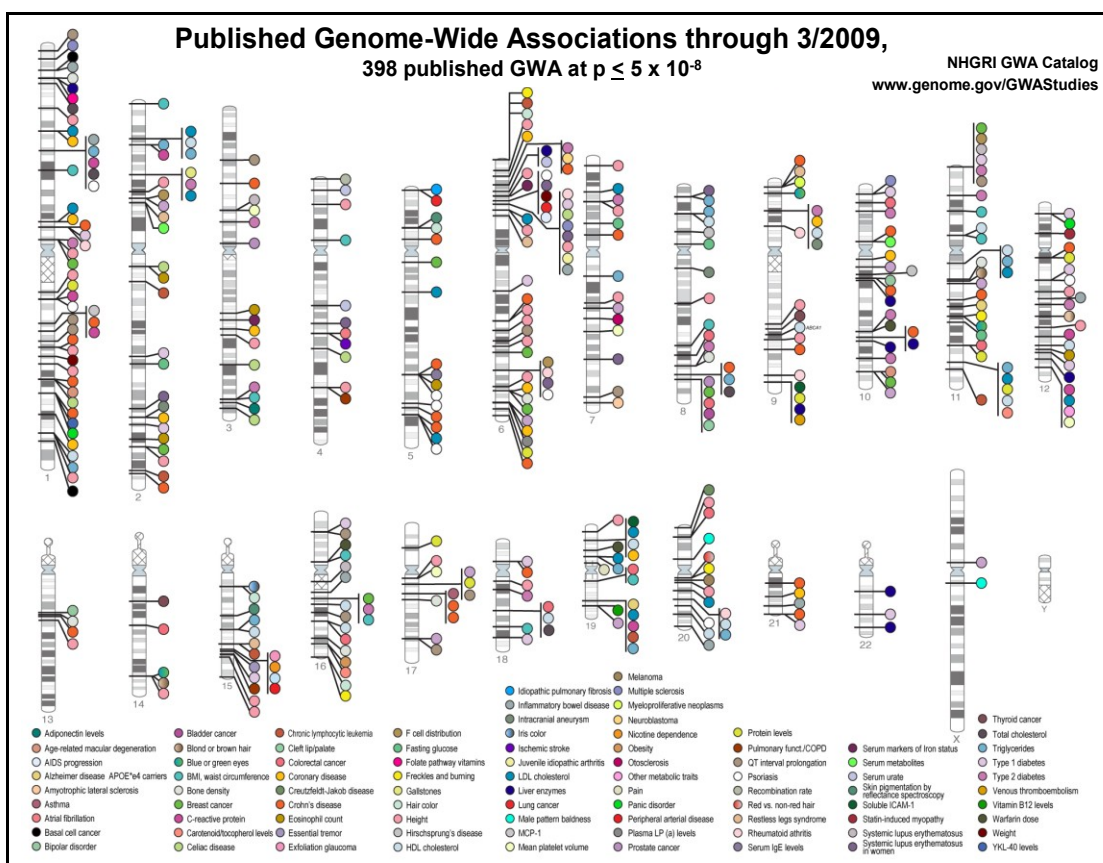


Figura 5: Studi di associazione genome-wide

Molti di questi studi si sono focalizzati su geni chiaramente coinvolti nella patogenesi dell'Alzheimer come ad esempio su geni codificanti per molecole infiammatorie (citochine e chemochine) o coinvolte nei meccanismi di stress ossidativo, entrambi considerati i maggiori protagonisti della patogenesi della malattia di Alzheimer .

Nella seguente tabella (Tab.1) sono riportati i geni responsabili dell'AD familiare ed i potenziali agenti di suscettibilità per i casi di AD sporadico.

*Tabella 1: Geni responsabili dell'AD familiare e sporadico*

<b>Gene</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Associazione</b>	<b>Referenze</b>
<i>APP</i>	21q21	Familiare	Goate et al., 1991
<i>PSEN1</i>	14q24.3	Familiare	Sherrington et al., 1995
<i>PSEN2</i>	1q31-q42	Familiare	Levy-Lahad et al., 1995
<i>APOE</i>	19q13.32	Sporadico	Corder et al., 1993
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	2q14-q21	Sporadico	Grimaldi et al., 2000
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	2q14-q21	Sporadico	Nicoll et al., 2000
<i>IL-1R</i>	2q14-q21	Sporadico	Du et al., 2000
<i>IL-6</i>	7p21	Sporadico	Grimaldi et al., 2000
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	6p21.3	Sporadico	Collins et al., 2000
<i>ACT</i>	14q32.1	Sporadico	Licastro et al., 2003
<i>A2M</i>	12p13.3-p12.3	Sporadico	Blacker et al., 1998
<i>MCP-1</i>	17q11.2-q12	Sporadico	Fenoglio et al., 2004
<i>RANTES</i>	17q11.2-q12	Sporadico	Huerta et al., 2004
<i>CCR2</i>	3p21.31	Sporadico	Galimberti et al., 2004
<i>CCR5</i>	3p21	Sporadico	Galimberti et al., 2004
<i>IP-10</i>	4q21	Sporadico	Venturelli et al., 2006
<i>NOS3</i>	7q36	Sporadico	Venturelli et al., 2005
<i>NOS1</i>	12q22	Sporadico	Galimberti et al., 2004

### **1.1.2 La Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD)**

La Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD) è un termine descrittivo che comprende una varietà di sindromi cliniche e che derivano da una degenerazione degli emisferi nella porzione anteriore. La FTLD comprende tre sindromi cliniche: la variante comportamentale della demenza frontotemporale (bvFTD), l'afasia primaria progressiva (PPA) e la demenza semantica (SD) (Neary et al., 1998).

La sindrome più comune è la bvFTD, caratterizzata da una profonda alterazione della personalità e del carattere e associata con un'atrofia bilaterale dei lobi frontali e temporali anteriori (Neary et al., 1998). I pazienti risultano disinibiti o apatici, socialmente non appropriati, distratti e indolenti. I maggiori deficit cognitivi si riscontrano nei domini dell'attenzione, astrazione, pianificazione e soluzione di problemi, mentre linguaggio, percezione e orientamento spazio-temporale sono conservati. Nonostante i pazienti non abbiano deficit amnesici, i test di memoria possono risultare deficitari a causa della disfunzione attentiva di natura frontale.

La PPA è un disordine che colpisce prevalentemente il linguaggio dei pazienti ed è caratterizzato da atrofia asimmetrica dell'emisfero sinistro, che coinvolge soprattutto la tradizionale area perisilviana del linguaggio (Neary et al., 1998). I pazienti hanno difficoltà nel recuperare le parole e sbagliano a pronunciare alcune di esse nel tentativo di fare un discorso, mentre la comprensione dei vocaboli è essenzialmente preservata. La demenza semantica (SD) è un disordine multi-modale che determina un'incomprensione del linguaggio, comporta atrofia bilaterale e asimmetrica della corteccia temporale. I soggetti che ne sono colpiti non riescono ad associare alle parole il loro significato.

La presentazione clinica della patologia dipende da quale parte del cervello viene colpita, se l'emisfero sinistro o se l'emisfero destro (Snowden et al., 2002). I pazienti hanno problemi nel dominio verbale, nella comprensione e nel nominare delle parole se presentano un'atrofia del lobo temporale sinistro, mentre sono caratterizzati da disturbi visivi, non riconoscono visi e oggetti familiari se hanno una più marcata atrofia del lobo temporale destro (Rosen et al., 2002).

Una porzione di pazienti con bvFTD sviluppano anche la malattia del motoneurone (MND), mentre nei i soggetti a cui è stata diagnosticata PPA o SD questo fatto è molto meno frequente (Catani et al., 2004). In ogni caso molti pazienti presentano caratteristiche cliniche appartenenti a più di una sindrome e nel tempo più patologie possono sovrapporsi. Rimangono però ben evidenti le differenze fenotipiche, ad esempio pazienti con SD non presentano mai problemi nel comporre un discorso come accade nell'afasia non fluente (PNFA). A dispetto del profondo mutamento del carattere e del comportamento che colpisce i soggetti con FTLD, in questa patologia la memoria viene pressochè risparmiata (Hou et al., 2004), cosa che non accade nella patologia di Alzheimer. Inoltre, rispetto all'AD, che è molto più frequente nelle donne, la FTLD colpisce in maniera uniforme entrambi i sessi e l'età di insorgenza è fissata tra i 45 e i 65 anni di età con un picco intorno ai 50 anni.

#### **1.1.2.1 Diagnosi e caratteristiche neuropatologiche**

I criteri clinici per la diagnosi dell'FTLD furono originariamente sviluppati dai gruppi di Lund e Manchester nel 1994. Anche se tali criteri mostrano una buona capacità di escludere la presenza di

---

AD, avevano diversi svantaggi: non davano indicazioni sul numero di caratteristiche cliniche richieste per la diagnosi o sulla relativa importanza di uno specifico sintomo e non provvedevano a dare una precisa definizione operativa di essi. Dopo la loro pubblicazione, è risultato chiaro che le due distinte sindromi PPA e SD mostrano molte similitudini.

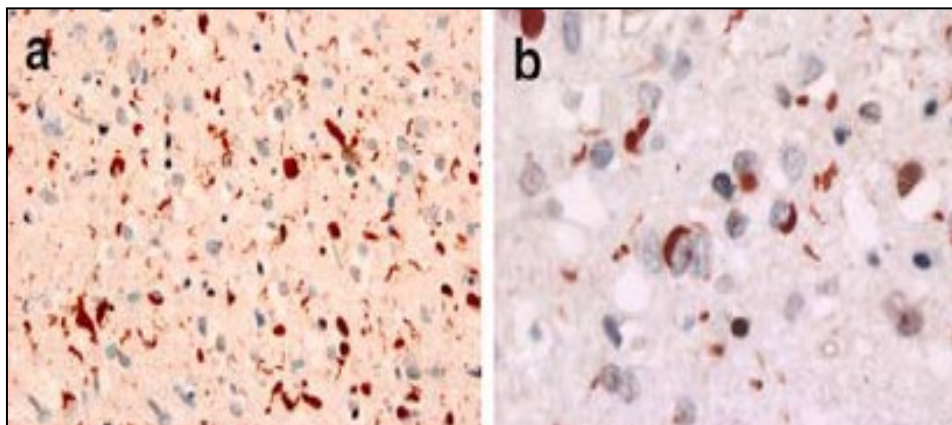
I criteri internazionali pubblicati successivamente (Neary et al., 1998), definirono precise caratteristiche cliniche per ciascuna delle tre varianti bvFTD, PPA e SD. Uno studio di tali criteri, basato su 34 casi patologici di FTLD tra una serie di 433 soggetti, ha riportato buona accuratezza della diagnosi, con sensibilità dell'85% e specificità del 99% (Knopman et al., 2005). In base ad essi, la bvFTD risulta essere molto più frequente della demenza semantica (dall'analisi di 300 casi familiari è emerso che il 40% era affetto da bvFTD mentre il 10% da SD). L'età di insorgenza è caratteristica per ciascuna sindrome, la bvFTD e la SD colpiscono soggetti più giovani (intorno ai 55 anni) rispetto ai pazienti con PPA (intorno ai 65 anni).

Dal punto di vista neuropatologico, la FTLD è caratterizzata da una severa degenerazione della corteccia frontale e temporale. Grazie alle tecniche di immunistochemica, è stato possibile identificare tre categorie di FTLD, classificate in base al tipo di inclusione patologica che si deposita all'interno dei neuroni.

Il deposito di filamenti citoplasmatici di proteina tau iperfosforilata caratterizza una percentuale di casi FTLD che includono anche la malattia di Pick e che vengono chiamati tauopatie (Spillantini et al., 1998).

Negli ultimi anni è emerso che molti casi di FTLD non hanno depositi di proteina tau, ma di ubiquitina (FTLD-U) (Hodges et al., 2004) e vi sono anche casi che non presentano nessun tipo di deposito (DLDH), pur essendo molto rari (Mackenzie et al., 2006). I soggetti colpiti da FTLD-U sono invece sempre più frequenti (40-65%). Dal punto di vista istologico questa tipologia è caratterizzata da neuriti immunoreattivi per l'ubiquitina (Fig. 6a), da depositi della stessa proteina nel citoplasma delle cellule neuronali (NCI) della corteccia frontale e temporale (Fig. 6b). I

noltre depositi di ubiquitina si ritrovano anche nel giro dentato dell'ippocampo e nel nucleo delle cellule (NII) con una distribuzione simile a quella delle inclusioni citoplasmatiche (Van der Zee et al., 2006).



*Figura 6: inclusioni di ubiquitina nei neuriti immunoreattivi (a) e nelle inclusioni citoplasmatiche neuronali (b)*

Nella tabella sotto riportata sono riassunte le principali caratteristiche cliniche della Degenerazione Lobare Frontotemporale a confronto con i tratti più salienti della malattia di Alzheimer (Tab. 2).

*Tabella 2: Caratteristiche cliniche dell'AD e della FTLD a confronto*

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

### 1.1.2.2 Genetica della FTLD

La Degenerazione Lobare Frontotemporale è un disordine geneticamente complesso in cui molti fattori genetici contribuiscono all'insorgenza e alla progressione della malattia.

Una storia familiare positiva per la demenza è stata riscontrata nel 40% dei soggetti affetti da FTLD che viene trasmessa in modalità autosomica dominante (Snowden et al., 2002). Nel 1994 una forma autosomica dominante di FTD con parkinsonismo è stata associata a una mutazione sul cromosoma 17q21.2 (Hutton et al., 1998; Wilhelmsen et al., 1994). Successivamente furono trovate altre famiglie affette da FTD associate al cromosoma 17 e fu quindi creata una denominazione specifica per questo tipo di patologie: FTDP-17. In tutti questi casi sono stati trovati filamenti citoplasmatici formati dalla proteina tau iperfosforilata. Fino ad oggi sono stati identificati attraverso studi di linkage altri numerosi loci associati con la patologia sui cromosomi: 3, 9p (due loci), 9q, 17q21 (due loci) e il cromosoma 17q24 (Brown et al., 1995; Lendon et al., 1998; Hosler et al., 2000; Vance et al., 2006; Morita et al., 2006). Inoltre in questi loci di suscettibilità sono stati identificati diversi geni (*MAPT*, *GRN* e *PSEN1*) che possono essere causa della FTLD familiare (Dermaut et al., 2004; Baker et al., 2006) (Tab. 3).

Tabella 3: geni di suscettibilità della FTLD familiare

<b>Gene</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Associazione</b>	<b>Referenze</b>
<i>GRN</i>	17q21.31	Familiare	Baker et al., 2006
<i>MAPT</i>	17q21.1	Familiare	Hutton et al., 1998
<i>PSEN1</i>	14q24.3	Familiare	Dermaut et al., 2004

### 1.1.2.2.1 Cromosoma 3

Nel 2004 Brown e collaboratori riportarono un'associazione tra la regione pericentromerica del cromosoma 3 e una famiglia multigenerazionale danese colpita da FTLD. Il gene coinvolto nella patologia di questa famiglia è stato identificato successivamente da Skibinski e collaboratori nel 2005. In particolare, si tratta di una mutazione nel sito accettore di splicing dell'esone 6 di CHMP2B (Charged Multivesicular Body Protein 2B), che fa parte del complesso ESCRTII (Endosomal Sorting Complex Required for Transport III), richiesto per la formazione della struttura dell'endosoma tardivo che si fonde con il lisosoma per degradare le proteine endocitate dalla cellula. La modificazione di una guanina con una citosina causa un fenomeno di splicing aberrante che porta alla formazione di un RNA messaggero contenente 201 bp dell'introne posizionato tra gli esoni 5 e 6. Tuttavia, le mutazioni sul gene che codifica per CHMP2B rappresentano una causa genetica rara di FTLD. Ciò è dovuto principalmente alla loro rara frequenza d'apparizione che dimostra come il locus contenente *CHMP2B* non incrementi il rischio di insorgenza di FTLD (Rizzu et al., 2006).

### 1.1.2.2.2 Cromosoma 9

La prima evidenza di un'associazione tra malattia del motoneurone (MND) e FTLD e il braccio lungo del cromosoma 9q21-22 è stata osservata da Hosler nel 2000. Recentemente, tre articoli hanno descritto separatamente l'associazione nelle famiglie affette da MND-FTD e il cromosoma 9p (Morita et al., 2006; Vance et al., 2006; Le Ber et al., 2009). In particolare, è stata identificata una regione di 10.26 Mb (9p 13.2-21.3) situata tra i marcatori D9S2154 e D9S1874 come locus sede di fattori di rischio genetico per FTLD e malattia del motoneurone (MND) e l'analisi dettagliata dei geni candidati ha rivelato un'associazione con le proteine associate all'ubiquitina (UBAP1) (S. Rollinson et al., 2009). In una famiglia, mediante un'estesa analisi di sequenziamento è stata identificata una mutazione non-senso (Q342X) nel gene *IFT74* (Intraflagellar Transport 74), responsabile del trasporto vescicolare di materiale dal corpo cellulare lungo l'assone ed i dendriti (Momeni et al., 2006). Tuttavia, nessuna mutazione causale è stata identificata in altre famiglie affette da MND-FTD.

Mutazioni nel gene *VCP* (Valosin-Containing Protein) sul cromosoma 9p21-12 sono state identificate come la causa di una rara sindrome familiare di miopatia a corpi inclusi (IBM) con morbo di Paget e demenza frontotemporale (IBMPFD, Kimonis et al., 2008). Finora sono state identificate 13 mutazioni

in 30 famiglie. Tale proteina funziona come chaperone molecolare in una varietà di attività cellulari, tra cui la degradazione delle proteine, l'apoptosi, il ciclo cellulare, la riparazione del DNA ed il rimodellamento delle membrane cellulari. Molte di queste attività sono direttamente o indirettamente regolate dal sistema ubiquitina-proteasoma (Mackenzie and Rademakers, 2007).

### 1.1.2.2.3 Cromosoma 17q21

Circa il 10-20% dei casi familiari di FLTD sono causati da mutazioni nel gene che codifica per la proteina tau (*MAPT*) che si trova sul cromosoma 17q21 (Spillantini et al., 1998). Ad oggi sono state identificate 44 differenti mutazioni in 132 differenti famiglie ([www.molgen.ua.ac.be](http://www.molgen.ua.ac.be)). Esse sono delezioni, mutazioni non senso, missenso o silenti nella regione codificante. Sono presenti anche mutazioni nella regione localizzata vicino al sito donatore di splicing dell'introne successivo all'esone 10 che viene, a causa di questa mutazione, trascritto, ma eliminato durante il processo di maturazione dell'RNA messaggero (splicing). Tutte le mutazioni sono concentrate tra l'esone 9 e l'esone 13 tranne due che sono state identificate recentemente e che si trovano nell'esone 1 (Rademakers et al., 2002). I possibili effetti che tali mutazioni provocano sulla proteina tau coinvolgono differenti meccanismi che dipendono dal tipo e dalla localizzazione della mutazione. Molte di queste sono implicate in un processo di splicing anomalo che porta alla produzione di differenti isoforme della proteina.

Un numero considerevole di mutazioni promuove l'aggregazione della proteina tau, mentre altre ne incrementano la fosforilazione (Goedert and Jakes et al., 2005).

E' interessante ricordare che sono state identificate numerose famiglie affette da FTLD di tipo autosomico dominante che sono geneticamente correlate con la regione cromosomica 17q21, ma che non presentano nessuna mutazione patogenetica sul gene *MAPT* (Van Der Zee et al., 2006). Il fenotipo neuropatologico in queste famiglie è simile a quello osservato in larga proporzione nei casi idiopatici di FTLD con depositi neuronali di ubiquitina (FTLD-U). Il sequenziamento del gene *MAPT* non ha dato nessun risultato e la proteina tau risulta normale e funzionante (Cruts et al., 2005). La regione che contiene il gene che causa questo gruppo di malattie è stata identificata con due tipi di marker ed è particolarmente ricca di geni (contiene 180 geni). Grazie al sequenziamento di circa 80 geni contenuti in questa regione è stata identificata la prima mutazione (c.90-91insCTGC) sul gene che codifica per la Progranulina (*GRN*), che consiste in un'inserzione di 4 paia di basi (CTGC) tra i nucleotidi 90 e 91 nell'esone 1, all'interno della regione codificante. Tale mutazione causa un frameshift e una prematura terminazione della trascrizione del gene (Baker et al., 2006). Gli stessi risultati furono replicati e implementati da Cruts e collaboratori che analizzarono altre famiglie affette da FTLD-U senza mutazioni nel gene *MAPT*. Essi identificarono una mutazione nell'introne che segue l'esone 0 di *GRN* (il primo esone che però non è codificante per la proteina) (IV0+5 G>C). Questo previene lo splicing dell'introne 0 e ciò non permette al RNA messaggero di uscire dal nucleo dove viene degradato senza essere tradotto (Cruts et al., 2006).

Non si conosce ancora il legame tra *GRN* e *MAPT* e la loro vicinanza sul cromosoma 17 è considerata per ora una semplice coincidenza. Sono state identificate ben 66 mutazioni nel gene *GRN* in 199 famiglie affette da FTLD (Fig. 7). E' interessante notare che tutte le mutazioni identificate creano alleli non funzionali che nella maggior parte dei casi portano ad una terminazione prematura della

---



trascrizione del gene e alla degradazione del RNA messaggero mutato (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006). La presenza di un allele non funzionale porta a una diminuita produzione di proteina invece della formazione di una proteina mutata che si deposita nei neuroni, come invece accade con la proteina tau. Il meccanismo attraverso cui una diminuzione di Progranulina porta a degenerazione neuronale è ancora sconosciuto.

Una stima della frequenza di mutazioni in *GRN* nei pazienti FTLD indica che essa appare in circa il 6%-10% dei casi di FTD, anche se le percentuali dipendono dal tipo di popolazione considerata (Snowden et al., 2006; Pickering-Brown et al., 2008). In Italia, la stima della frequenza di mutazioni in *GRN* è molto rara e corrisponde a circa 1.65% (Borroni et al., 2008). Di recente, è stata individuata una nuova mutazione nell'esone 7 che consiste in una delezione di 4 paia di basi (c.813-816delCACT), che potrebbe avere un effetto fondatore nel nord Italia (Benussi et al., 2008).

I soggetti affetti da FTLD-U presentano depositi citoplasmatici e nucleari di ubiquitina, mentre, nelle famiglie con mutazioni sul gene *GRN*, nei casi idiopatici di FTD e in alcuni casi di SLA, i depositi citoplasmatici sono composti prevalentemente da un'isoforma iperfosforilata della proteina che lega la regione TAR del DNA (TDP-43) (Neumann et al., 2006). Il legame tra la Progranulina e la TDP-43 il cui non funzionamento provoca neurodegenerazione non è ancora stato del tutto chiarito.

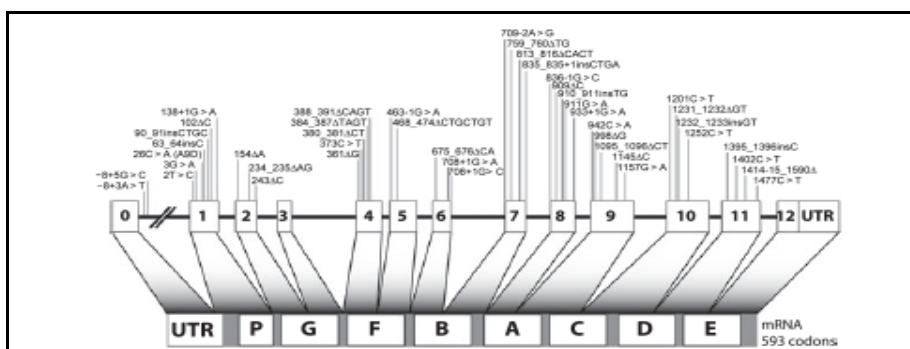


Figura 7: Mutazioni nel gene *GRN* riscontrate in pazienti affetti da FTLD

#### 1.1.2.2.4 Preseniline e FTLD

Nel 2000, è stata identificata una mutazione nel gene *PSEN-1* (L113P) in una famiglia con sei casi di demenza. I pazienti mostravano cambiamenti nella personalità e disordini comportamentali. Le analisi di neuroimmagine hanno confermato la diagnosi di FTLD. Gli autori hanno concluso, quindi, che le mutazioni a carico del gene *PSEN-1* possono essere associate alle caratteristiche cliniche della demenza frontotemporale (Raux et al., 2000).

Successivamente, è stata riportata in letteratura una nuova mutazione nel gene *PSEN1* (G183V) associata con un caso di FTD familiare caratterizzato neuropatologicamente dall'assenza di placche extracellulari di A $\beta$ , dalla presenza di corpi di Pick e da depositi di proteina tau (Dermaut et al., 2004). Nel 2005 Halliday e collaboratori hanno identificato un'altra mutazione (M146L) che è coinvolta nello sviluppo dei corpi di Pick anche se in questo caso sono presenti i depositi di proteina A $\beta$  (Halliday et al., 2005). Inoltre è stata riportata in un paziente con una diagnosi clinica di FTLD un'inserzione al codone 352 del gene *PSEN-1* (Tang-Wai et al., 2002). Studi sulle conseguenze funzionali di questa

mutazione hanno dimostrato che essa non incrementa i livelli A $\beta$ 42, cosa che invece avviene in presenza di altre mutazioni sullo stesso gene. È stato suggerito che essa potrebbe operare negativamente, diminuendo la produzione di amiloide attraverso l'inibizione dell'enzima  $\gamma$ -secretasi che così non potrebbe più agire sulla  $\beta$ -APP (Amtul et al., 2002).

Da Zekanowski e collaboratori, nel 2006, sono state identificate due nuove mutazioni nel gene *PSEN-1*: L226F e L424H. La prima è stata riscontrata in un paziente con diagnosi clinica di FTLD, ma con diagnosi neuropatologica di AD, mentre la seconda in un paziente con AD, ma con particolari segni a livello del lobo frontale. Gli autori del lavoro suggeriscono che queste due nuove mutazioni sono patogenetiche, ma causano la malattia di Alzheimer e non la FTLD, anche se agiscono come agenti genetici modificanti ancora sconosciuti, spostando le lesioni verso i lobi frontali e temporali (Zekanowski et al., 2006).

Recentemente, è stata identificata un'ulteriore mutazione V412I in un paziente affetto da demenza frontotemporale familiare ad esordio precoce. Tale dato suggerisce l'ipotesi che, in assenza di mutazioni nei geni *MAPT* e *GRN*, sarebbe opportuno studiare anche *PSEN-1* (Bernardi et al., 2008).

Per quanto riguarda il gene *PSEN-2*, sono state identificate tre mutazioni (T122R, M239V e Y231C), associate al fenotipo clinico di demenza precoce con disturbi comportamentali e del linguaggio, che mimano la FTLD (Binetti et al., 2003; Giovagnoli et al., 2006; Marcon et al., 2009).

#### **1.1.2.2.5 Ruolo dell'Apolipoproteina E (ApoE)**

L'ApoE4 è il fattore di rischio meglio conosciuto nei casi di AD sporadico a esordio tardivo, ma sono contrastanti i dati riguardo al suo ruolo nell'insorgenza di FTLD. Numerosi studi suggeriscono un'associazione tra FTLD e ApoE4 (Farrer et al., 1995; Helisalmi et al., 1996; Gustafson et al., 1997; Bernardi et al., 2006) anche se altri autori non la confermano (Geschwind et al., 1998; Short et al., 2002; Riemenscheider et al., 2002). Un'aumentata frequenza dell'allele  $\epsilon$ 4 è stata osservata nei soggetti affetti da SD comparati con pazienti con FTLD (Short et al., 2002). Tale diversità tra le informazioni riportate in letteratura potrebbe essere spiegata grazie a una recente scoperta che mette in relazione la FTLD e l'ApoE4 nei maschi, ma non nelle femmine (Srinivasan et al., 2006). Tuttavia in tutti gli studi finora condotti, il rischio conferito dalla presenza dell'allele  $\epsilon$ 4 nei soggetti affetti da FTLD sembra essere più basso, rispetto al rischio conferito nei pazienti di sviluppare AD.

Relativamente al ruolo dell'allele ApoE2, Bernardi e collaboratori nel 2006 hanno mostrato un effetto protettivo che esso potrebbe avere verso la FTLD, mentre altri autori non hanno confermato questi dati (Engelborghs et al., 2003; Srinivasan et al., 2006). Una meta-analisi che ha riunito un totale di 364 pazienti affetti da FTLD e 2671 controlli ha, però, dimostrato che esiste un aumento della suscettibilità verso l'FTLD nei soggetti portatori dell'allele ApoE2 (Verpillat et al., 2002).

## **1.2 Ipotesi infiammatoria nell'AD e nella FTLD**

Le evidenze che al quadro della malattia di Alzheimer contribuisce in misura importante una distruzione dei neuroni sono ormai ben documentate.

Il danno a carico della cellula neuronale è mediato dall'attivazione del sistema immunitario dell'ospite, senza tuttavia un coinvolgimento quantitativamente significativo della componente anticorpale o della

---

attivazione dei linfociti T e B che classicamente accompagnano la risposta immunitaria specifica (McGeer e McGeer, 2001). È quindi improprio parlare di autoimmunità, concetto che presuppone una risposta immune umorale o cellulomediata specifica. Si può invece definire questa risposta dell'organismo "autotossica", mediata dai meccanismi immunitari innati, aspecifici, che non richiedono l'attivazione e l'espansione di cloni linfocitari né il riconoscimento di determinanti che siano bersaglio della risposta immune. Se l'attivazione di questo sistema avviene nei confronti di strutture dell'organismo il quadro finale può essere simile a quello della risposta autoimmunitaria, sebbene il percorso patogenetico sia radicalmente differente (McGeer e McGeer, 2000).

Il ruolo del processo infiammatorio nella patogenesi dell'AD è testimoniato dal riscontro che la microglia presente nelle placche senili contiene una proteina associata all'infiammazione l'HLA-DR, proteina del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. Numerosi altri mediatori della flogosi sono stati riscontrati in associazione con la placca: tra questi anche l'interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'interleuchina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; Griffin et al., 1995; Gonzalez-Scarano e Baltuch, 1999). Ulteriori dati sono stati forniti da evidenze epidemiologiche e studi retrospettivi che ipotizzano un effetto protettivo della terapia antinfiammatoria non ancora confermato in studi clinici (McGeer et al., 1996; Aisen, 2000). Poiché la maggior parte delle molecole infiammatorie non sono in grado di superare la barriera ematoencefalica, la loro presenza all'interno del tessuto nervoso implica che questo sia in grado di produrle: infatti le proteine infiammatorie nel SNC originano principalmente dalla microglia e dalla astroglia attivate. La lista dei mediatori che intervengono durante il processo autotossico nel tessuto cerebrale è ampia e comprende le proteine del complemento e i loro inibitori, le citochine infiammatorie e i rispettivi recettori, i componenti della via della coagulazione e una serie di proteasi e inibitori specifici.

La proteina A $\beta$  è in grado di attivare la cascata del complemento, supportando l'idea che nell'AD la componente infiammatoria potrebbe essere una reazione aspecifica indipendente da una reazione immunitaria mirata e che potrebbe essere una risposta alle alterazioni neuropatologiche presenti, eventualmente facilitandone la progressione. L'affinità del C1q per la A $\beta$  è massima quando questa si trova conformata a foglietto  $\beta$ . Il complesso C1q - A $\beta$  è inoltre più facilmente aggregabile, ed è in grado di avviare la nucleazione delle fibrille di amiloide a loro volta capaci di attivare il complemento: è quindi anche possibile che il processo patologico sia in grado di autoamplificarsi.

Anche il complemento è fortemente implicato nella distruzione neuronale. Nei soggetti AD si possono in effetti evidenziare frammenti del complemento in forma attivata a livello della placca senile e in associazione alla membrana dei neuriti distrofici è stata addirittura osservata la presenza del complesso di attacco (Webster et al., 1997). L'azione litica del complemento è modulata da una serie di inibitori, tra cui la vitronectina, la clusterina e il CD59.

Una deregolazione di queste molecole potrebbe contribuire alla patogenesi dell'AD. In particolare è stato osservato che la A $\beta$  è in grado di inibire l'espressione del CD59 e che nella corteccia frontale e nell'ippocampo di soggetti AD i livelli di quest'ultimo sono ridotti (Wallace et al., 1995). In coltura la lisi di cellule neuronali mediata dal complemento è inversamente proporzionale alla capacità del neurone di produrre CD59.

Per quanto riguarda la FTLD, i fenomeni infiammatori rappresentano una parte dei meccanismi patofisiologici, che conducono alla malattia. Un lavoro di Arnold et al., 2000 ha mostrato grande presenza di astrociti e microglia nella corteccia frontale di pazienti FTLD rispetto ai controlli sani ed ha suggerito che la microglia potrebbe essere coinvolta nella morte cellulare. E' stata infatti osservata l'espressione neuronale di antigeni microglia-specifici nelle cortecce frontali e temporali di alcuni soggetti affetti da FTLD (Hollister et al., 1997). La letteratura rivela un ruolo importante della microglia nella patogenesi di FTLD dovuta alla risposta di uno stimolo infiammatorio neuronale (Arnold et al., 2000) oppure alla risposta alla deposizione neuronale della proteina tau (Komori, 1999). Inoltre, i livelli di TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  sono risultati elevati nel CSF di pazienti affetti con FTLD, riflettendo, così, un'aumentata immunoreattività intratecale (Sjögren et al., 2004).

Quando la microglia è attivata, per esempio dopo un trauma o in seguito a stress ossidativo, è in grado di produrre elevate quantità di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . In seguito, la IL-1 $\beta$  e il TNF- $\alpha$  inducono l'espressione di svariate proteine da parte degli astrociti, come la GFAP, la ApoE, la sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS), la  $\alpha$ 1-antichimotripsina, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Das et al., 1995).

La IL-1 $\alpha$ , la IL-1 $\beta$ , la IL-6 e il TNF- $\alpha$  sono tra le più potenti interleuchine proinfiammatorie, e sono presenti in aumentata quantità nel cervello di soggetti AD.

La famiglia della IL-1 è composta da tre molecole: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e l'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1Ra), il quale funziona come fisiologico inibitore della IL-1. Dai risultati di alcuni studi longitudinali che hanno valutato nel tempo un campione di soggetti sani, in quelli che in seguito hanno sviluppato AD, si può riscontrare, nelle sedi tipiche delle lesioni, una notevole espressione di cellule microgliali attivate e secernenti IL-1 $\alpha$ , che testimoniano il ruolo di questo mediatore nelle fasi iniziali della patologia. Apparentemente l'attivazione delle cellule microgliali da parte della A $\beta$  sarebbe sufficiente a stimolare la produzione di IL-1 e di numerose altre citochine (Eikelenboom e Veerhuis, 1999). La IL-1 svolge numerose attività nell'organismo e nel SNC alcune delle quali potrebbero essere implicate nella patogenesi dell'AD: promuove la sintesi e processazione della APP (Gahtan e Overmier, 1999) nei neuroni e nelle cellule gliali, incrementando la produzione di A $\beta$ , aumenta l'espressione e l'attività delle acetilcolinesterasi (AChE), spiegando forse in parte il deficit di questo neurotrasmettitore, stimola come fattore autocrino la produzione di IL-1 da parte della microglia e agisce sugli astrociti attivandoli e promuovendo l'espressione di  $\alpha$ 1-antichimotripsina. Essa inoltre incrementa l'espressione astrocitaria della S100 $\beta$ , citochina neurotrofica e gliotrofica, che stimola la crescita neuritica ed aumenta i livelli intracellulari di calcio e l'espressione di APP (Akiyama et al., 2000). Tale molecola è anche in grado di stimolare la nitrossidosintetasi astrogliale, con produzione di NO, radicale libero dell'ossigeno potenzialmente neurotossico. Sono stati osservati elevati livelli di S100 $\beta$  nel CSF di pazienti AD e anche FTLD, dove l'aumento è maggiore, dimostrando, così, che l'astrocitosi è una caratteristica neuropatologica comune nelle demenze neurodegenerative (Green et al., 1997).

L'aumentata espressione di IL-1 nei pazienti affetti da AD potrebbe dunque spiegare molte delle alterazioni osservate durante la degenerazione neuronale, quali l'aumentata crescita dei neuriti distrofici, la sovraespressione della APP e i meccanismi citotossici come l'eccessiva presenza di calcio intracellulare e i livelli tissutali aumentati di ossido nitrico. La conseguenza di questa cascata è

un'aumentata produzione di A $\beta$ , che a sua volta può stimolare la produzione di interleuchine da parte della microglia (Eikelenboom e Veerhuis, 1999).

IL-6 è una citochina coinvolta in molti processi cellulari, media la risposta immunitaria e le reazioni infiammatorie relative alla crescita cellulare e alla differenziazione nel sistema nervoso centrale. Queste funzioni sono possibili grazie ad interazioni con specifici recettori, solubili o di membrana, che sono in grado di costituire il complesso IL-6 recettore (IL-6RC) biologicamente attivo.

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

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

Le prostaglandine sono acidi grassi insaturi a lunga catena, con molteplici funzioni nell'organismo, tra cui la mediazione dei processi infiammatori. Esse derivano dall'acido arachidonico mediante l'azione degli enzimi COX-1 e COX-2 (Cicloossigenasi: COX). La COX-1 è espressa costitutivamente dalla maggioranza dei tessuti e nel SNC è espressa soprattutto dalla microglia. La COX-2 è un enzima poco espresso dai tessuti umani, ma inducibile mediante stimoli infiammatori (es. IL-1). Nel SNC è espressa prevalentemente dai neuroni ed ha un ruolo infiammatorio, ma anche protettivo per svariati tessuti, tra cui quello renale e verosimilmente anche quello nervoso. E' quindi possibile che la COX-2 sia coinvolta solo in minima parte nei processi degenerativi all'interno del SNC, il che spiegherebbe il fallimento dei tentativi di trattamento con inibitori selettivi della COX-2.

### **1.2.1 Citochine e chemochine nelle demenze**

Numerose evidenze sperimentali condotte sia in vitro che in vivo sottolineano l'importanza di entrambi questi tipi di molecole nella patogenesi della AD e della FTLD.

Le citochine sono una famiglia di proteine che includono le interleuchine (ILs), il TNF $\alpha$ , e il TNF $\beta$ . La loro produzione, incrementata negli stadi infiammatori, è principalmente volta alla regolazione della risposta immunitaria. Nel SNC vengono prodotti sia dalla microglia sia dagli astrociti (Rothwell and Hopkins, 1995).

La proteina A $\beta$  nell'AD è in grado di stimolare l'espressione di alcune citochine (Lee et al., 2002). In particolare, si è osservato un incremento dell'espressione di IL-1 nel cervello di pazienti AD (Sheng et al., 1997; Johnstone et al., 1999), direttamente correlato alla formazione delle placche, alla crescita di

neuriti distrofici e all'overespressione neuronale dell'enzima acetilcolinesterasi. Come già discusso in precedenza, l'IL-1 esplica la propria attività influenzando la sintesi e il processamento dei precursori della A $\beta$ , promuovendo l'attività acetilcolinesterasica neuronale, l'attivazione microgliale, astrocitaria e la produzione della citochina S100B, la quale è anche uno stimolatore neuronale della produzione del precursore della A $\beta$  oltre ad essere stata associata alla presenza dei grovigli neurofibrillari (Sheng et al., 1997). Anche il TNF $\alpha$  è in grado di influenzare l'espressione o il metabolismo di parecchie molecole che sono implicate nello sviluppo dell'AD, tra cui la proteina A $\beta$ , l'ApoE e l' $\alpha$ 2-macroglobulina (Perry et al., 2001), benché sia stato anche proposto un suo ruolo potenzialmente neuroprotettivo (Tarkowski et al., 1999).

Le chemochine sono citochine chemotattiche coinvolte nei primi eventi dell'infiammazione. Queste molecole agiscono in due modi: in primo luogo hanno azione chemotattica diretta sui linfociti; in secondo luogo inducono l'espressione di molecole di adesione che facilitano l'interazione fra linfociti ed endotelio vascolare.

Culture di astrociti e oligodendrociti attivati con A $\beta$  producono CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES, che sono potenti chemoattrattori verso macrofagi e microglia (Johnstone et al., 1999). E' stato ipotizzato anche un ruolo protettivo di MCP-1, coinvolto nella rigenerazione del tessuto neuronale, attraverso l'induzione di fattori neurotrofici e di differenziazione da parte della microglia (Kalehua et al., 2004).

Immunoreattività per diverse chemochine, fra cui CXCL10 (o Interferon- $\gamma$  inducibile protein-10: IP-10) e del relativo recettore è stata dimostrata a livello del sistema nervoso centrale. Inoltre è stata osservata la presenza del recettore per CXCL10 (CXCR3) sulla superficie dei neuroni e il ligando CXCL10 si è dimostrato essere aumentato in astrociti reattivi nei cervelli di pazienti AD. Inoltre astrociti positivi per CXCL10 sono stati trovati associati a placche senili (Xia et al., 1999; Xia et al., 2000). Sono stati valutati i livelli di diverse chemochine, compresa CXCL10, nel fluido cerebrospinale di pazienti AD, che sono stati suddivisi in "AD moderati" (MMSE >14) e "AD severi" (MMSE  $\leq$  14) e paragonati con controlli sani di pari età, dimostrando che i livelli di CXCL10 nel CSF risultavano aumentati solo nei pazienti "AD moderati". Invece i livelli di Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) e Interleukin-8 (IL-8) risultavano aumentati in tutti i pazienti AD, indipendentemente dal livello di declino cognitivo (Galimberti et al., 2003; Galimberti et al., 2006). Questo risultato è stato anche dimostrato in soggetti con Mild Cognitive Impairment (MCI), che è considerata la fase preliminare dell'AD (Galimberti et al., 2006). Queste evidenze sperimentali suggeriscono che l'up-regolazione delle chemochine sia molto precoce durante la patogenesi dell'AD, che può anche precedere la manifestazione clinica della malattia.

Per quanto riguarda la FTLD, recenti scoperte hanno dimostrato un aumento della produzione di citochine sia pro- sia antinfiammatorie in soggetti affetti da FTLD sporadico (Sjögren et al., 2004). Inoltre sono stati osservati alti livelli liquorali di MCP-1, IL-8, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , mentre non si sono riscontrate differenze nei livelli di IP-10 nei pazienti con FTLD. Il TNF- $\alpha$ , una delle principali citochine proinfiammatorie, è prodotto da parecchi tipi cellulari nel SNC, tra cui i macrofagi, gli astrociti e la microglia ed è in grado di indurre apoptosi. Il TNF- $\beta$  è una citochina pleiotropica e nel SNC è prodotto sia dai neuroni sia dalle cellule gliali. Essa agisce come una citochina antinfiammatoria, inibendo la

produzione di citochine proinfiammatorie, come il TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 da parte degli astrociti e sopprimendo l'attivazione e la proliferazione della microglia. Quindi, in pazienti affetti da FTLD, un aumento dei livelli di TNF- $\alpha$  potrebbe innescare la produzione di TNF- $\beta$  attraverso un meccanismo di feedback negativo e controbilanciare gli effetti proinfiammatori di TNF- $\alpha$  (Sjögren et al., 2004).

### 1.2.2 Polimorfismi genetici in citochine e chemochine

Le citochine e le chemochine sono state studiate anche dal punto di vista genetico, allo scopo di individuare mutazioni o polimorfismi in grado di influenzare la suscettibilità o il decorso della patologia. Una delle più forti evidenze dell'incremento del rischio di AD che variazioni genetiche nelle molecole infiammatorie possono provocare, coinvolge il complesso dell'interleuchina -1 (IL-1), il cui gene è localizzato sul cromosoma 2q14-21 e che include IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e la proteina antagonista del recettore di IL-1 (IL-1Ra). In tutti questi geni sono stati individuati diversi polimorfismi che sono stati analizzati attraverso studi caso-controllo in una serie di popolazioni e che hanno dimostrato di essere associati con l'AD (Du et al., 2000; Grimaldi et al., 2000; Nicoll et al., 2000).

Riguardo al gene *IL-1 $\alpha$*  il genotipo 2/2 è stato osservato conferire un incremento nel rischio d'insorgenza nella popolazione AD considerata (Nicoll et al., 2000). Tale studio mostra inoltre che soggetti omozigoti per l'allele 2 dell'IL-1 $\alpha$  e allele 2 dell'IL-1 $\beta$  presentano il rischio maggiore. Il polimorfismo *T-889C* (rs1800587) dell'IL-1 $\alpha$ , localizzato nella regione del promotore, è stato indagato in una popolazione AD italiana, dove il genotipo *TT* si è rivelato fortemente associato con la forma EOAD (Grimaldi et al., 2000). Tuttavia, studi successivi, non hanno confermato tale risultato (Dursun et al., 2009; Serretti et al., 2009).

Per quanto riguarda il gene *IL-1 $\beta$* , il polimorfismo *TC*, localizzato nell'esone 5 in posizione +3953, è risultato associato all'AD in studi condotti su popolazioni appartenenti ad etnie differenti, tra cui quella italiana (Sciacca et al., 2003) e australiana (Hedley et al., 2002). Tali variazioni potrebbero influenzare l'espressione del gene provocando un'ulteriore attivazione della microglia. Questi risultati non sono stati però replicati nella popolazione cinese (Kuo et al., 2003). Un altro SNP molto studiato è presente nella regione del promotore del gene *IL-1 $\beta$*  (*C-551T*), che risulta associato all'AD (Ravaglia et al., 2006; Di Bona et al., 2008).

Anche il gene dell'IL-6 presenta diversi polimorfismi che sono stati associati con la AD (Grimaldi et al., 2000); per quanto riguarda la variante VNTR, individuata nella posizione successiva alla regione 3', l'allele *C* è risultato associato con una ridotta attività di IL-6 nell'uomo e relativamente allo SNP *G-174C* è stata osservata un'associazione dell'allele *C* con una ridotta espressione del gene IL-6 (Bagli et al., 2000). In uno studio successivo dove si sono considerate varianti alleliche nella citochina proinfiammatoria IL-6 (*G-174C*) ed in quella antinfiammatoria IL-10 (*G-1082A*), è stato osservato che la presenza contemporanea delle varianti di ciascun SNP conferisce un rischio maggiore di insorgenza della malattia (Arosio et al., 2004). Comunque studi recenti condotti sul polimorfismo IL-6 *G-174C* non hanno confermato l'associazione con l'AD (Ravaglia et al., 2006; Paradowski et al., 2008). Anche un'analisi condotta nella regione promotrice del gene *IL-10*, di cui sono stati studiati cinque SNPs per sequenziamento diretto (-3538, -1354, -1087, -824, -597), non ha permesso di

rilevare alcuna associazione tra queste varianti, sia analizzate singolarmente sia come aplotipi, e l'AD (Culpan et al., 2006). Tuttavia, uno studio recente ha mostrato un'associazione nella popolazione italiana con il polimorfismo *T-819C*, sempre localizzato nella regione del promotore (Bagnoli et al., 2007).

Riguardo ai polimorfismi del  $TNF\alpha$ , studi condotti su diverse popolazioni hanno riscontrato associazione tra le varianti considerate e l'insorgenza della malattia di AD (Culpan et al., 2003; Ramos et al., 2006), ma il dato non si è confermato in uno studio condotto sulla popolazione italiana (Tedde et al., 2008).

RANTES è un'altra chemochina coinvolta nei processi infiammatori e nella cui sequenza sono stati riscontrati diversi polimorfismi che però non sono stati ad oggi ancora indagati nella AD e nella FTLD, mentre sono stati associati a diverse patologie quali la sindrome da immunodeficienza acquisita (HIV) (Liu et al., 1999), la dermatite atopica (Nickel et al., 2000) e l'artrite reumatoide (Yao et al., 2009).

Anche il recettore di RANTES, CCR5, presenta delle variazioni alleliche; in particolare una delezione nella regione codificante di 32 bp (*CCR5 $\Delta$ 32*) dà origine ad un recettore non funzionale e conferisce protezione contro la trasmissione dell'HIV, nonché un ritardo nella progressione di questa malattia. Invece nell'AD, in seguito ad uno studio caso-controllo, non è stata osservata alcuna differenza nella distribuzione della delezione nelle due popolazioni considerate, suggerendo che la mutazione in oggetto non agisca come fattore di rischio per la AD. Inoltre, la presenza di individui AD con due alleli mutati, che non sono funzionali, implica che la chemochina RANTES e il recettore CCR5 non fanno parte probabilmente della cascata di eventi che porta allo sviluppo della malattia (Galimberti et al., 2004). Un'altra possibilità che dovrà essere considerata è che altri recettori compensino la mancata funzionalità di CCR5.

Nel medesimo lavoro, è stato preso in esame anche il gene CCR2. In particolare, è stato analizzato un polimorfismo che comporta una sostituzione di una valina con una isoleucina al codone 64: CCR2-64I. E' stato condotto uno studio caso-controllo su pazienti AD e su altrettanti controlli sani ed è stato osservata la completa assenza del genotipo 64I/64I (omozigote per la mutazione) nei pazienti, suggerendo che l'allele mutato potrebbe avere un effetto protettivo nei confronti della patologia (Galimberti et al., 2004). In seguito, è stato preso in esame il polimorfismo *A-2518G*, localizzato nella regione del promotore del gene *MCP-1*, il principale ligando di CCR2. Tuttavia dallo studio di associazione non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa né tra le frequenze alleliche, né tra le genotipiche, anche stratificando i pazienti per il genotipo ApoE, per il sesso e per l'età d'esordio. Quindi *A-2518G*, collocato nel promotore del gene non sembra rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza della patologia. Malgrado ciò, è stato osservato che nel siero di pazienti AD i livelli di MCP-1 risultavano più elevati nei portatori di almeno un allele *G* mutato, con dei picchi più elevati nei pazienti portatori di entrambi gli alleli mutati (*GG*). Questa evidenza suggerisce che MCP-1 sia realmente coinvolto sia a livello intratecale che periferico, nella demenza di Alzheimer soprattutto nella fase precoce di malattia, dove la componente infiammatoria risulta più pronunciata (Fenoglio et al., 2004).

Un'altra chemochina recentemente testata per un possibile ruolo nell'insorgenza di AD è IP-10. La ricerca di nuove varianti alleliche nella regione codificante del gene che codifica per IP-10 in pazienti

---



con AD, ha dimostrato la presenza di due polimorfismi già riportati nell'esone 4 (GC e CT) e di un nuovo polimorfismo raro nell'esone 2 (CT). Successivamente questi SNPs sono stati analizzati attraverso uno studio caso-controllo che non ha dato risultati significativi (Venturelli et al., 2006).

In letteratura, non esistono dati riguardo a studi condotti sui polimorfismi finora descritti nella popolazione affetta da FTLD.

### 1.3 Lo stress ossidativo e le demenze

Anche lo stress ossidativo, fenomeno fortemente correlato con l'infiammazione, svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi di parecchie patologie neurodegenerative, incluse la AD e la FTLD. Tale processo è causato da uno squilibrio tra i livelli di antiossidanti e le concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno (Halliwell, 1997). Infatti, il cervello utilizza circa il 20% dell'ossigeno corporeo, di cui una porzione significativa (circa il 15%) viene ridotta a perossido ( $O_2^-$ ). Il tessuto cerebrale produce anche le più alte concentrazioni di ossido nitrico (NO), che può rapidamente reagire con  $O_2^-$  a produrre perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un potente antiossidante, agente citotossico e il principale componente dello stress ossidativo. Si è ipotizzato che uno squilibrio tra i livelli di NO e di ONOO<sup>-</sup> possa essere cruciale nel passaggio iniziale che porta alla neurodegenerazione.

Si è iniziato a considerare lo stress ossidativo come un fattore implicato nell'eziopatogenesi dell'AD nel 1986 (Martins et al., 1986). Da allora, molti altri studi sono stati condotti al riguardo, in vari stadi ed in vari processi della patologia (Volicer and Crino, 1990; Benzi and Moretti, 1995; Beal 1996; Markesbery, 1997; Nunomura et al., 2001; Atwood et al., 2002; Smith et al., 2002; Gella et al., 2009). Dai risultati, è emerso che alti livelli di stress ossidativo sono presenti nei neuroni morti nei cervelli di pazienti AD (Smith et al., 1992; Sayre et al., 1997) e che le placche di amiloide sono un centro focale di ossidazione cellulare e molecolare. Nei casi di AD con una implicazione genetica, l'inferiore capacità di difesa contro i radicali liberi che si verifica con l'avanzamento dell'età, sembra essere ulteriormente compromessa, probabilmente a causa di fonti addizionali di radicali liberi che risultano dalla suscettibilità genetica e/o dalla presenza di mutazioni nei geni dell'*APP* e *PSEN1* (Smith and Perry, 1997).

Il deposito di  $A\beta$  nel cervello di pazienti AD comporta la produzione di radicali superossido, che, combinati con l'ossido nitrico, formano ONOO<sup>-</sup> che a sua volta, induce la morte cellulare. Il peptide  $A\beta$  riveste un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione dell'AD ed è stato dimostrato che conferisce neurotossicità, inducendo la produzione di radicali liberi. È stato dimostrato che  $A\beta$  causa l'accumulo di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) in colture di neuroni ippocampali (Mattson et al., 1995) e induce la perossidazione lipidica (Butterfield et al., 1994) e può causare, inoltre, un'eccessiva produzione di radicali superossido per interazione con cellule vascolari endoteliali (Thomas et al., 1996). Questi studi supportano la teoria che lo stress ossidativo vada ad incidere sul processo di amiloidogenesi. Un aumento di produzione di  $\beta$ -amiloide può contribuire ad una produzione a ciclo continuo di stress ossidativi. Il cervello ha un'elevata attività metabolica che è alimentata dal glucosio. Studi specifici hanno permesso di evidenziare la presenza di anormali bassi livelli di proteine trasportatrici di glucosio nei cervelli di pazienti AD (Horwood and Davies, 1994; Simpson et al., 1994)

e questo fatto sembra essere una conseguenza della perossidazione lipidica (Mark et al., 1997).

I mitocondri, che producono l'energia necessaria allo svolgimento anche delle funzioni cellulari neuronali, sono organelli molto suscettibili al danno indotto da radicali liberi, i quali sono continuamente prodotti dalla catena respiratoria (Beal, 1996; Kowaltowski and Vercesi, 1999; Albers and Beal, 2000) e disfunzioni a livello mitocondriale possono comportare necrosi e apoptosi cellulare (Zhang et al., 1997). Recenti analisi morfometriche di biopsie cerebrali, specialmente di pazienti AD, hanno dimostrato una notevole riduzione del numero di mitocondri e un aumento del contenuto citoplasmatico di DNA mitocondriale nei neuroni contenenti un alto livello di composti ossidati, supportando la teoria nell'eziopatogenesi dell'AD sono presenti anomalie mitocondriali (Hirai et al., 2001).

L'attivazione infiammatoria di microglia ed astrociti evidenziata attorno alle placche di A $\beta$  e la conseguente aumentata espressione di citochine e chemochine, consente di affermare che il fattore preponderante nella patogenesi dell'AD è rappresentato dall'infiammazione. Il rischio di sviluppare la patologia può aumentare nel caso in cui determinati soggetti siano portatori di polimorfismi o mutazioni in geni chiave (Hedley et al., 2002). Recenti studi hanno permesso di collegare l'infiammazione con un'aumentata produzione di radicali liberi e stress ossidativo (Bisaglia et al., 2002; Walker et al., 2002).

Tutti i fattori qui discussi, quali appunto l'incremento di produzione di A $\beta$ , il ridotto metabolismo del glucosio, il danno mitocondriale e l'infiammazione, causati da una produzione eccessiva di radicali liberi e dallo stress ossidativo, concorrono globalmente alla neurodegenerazione nell'AD.

Il chiaro contributo del processo di invecchiamento anche nella FTLD, prescindendo dalla genetica, suggerisce ancora una volta un possibile ruolo dello stress ossidativo nella spiegazione della citopatologia di questo tipo di demenza. L'accumulo dei coniugati dell'ubiquitina, per esempio, riportato nella FTLD, può essere collegato alla up-regolazione degli enzimi con azione antiossidante, come l'eme-ossigenasi-1 (Smith et al., 1994). Infatti, negli studi di istochimica di tipo quantitativo, esiste una quasi completa sovrapposizione tra accumulo di ubiquitina e maggiore attività dell'enzima, indicando come le alterazioni del citoscheletro siano associate ad un incremento dello stress ossidativo.

L'aumentata produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella FTLD è dovuta comunque anche ad altri fattori, oltre che all'incrementato metabolismo ossidativo. Nelle regioni frontotemporali, esiste un'aumentata presenza di ferro (Gerst et al., 1999), che catalizza la produzione di OH $^-$  da H $_2$ O $_2$ ; inoltre l'ubiquitina contiene siti in grado di legarsi a questo metallo (Colton et al., 1987) e anche la microglia attivata è una possibile fonte di radicali liberi dell'ossigeno. Anche il processo di iperfosforilazione sembra legato allo stress ossidativo, sia attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B (Schreck et al., 1991), sia attraverso una particolare via metabolica (mitogen-activated phosphorylation: MAP); perciò anche la fosforilazione anomala delle proteine potrebbe essere una conseguenza dello stress ossidativo, poiché le proteine del citoscheletro, l'ubiquitina e i neurofilamenti potrebbero avere un ruolo importante nel mantenere l'omeostasi dei ROS.

Infine, anche l'ApoE, che sia nel cervello sia nel liquido cefalorachidiano è stata trovata coniugata a prodotti di perossidazione di lipidi altamente reattivi (Montine et al., 1996) e che è un forte agente

---

chelante di metalli di transizione come il ferro ed il rame (Miyata et al., 1996), potrebbe avere una funzione chiave nell'omeostasi dei ROS.

### 1.3.1 Marcatori dello stress ossidativo

L'ossido nitrico è un radicale libero altamente reattivo prodotto da L-arginina per azione dell'ossido nitrico sintasi, di cui esistono tre isoforme codificate dai geni localizzati sul cromosoma 12 (*NOS1*), sul cromosoma 17 (*NOS2*) e sul cromosoma 7 (*NOS3*). A basse concentrazioni, NO è coinvolto nei processi di neurotrasmissione e vasodilatazione, mentre a concentrazioni elevate è implicato nel processo di patogenesi di ictus, demielinizzazione ed in altre patologie neurodegenerative (demenza da HIV, ischemia cerebrale, traumi, malattia di Parkinson, malattia di Alzheimer).

L'isoforma neuronale nNOS (*NOS1*) è quella maggiormente espressa nel cervello. La produzione di NO in pazienti AD è sovra-regolata dall'attivazione dell'ossido nitrico sintasi neuronale in astrociti reattivi che circondano le placche di A $\beta$  presenti in regioni di evidente morte neuronale (Simic et al., 2000). Inoltre, nei cervelli di pazienti AD, è stata evidenziata un'espressione atipica di *NOS1* in cellule corticali piramidali (Luth et al., 2002).

L'isoforma inducibile, iNOS (*NOS2*), espressa in vari tipi di cellule, comprese astroglia e microglia nel sistema nervoso centrale, in risposta ad un gran numero di stimoli, è comunque regolata principalmente a livello trascrizionale, non richiede calcio (Ca<sup>2+</sup>) per la sua attività ed è sintetizzata de novo in cellule strettamente collegate ai sistemi di difesa immuno-cellulari, inclusi macrofagi e neutrofili. Astroglia e microglia in cervelli sani non esprimono iNOS, ma in seguito ad un danno ischemico, traumatico, neurotossico o infiammatorio, astroglia e microglia attivate esprimono *NOS2* nel topo, nel ratto e nell'uomo (Galea et al. 1992).

E' chiaro pero', che la microglia umana non produce NO in risposta agli stessi stimoli che invece comportano la produzione di un grande quantitativo di NO da parte della microglia murina (Snell et al., 1997; Vitek et al., 1997). L'espressione di iNOS è stata valutata negli astrociti circostanti le placche nei cervelli di pazienti AD (Lee et al., 1993).

Lo stimolo principale che induce la produzione di NO e l'espressione di *NOS2* in cellule microgliali è il lipopolisaccaride batterico (LPS). In parecchi esperimenti è stato impiegato LPS per innescare l'espressione di *NOS2* in diverse linee di cellule gliali, in astrociti primari e nella microglia (Pahan et al., 1997). In quest'ultima LPS da solo è sufficiente a stimolare *NOS2*. Comunque esistono pareri contrastanti relativi al ruolo di LPS sull'induzione di *NOS2* nell'astroglia. Parecchi lavori suggeriscono che la stimolazione dell'espressione di questo gene nell'astroglia, richieda un effetto co-stimolatorio di IFN- $\gamma$  aggiunto a LPS (Possel et al., 2000; Solà et al., 2002). E'interessante evidenziare che sebbene *NOS2* sia stimolata da LPS nelle cellule gliali di topo e di ratto, le cellule gliali umane non mostrano sovra-regolazione di iNOS in risposta a LPS.

Parecchi virus possono indurre *NOS2* in cellule nervose in una varie specie. L'iNOS gliale umana risulta sovra-regolata in risposta all'intrusione nel cervello del virus dell'HIV. Spesso sono sufficienti isolati componenti virali, come acidi nucleici o proteine, come potenti stimolatori di *NOS2* nelle cellule gliali ed è stato dimostrato che ds-RNA virale stimola la produzione di iNOS nell'astroglia umana attraverso la via ds-RNA protein chinasi (PKR) dipendente (Auch et al., 2004).

Molte citochine proinfiammatorie associate al sistema immunitario inducono l'espressione di *NOS2* sia nell'astroglia che nella microglia di varie specie. Alcune citochine, come IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , possono indurre stimolazione di questo gene nelle cellule gliali. Altre citochine (come TNF- $\alpha$ ) tendono a stimolare *NOS2* solo se associate ad IL-1 $\beta$  o IFN- $\gamma$ .

La forma endoteliale, eNOS (o *NOS3*) è presente in concentrazione più elevata nei neuroni piramidali ippocampali, il sito principale coinvolto nella patologia di AD, che in ogni altra area cerebrale. Sia nei pazienti AD che nei modelli animali della malattia, è stato messo in evidenza che gli astrociti che esprimono l'isoforma *NOS3* risultano numericamente superiori rispetto a quelli che esprimono l'isoforma *NOS2*, ed è stata osservata la loro diretta associazione con i depositi di A $\beta$  (Luth et al., 2001). Infatti è stato evidenziato che nei pazienti AD i vasi sanguigni cerebrali risultano alterati e la A $\beta$  va ad interagire con le cellule endoteliali di questi vasi sanguigni producendo radicali superossido in eccesso (Dahiyat et al., 1999). Questi radicali possono "degassare" NO producendo agenti ossidanti che possono causare perossidazione lipidica ed altre modificazioni degenerative. In alternativa, è possibile che la deposizione di aggregati insolubili di A $\beta$  dipenda da uno squilibrio NO/O $_2^-$  (Thomas et al., 1996). Oltre a *NOS1*, l'isoforma più abbondantemente espressa nel cervello, anche *NOS3* è stata individuata nel tessuto cerebrale. Inoltre, essa colocalizza con ONOO $^-$  nei neuroni in degenerazione e nelle cellule gliali, suggerendo che il danno dovuto ai radicali liberi è un meccanismo di morte cellulare associata con l'up-regolazione dell'espressione di *NOS3* nel cervello.

### 1.3.2 Polimorfismi in molecole coinvolte nello stress ossidativo

L'isoforma neuronale nNOS (o *NOS1*) risulta costitutivamente espressa nei neuroni. È stata osservata l'attivazione di *NOS1* in culture di cellule astrogliali in seguito a stimolazione con ionofori di calcio, glutammato o bradichinina (Murphy et al., 1993). La regolazione dell'espressione di *NOS1* umano è un processo estremamente complesso (Wang et al., 1999), infatti dalla caratterizzazione dell'organizzazione genomica è stato evidenziato che l'unità trascrizionale di 29 esoni si estende per una regione di oltre 240 kb localizzata sul cromosoma 12q24.2. Il gene ha una complessa regolazione trascrizionale e nel promotore si può riscontrare la presenza di nove primi esoni "alternativi" (denominati 1a-1i), caratterizzati da diverse regioni 5' - non tradotte (Wang et al., 1999), attraverso un gran numero di meccanismi interessanti: trascrizione di tratti diversi del promotore a seconda della funzione, splicing alternativo, inserzioni o delezioni "a cassetta", clivaggio di vari siti della regione 3'-UTR e poliadenilazione. Gli esoni "alternativi" 1c e 1f rappresentano le forme più abbondanti, studiate a livello cerebrale (Bros et al., 2006; Saur et al., 2002).

Nella struttura dell'mRNA esiste anche una biodiversità allelica. Alcuni, ma non tutti, di questi vari trascritti, incidono sulla sequenza aminoacidica codificante e vengono tradotti in isoforme proteiche di nNOS che presentano alterate proprietà strutturali e funzionali.

Nel gene è presente una variante allelica, che consiste in una transizione C $\rightarrow$ T nell'esone 29, localizzata 276 paia di basi a valle del sito di terminazione della trascrizione di *NOS1* (C276T). Poiché questo polimorfismo è collocato in una regione non tradotta del gene, andrà ad influire sullo splicing, sulla trascrizione o sulla traduzione dell'RNA in proteina. È stato riportato che questo SNP conferisce

un'aumentata suscettibilità di sviluppare la schizofrenia (Shinkai et al., 2002) e risulta essere associato con la malattia di Parkinson (Levecque et al., 2003). Per quanto riguarda l'AD, il genotipo *TT* sembra essere un fattore di rischio per lo sviluppo della patologia ad esordio precoce (EOAD) nella popolazione italiana (Galimberti et al., 2005), ma non sono presenti informazioni relative ad una possibile associazione con la FTLD.

A livello del promotore di *NOS1* l'esone alternativo 1c è caratterizzato dalla presenza di numerosi SNPs, ma solo la variante *G-84A* svolge un ruolo funzionale, poiché è stato evidenziato che in modelli in vitro l'allele *A* diminuisce i livelli di trascrizione del 30% (Saur et al., 2004). Da uno studio condotto, tale variante non risulta associata all'AD (Galimberti et al., 2008). Per quanto riguarda l'esone 1f, anche la regione VNTR risulta essere altamente polimorfica e dà origine ad alleli corti (S) o lunghi (L). La frequenza del genotipo *SS* risulta essere un fattore di rischio per l'insorgenza della patologia e tale associazione risulta più marcata nei soggetti di sesso femminile (Galimberti et al., 2008).

Per quanto riguarda l'isoforma endoteliale, è stata ampiamente studiata una variante polimorfica comune nel gene eNOS (*NOS3*), che si trova sul cromosoma 7q35 (Marsden et al., 1993), che consiste in una sostituzione a singola base (*G894T*) e comporta una sostituzione aminoacidica in posizione 298 di *NOS3* (*Glu298Asp*).

Il genotipo wild-type *GG* sembra essere un fattore di rischio per lo sviluppo di AD con esordio tardivo nella popolazione italiana (Guidi et al., 2005), sebbene altri studi condotti mostrano risultati discordanti, probabilmente dovuti all'inferiore dimensione del campione analizzato o a diverse stratificazioni condotte sulla popolazione (Monastero et al., 2003; Tedde et al., 2002). Oltre a tale variante, in questo gene sono stati trovati ulteriori SNPs, inclusa una sostituzione di singola base, che consiste in una transizione *T→C*, collocata nella regione del promotore di *NOS3* (*T-786C*). Anche se questo polimorfismo è collocato in una regione non tradotta del gene, risulta comunque importante l'analisi, dal momento che potrebbe influire sullo splicing o sulla trascrizione in *NOS* mRNA. Infatti, come già dimostrato mediante saggio della luciferasi, la presenza dell'allele *C* mutato comporta una diminuzione significativa dell'attività del promotore di *NOS3* (Nakayama et al., 1999). Questo SNP è stato riportato in associazione a patologie vascolari, patologie coronariche (Cattaruzza et al., 2004; Colombo et al., 2003), ipertensione (Hyndman et al., 2002), stenosi carotideica interna (Ghilardi et al., 2002) e infarto del miocardio (Nakayama et al., 2000). Per quanto riguarda l'AD, tale variante non sembra essere un fattore di rischio per l'insorgenza della patologia, ma la sua presenza correla con una bassa tendenza dell'espressione di *NOS3*, probabilmente esercitando un effetto positivo nell'AD, contribuendo alla diminuzione del danno ossidativo (Venturelli et al., 2005). In letteratura, non sono riportati studi di associazione di questo SNP con la FTLD.

#### **1.4 Marcatori liquorali delle demenze**

Poiché le capacità di riparazione del SNC sono limitate, un intervento precoce sul processo degenerativo sarebbe di notevole importanza, nel tentativo di salvaguardare la maggior quantità possibile di tessuto nervoso. Idealmente, sarebbe di grande utilità fare una diagnosi precoce, utilizzando uno o più marcatori in combinazione, facili da indagare ed economici. A questo proposito sono stati condotti numerosi studi, principalmente su liquor cerebrospinale (CSF) e su sangue, per

---

ricercare modificazioni che aiutino il clinico nella diagnosi di AD o FTLD.

Il liquido cerebrospinale si trova a diretto contatto con lo spazio extracellulare del cervello, quindi vi si riflettono i cambiamenti biochimici che avvengono a livello cerebrale. Tuttavia, il problema più rilevante che si riscontra in questo tipo di valutazione è la difficoltà a disporre del liquor di controlli sani, così che la maggior parte dei gruppi di controllo è costituita da soggetti affetti da altre patologie neurologiche, limitando il valore del controllo stesso.

Idealmente le caratteristiche ottimali di un marker biologico sono: la capacità di determinare le caratteristiche neuropatologiche della patologia; validazione in diversi casi effettivi di AD o FTLD; precisione; non invasività; semplice da attuare ed economico (The Ronald and Nancy Regan Research Institute of the Alzheimer's Association, 1998). I marcatori liquorali che rispondono meglio a questi criteri e che sono adeguatamente sensibili e specifici sono la proteina A $\beta$ , la proteina tau e la proteina tau fosforilata.

#### **1.4.1 Proteina A $\beta$ in CSF**

La scoperta che il peptide A $\beta$  precipita a formare le placche senili ha condotto allo sviluppo di kit ELISA, specifici per la A $\beta$ 42. Circa 20 studi condotti su 2000 casi hanno dimostrato una riduzione della A $\beta$ 42 di circa il 50% rispetto ai controlli non-dementi di pari età (Blennow and Hampel, 2003). Tale riduzione nel liquor potrebbe essere dovuta alla deposizione di A $\beta$ 42 nelle placche senili, dal momento che uno studio autoptico ha mostrato una forte correlazione tra l'alto numero di placche nella neocorteccia e nell'ippocampo e bassi livelli di A $\beta$ 42 nel liquor ventricolare.

Una moderata diminuzione di A $\beta$ 42 è stata riscontrata anche in una percentuale di pazienti affetti da FTLD e da demenza vascolare (VaD, Sjögren et al., 2000), mentre livelli normali si sono osservati in soggetti con depressione e malattia di Parkinson (Holmberg et al., 2003).

#### **1.4.2 Proteina tau totale (T-tau) in CSF**

Sono stati sviluppati tre differenti kit ELISA per misurare la proteina T-tau nel liquor, basati su anticorpi monoclonali, in grado di rilevare tutte le isoforme della proteina, indipendentemente dallo stato di fosforilazione (Blennow et al., 1995). E' dimostrato in più di 50 studi un aumento da moderato a marcato della T-tau nei pazienti con AD (Andreasen et al., 2003). I livelli liquorali di tale proteina probabilmente riflettono l'instensità del danno neuronale e la degenerazione (Andreasen et al., 1998). Un modesto aumento di T-tau è stato osservato anche in una percentuale di casi di altre demenze, tra cui la FTLD, la VaD e la demenza a corpi di Lewy (DLB).

Alti livelli liquorali di T-tau sono stati trovati solo occasionalmente in soggetti affetti da demenza alcolica, malattia di Parkinson (PD) o disordini psichiatrici (Blennow et al., 1995; Morikawa et al., 1999; Urakami et al., 1999).

Possiamo concludere affermando che la proteina T-tau ha valore diagnostico per discriminare malattie neurodegenerative dalla pseudodemenza dovuta a disordini psichiatrici.

#### **1.4.3 Proteina tau fosforilata (P-tau) in CSF**

Sono stati sviluppati 5 diversi kit ELISA per differenti epitomi fosforilati della proteina tau, tra cui per la

---

treonina 181 e 231 (P-tau<sub>181+231</sub>) (Blennow et al., 1995), per la treonina 231 e serina 235 (P-tau<sub>231+235</sub>) (Ishiguro et al., 1999), per la serina 199 (P-tau<sub>199</sub>) (Ishiguro et al., 1999), per la treonina 231 (P-tau<sub>231</sub>) (Kohnken et al., 2000) e per la serina 396 e 404 (P-tau<sub>396+404</sub>) (Hu et al., 2002). Si sono osservati alti livelli di P-tau nei pazienti con AD usando questi differenti kit.

Livelli normali sono stati trovati in patologie psichiatriche, come la depressione (Buerger et al., 2003) e malattie neurologiche croniche, come la sclerosi laterale amiotrofica (ALS), la malattia di Parkinson (Blennow et al., 1995; Sjögren et al., 2002) e altre demenze, come la VaD, la FTLD e la DLB (Vanmechelen et al., 2000; Parnetti et al., 2001; Hampel et al., 2004).

Queste evidenze implicano che la P-tau, riflettendo lo stato fosforilato della proteina tau, possa essere considerata un biomarker più diretto per discriminare l'AD dalle altre demenze.

Inoltre, dopo l'infarto acuto, si osserva un marcato aumento della T-tau nel liquor, mentre i livelli di P-tau non cambiano (Hesse et al., 2001).

Questi dati suggeriscono che la proteina P-tau non sia semplicemente un marcatore del danno neuronale, come la T-tau, ma rifletta specificamente lo stato fosforilato della proteina tau e quindi probabilmente della formazione dei grovigli neurofibrillari.

### **1.5 Regolazione del ciclo cellulare e malattia di Alzheimer**

Il ciclo cellulare è un processo altamente regolato, la cui minima alterazione può comportare importanti conseguenze.

E' ampiamente dimostrata la presenza di meccanismi di feedback elaborati e di punti di regolazione cruciali, che vengono tipicamente suddivisi nelle seguenti quattro fasi:

- fase S: in essa avviene la replicazione del DNA
- fase M: in essa ha luogo la divisione cellulare o mitosi
- fase G1 e fase G2: periodi di intervallo che separano le due precedenti fasi

Oltre alle fasi appena descritte, le cellule che vengono definite "quiescenti", come la maggior parte dei neuroni dell'ippocampo dell'adulto, esistono in una fase silente, denominata G0 e caratterizzata da assenza di divisione. Una volta giunte in questa fase, le cellule sono definitivamente differenziate e non sarebbero più in grado di rientrare nel ciclo cellulare (McShea et al, 1999).

L'impovertimento della rete sinaptica costituisce il maggiore correlato anatomopatologico della disfunzione cognitiva nella malattia di Alzheimer ed è un evento precoce nella sua patogenesi, essendo chiaramente riconoscibile nei pazienti affetti da mild cognitive impairment (MCI), che rappresenta una fase prodromica di AD (Arendt, 2009).

Nella malattia di Alzheimer, unitamente alla degenerazione sinaptica, i neuroni, che normalmente si trovano a riposo nella fase G0, sembrano spinti a rientrare nel ciclo cellulare, senza riuscire però a completarlo con una fisiologica divisione, ma andando invece incontro a morte per apoptosi (Wang et al, 2009). Per quale motivo si verificherebbe questo anomalo ritorno a dividersi da parte di cellule già differenziate? Nel momento in cui stabiliscono connessioni sinaptiche e le mantengono, i neuroni cessano di proliferare, ma i meccanismi molecolari impiegati per controllare la plasticità sinaptica e la divisione cellulare sono i medesimi e condivisi. Da ciò consegue la possibilità di errore di conversione di segnali, derivanti da modificazioni dei contatti sinaptici, verso un programma non previsto di

attivazione del ciclo cellulare (Arendt, 2009).

Sono state identificate una serie di proteine cruciali per la proliferazione cellulare perché guidano la cellula attraverso le diverse fasi del ciclo e tra di esse vi sono le cicline, le chinasi ciclino-dipendenti (Cdk) e gli associati inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti, la cui espressione ed attivazione varia a seconda delle transizioni della cellula dalla fase S alla fase M (Zhu et al, 2004). In particolare, è l'espressione/attivazione del complesso ciclina D/Cdk4,6, innescata dalla presenza di fattori di crescita, che controlla il rientro dalla fase G<sub>0</sub> alla fase G<sub>1</sub> (Sherr, 1994).

Il destino successivo della cellula che si arresta in G<sub>1</sub> dipende dalla presenza o assenza di ciclina A: se essa è assente, la cellula ritorna a G<sub>0</sub> e si differenzia nuovamente, mentre, se è presente, la cellula viene indirizzata verso la mitosi, perde la capacità di differenziarsi e, se non riesce a completare il ciclo, muore per via apoptotica (Wang et al, 2009).

In accordo con quanto finora esposto, a livello dei neuroni corticali di pazienti affetti da Alzheimer si documentano elevati livelli di marcatori del ciclo cellulare che dimostrano la tendenza a spostarsi dalla fase di quiescenza verso una fase di divisione cellulare. Tali marcatori consistono in un accumulo di cicline, di chinasi ciclino-dipendenti e di inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti [Arendt et al, 1996; Nagy et al, 1996].

Una molecola di interesse fra le chinasi ciclino-dipendenti (Cdk) è Cdk5, proteina priva di funzioni note nell'ambito del ciclo cellulare, ma che appare particolarmente espressa nei neuroni post-mitotici (Monaco et al, 2005). Un'alterazione di regolazione di Cdk5, porterebbe secondo alcuni autori, all'attivazione di p38 e conseguentemente all'aumentata espressione di c-Jun, che in ultima analisi contribuisce significativamente alla neurodegenerazione nell'Alzheimer (Chang et al, 2010) (Fig. 8).

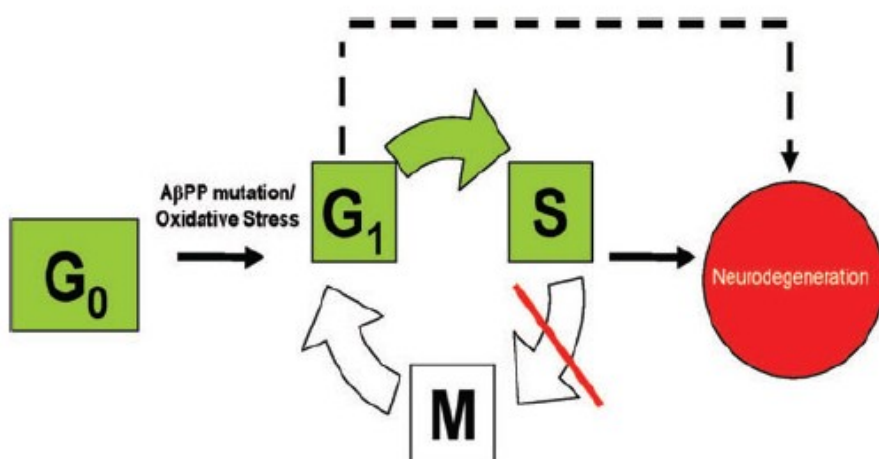


Figura 8: schema riassuntivo del rientro anomalo nella divisione cellulare abortiva e conseguente contributo al processo neurodegenerativo nell'AD

### 1.5.1 Geni regolatori del ciclo cellulare e demenze

Due studi hanno identificato una regione di linkage a livello di 9p21.3 nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer ad esordio tardivo (late-onset AD). Tale regione contiene *CDKN2A*, che regola la



progressione verso la fase G1 del ciclo cellulare e che potrebbe rappresentare un fattore di suscettibilità per la malattia di Alzheimer [Hamshere et al, 2007; Zuchner et al, 2008].

La regione del cromosoma 9 su cui è localizzato il gene della proteina associata all'ubiquitina (UBAP1) e che è legata a casi familiari e sporadici di demenza frontotemporale comprende altri geni di interesse per la regolazione del ciclo cellulare. Il primo è KIF24, membro della superfamiglia della chinesine, il secondo rientra anch'esso nella famiglia delle proteine legate all'ubiquitina ed è noto come UBAP2. Le chinesine, dotate di attività ATPasica e di proprietà leganti i microtubuli, sono proteine coinvolte in un gran numero di funzioni cellulari, tra cui il trasporto intracellulare e la divisione cellulare (Serbus et al, 2005). Per alcune delle chinesine, sono le sequenze fuori dal core motorio ATP-asico a conferire la funzione. In particolare, KIF24 fa parte del dominio KIF-2 like ed è espresso dai neuroni con funzioni regolatorie del trasporto assonale e dello sviluppo neuronale.

Un altro interessante gene sul Cromosoma 9 è il BCL-2 associated athanogene (BAG-1), una Hsc-70 binding protein con funzione anti-apoptotica, interagisce con la proteina tau e regola la sua degradazione mediante il sistema dei proteasomi (Takayama et al, 2006). BAG-1 potrebbe avere un effetto neuroprotettivo (Liman et al, 2008) ed i suoi livelli di espressione, particolarmente dell'isoforma BAG-1M, sono aumentati nell'ippocampo dei pazienti Alzheimer (Elliott et al, 2009). Quest'ultimo dato suggerirebbe un coinvolgimento della forma BAG-1M nella patogenesi dell'AD, in quanto fisicamente e funzionalmente associata all'accumulo di tau e beta amiloide, i due marcatori molecolari della malattia.

### **1.5.2 microRNA, hnRNPs e malattia di Alzheimer**

I microRNA (miRNAs) sono sequenze RNA lunghe circa 21 nucleotidi e non codificanti, che agiscono come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica in piante ed animali. Essi si legano alle sequenze non tradotte (3'UTR) di mRNA bersaglio e, mediante il reclutamento del RNA induced silencing complex (RISC), sono in grado di inibire l'espressione di tali sequenze mRNA.

Vari studi riportano la presenza di disregolazione dei miRNA nella malattia di Alzheimer e le sequenze mRNA di BACE1 e APP rappresentano, come ovvio, dei bersagli tipici e un'alterata regolazione dei miRNA potrebbe causare accumulo di peptide A $\beta$  (Lau et al, 2010).

Il gruppo di microRNA genes miR15/107 è tra i più coinvolti nelle malattie tumorali, cardiovascolari e neurodegenerative, in particolare nella malattia di Alzheimer, avendo come target la regolazione dell'espressione della proteina beta-amiloide e implicazioni nella fosforilazione della proteina tau.

Inoltre, miR107 e altri membri di questo gruppo regolano fortemente l'espressione del gene della progranulina, le cui mutazioni sono causali di demenza frontotemporale (FTLD) (Finnerty et al, 2010).

Le Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) si trovano associate a sequenze pre-mRNA nel nucleo e possono influenzare la processazione pre-mRNA e altri meccanismi del metabolismo e del trasporto degli mRNA.

La ribonucleoproteina hnRNP-A1 è implicata nella maturazione del mRNA del precursore della proteina beta-amiloide (APP), poiché si lega alle sequenze Alu dell'esone 7 del pre-mRNA e contribuisce allo splicing alternativo (Donev et al, 2009). Inoltre, essa si lega in modo specifico al pre-micro RNA (miR)-18a, il che fa pensare che possa regolare la maturazione dei miRNA (Guil et al, 2007).

---

## SCOPO DELLA RICERCA

---

La malattia di Alzheimer (AD) e la Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD) sono entrambe patologie degenerative del sistema nervoso centrale ad eziopatogenesi complessa e verosimilmente multifattoriale, in cui la patogenesi è dovuta alla combinazione tra fattori genetici ed ambientali. Fra i primi, diversi geni coinvolti nell'infiammazione, quali citochine e chemochine, e nel danno ossidativo (sintasi dell'ossido nitrico) sono dimostrati giocare un ruolo nella AD e talvolta anche nella FTLD.

In questo studio abbiamo contribuito alla ricerca di fattori di rischio genetici effettuando uno studio di associazione dei geni candidati funzionali e/o posizionali di seguito descritti in dettaglio, in una popolazione 374 pazienti affetti da AD, 291 con FTLD e 344 controlli sani di pari età. Ove possibile, i dati genetici sono stati correlati con il livello di espressione dei geni studiati e con i livello dei microRNA che regolano la traduzione del trascritto.

I geni studiati sono:

- gli inibitori delle chinasi cellulari (*CDKN*) 2A e 2B, la cui espressione è aumentata in cervelli di pazienti con AD. E' noto infatti che la degenerazione sinaptica a livello dell'ippocampo e della neocorteccia è un evento precoce ed è il più importante correlato anatomopatologico della disfunzione cognitiva nella AD. Inoltre, e' noto che sembra esserci rientro anomalo nella fase G1 dei neuroni adulti, che dovrebbero trovarsi ormai differenziati ed in fase quiescente, nella AD.
- KIF1, membro della superfamiglia della chinesine, espresso dai neuroni e coinvolto nel trasporto assonale e nello sviluppo neuronale. Questo gene è un candidato funzionale e posizionale in quanto localizzato in una regione cromosomica precedentemente associata ad un aumentato rischio di sviluppo di FTLD

- BCL-2 associated athanogene (BAG)-1M rappresenta un candidato funzionale sia per la AD che per la FTLD in quanto: 1) i suoi livelli sono aumentati nell'ippocampo dei pazienti AD e la proteina colocalizza con tau e beta-amiloide 2) interagisce con la proteina tau e regola la sua degradazione.
- hnRNPA1: è un fattore trascrizionale simile alla proteina TDP43, che gioca un ruolo in diverse malattie neurodegenerative, fra cui FTLD e AD. Uno dei polimorfismi oggetto di studio si trova nella regione 3'-UTR, in un sito di legame di miR-590-3p. Pertanto è stata analizzata l'espressione di miR-590-3p in cellule periferiche ed i livelli ottenuti sono stati correlati al livello di espressione del gene target *HNRPA1*.

## MATERIALI E METODI

---

### 3.1 Arruolamento pazienti

Nel corso degli anni 2007-2010 sono stati reclutati consecutivamente 374 soggetti con malattia di Alzheimer e 291 con Degenerazione Lobare Frontotemporale, afferenti all'Unità Valutativa Alzheimer dell'Ospedale Maggiore, dell'Ospedale S. Raffaele Turro (Milano), dell'Ospedale L. Sacco, dell'Ospedale IRCCS S. Giovanni di Dio (Brescia), della Clinica Neurologica, Casa di Cura Santa Maria di Castellanza (Varese) e dell'Università di Torino.

Tutti i soggetti hanno seguito un iter diagnostico composto da : accurata anamnesi familiare, esame obiettivo neurologico, test laboratoristici di routine, valutazione neurocognitiva (per valutare memoria, linguaggio e prassia), risonanza magnetica (MRI: Magnetic Resonance Imaging) oppure tomografia computerizzata (TC) e, all'occorrenza, tomografia computerizzata ad emissione di positroni (PET: Positron Emission Tomography). Il grado del deficit cognitivo è stato valutato con il Clinical Dementia Rating (CDR), il punteggio al Mini Mental State Examination ( MMSE), la batteria per le funzioni frontali Frontal Assessment Battery (FAB), il Wisconsin Card Sorting Test (WCST), e il test della Torre di Londra. La durata di malattia è stata definita come il tempo (in anni) intercorso fra i primi sintomi, riportati sia dal paziente sia dai familiari, e la diagnosi clinica. La presenza di un danno vascolare è stata esclusa (Hachinsky Ischemic Score <4).

La diagnosi di AD è stata fatta secondo i criteri NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984). La diagnosi di FTLD è stata effettuata seguendo i criteri proposti da Neary e collaboratori (1998) e la successiva revisione di McKhann (2001), identificando le tre sindromi cliniche rappresentate dalla variante comportamentale (bvFTD), afasia progressiva primaria (PA) e demenza semantica (SD). Nello stesso periodo sono stati reclutati anche 344 controlli, fra cui volontari (parenti non consanguinei dei pazienti) e soggetti che avevano seguito lo stesso iter diagnostico dei pazienti e per i quali, dalle analisi effettuate, erano state escluse malattie dementigene. Inoltre, anche dopo follow-up di 12

mesi, questi soggetti erano risultati cognitivamente normali. Soggetti con depressione e/o problemi di tipo psichiatrico sono stati esclusi dallo studio. Inoltre, i controlli sono stati scelti in modo che non differissero significativamente dai pazienti per etnia, età e sesso ( $p>0.05$ ).

Il consenso informato per partecipare allo studio è stato consegnato a tutti i soggetti reclutati o ai loro parenti.

In tabella 1 sono riassunte le caratteristiche dei pazienti e dei controlli.

	CON	AD	FTLD	bvFTD	PA	SD
N° soggetti	344	374	291	253	24	14
sesto (M:F)	142:202	128:246	134:157	115:138	10:14	9:5
età media, anni $\pm$ SEM	68.5 $\pm$ 0.55	70.5 $\pm$ 0.68*	66.3 $\pm$ 0.55*	66.0 $\pm$ 0.61*	67.5 $\pm$ 2.19*	65.9 $\pm$ 2.60*
durata media malattia, anni $\pm$ SEM		2.9 $\pm$ 0.12	3.0 $\pm$ 0.15	2.8 $\pm$ 0.14	2.3 $\pm$ 0.33	3.1 $\pm$ 0.42
ApoE $\epsilon$ 4+ (%)	60/314 (19.1)	166/374 (44.4)**				

**Tab. 1:** caratteristiche di pazienti e controlli

### 3.2 Purificazione di DNA da sangue intero

Il DNA è stato estratto a partire da un prelievo di sangue venoso di circa 7ml raccolto in provette contenenti EDTA. Prima dell'estrazione, i campioni sono stati congelati per diversi giorni ad una temperatura di  $-30^{\circ}\text{C}$ , in modo da facilitare la lisi dei leucociti. In seguito, il DNA genomico è stato estratto impiegando il kit FlexiGene (Qiagen), secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice, i cui passaggi principali sono schematizzati di seguito:

1. Si pipetta il Buffer FG1 (di lisi) in una falcon da 50 ml. Si aggiungono i 7 ml di sangue intero e si vortexano per miscelare il tutto.
2. Si centrifuga per 30 minuti a 2500 rpm a  $10^{\circ}\text{C}$ . La centrifugazione permette di separare le proteine (ed anche altre macromolecole e strutture subcellulari) in base alle loro dimensioni (e alla loro forma) sottoponendole ad alti campi gravitazionali all'interno di una provetta posta in un'ultracentrifuga.

3. Dopo aver eliminato il sovrantante, si aggiunge il Buffer FG2 Protease (Buffer di denaturazione) e si vortexa immediatamente, si suddivide quindi il volume totale della miscela in eppendorf da 1,5 ml.
4. Si incuba a 65°C per 10 minuti in bagnetto termico: il colore del campione vira da rosso a verde oliva, a indicare l'avvenuta digestione delle proteine.
5. Si aggiunge l'isopropanolo (100%), si mescola finchè il DNA precipita e diviene visibile in forma di grovigli o di un blocchetto.
6. Si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm a temperatura ambiente.
7. Si elimina il sovrantante.
8. Si aggiunge l'etanolo 95 % e si vortexa per 5 secondi.
9. Si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm a temperatura ambiente.
10. Si elimina il sovrantante.
11. Si lascia asciugare all'aria il pellet di DNA finchè tutto il liquido sia evaporato (almeno 5 minuti).
12. Si aggiunge il Buffer FG3 (buffer di idratazione), si vortexa per 5 secondi a bassa velocità e si risospende il DNA incubandolo per un'ora a 65°C in bagnetto termico.

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

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

### 3.3 Determinazione delle varianti alleliche

#### 3.3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

La genotipizzazione per ApoE è stata effettuata in tutti i soggetti reclutati nello studio utilizzando la tecnica PCR-RFLP.

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

- Step di denaturazione: 95°C per 30''
- Step di annealing: T<sub>m</sub> per 30''
- Step di allungamento: 72° per 30''

Questa sequenza è stata ripetuta per 38 volte in un apposito termociclatore (PCR Express, Biorad), utilizzando l'enzima *Taq* polimerasi del batterio *Thermus aquaticus*, che ha la proprietà di non inattivarsi alla temperatura usata per denaturare le eliche del DNA. Il prodotto di PCR successivamente sottoposto a digestione enzimatica, è stato quindi fatto correre su gel di agarosio, adeguatamente addizionato di bromuro d'etidio e le bande visualizzate tramite transilluminatore UV.

le bande visualizzate su gel di agarosio, come precedentemente riportato in letteratura (Shinkai et al., 2002).

### 3.3.2 Discriminazione allelica mediante la tecnologia TaqMan

Per analizzare in modo più rapido e sicuro gli SNPs *UBAP1* rs10814083, *UBAP1* rs7018487, *UBAP2* rs1785506, *UBAP2* rs307658, *KIF24* rs17350674, *BAG1* rs706118, *CHMP5* rs844239, *hnRNPA1* rs7967622, *CDKN2A* rs3731239; *CDKN2A* rs2811710 e *CDKN2B* rs3217992 è stata condotta un'analisi con Real-Time PCR (Taqman, Applied Biosystems 7000) impiegando un nuovo metodo che si basa sull'uso di sonde marcate e fluorescenti, utilizzando come template DNA ad una concentrazione di 25 ng/μl. Per caratterizzare le varianti alleliche sono state impiegate sonde TaqMan specifiche (Assay-on-demand; ABI assay ID: C\_2730370\_10 per rs10814083; C\_31482324\_10 per rs7018487; C\_8778477\_20 per rs1785506; C\_3137220\_1 per rs307658; C\_25749112\_10 per rs17350674; C\_2721198\_1\_ per rs706118; C\_1555745\_10 per rs844239; C\_27275446\_10 per rs7967622; C\_27974751\_10 per rs3731239; C\_2618055\_10 per rs2811710 e C\_341975\_10 per rs3217992). Il saggio è stato ottimizzato in 20 μl di reazione, in piastre da 96 pozzetti, impiegando lo strumento ABI PRISM 7500 Fast.

E' stato applicato il seguente ciclo termico: 10 minuti a 95°C (fase di attivazione), seguiti da 50 cicli da 15 secondi ciascuno a 95°C (fase di denaturazione del DNA) e 1 minuto a 60°C (fase di annealing/estensione), come precedentemente descritto (Fenoglio et al., 2006).

Attraverso la quantificazione e comparazione dell'intensità del segnale fluorescente rilevato in ciascun pozzetto e mediante l'impiego del software in dotazione, è possibile determinare l'assetto allelico di ciascun campione nella piastra.

I risultati vengono visualizzati come cluster in base all'intensità del segnale emesso.

### 3.4 Analisi genetica di GRN

La sequenza dall'esone 0 all'esone 12 e il 3' UTR del gene che codifica per la Progranulina (*GRN*) è stata amplificata utilizzando coppie di specifici primers (forward e reverse) precedentemente descritti da Gass e collaboratori (Gass et al., 2006) e di seguito riportati nella tabella 2.

**Tab. 2:** Elenco dei primers utilizzati

Primers	Sequenza	Lunghezza amplificato (bp)
<b>GRN 0 F</b>	CCCTCGCATGTCAATGCC	466
<b>GRN 0 R</b>	CGTGAGACTCCAGGGGAAC	
<b>GRN 1 F</b>	GGGCTAGGGTACTGAGTGAC	368
<b>GRN 1 R</b>	AGTGTGTGGGCCATTTG	
<b>GRN2F</b>	TGCCCAGATGGTCAGTTC	
<b>GRN 2 R</b>	GCTGCACCTGATCTTTGG	537
<b>GRN 3 F</b>	GGCCACTCCTGCATCTTCT	
<b>GRN 3R</b>	TGAATGAGGGCACAAGGG	369
<b>GRN 4&amp;5 F</b>	TTAGTGTACCCTCAAACC	
<b>GRN 4&amp;5 R</b>	ACTGGAAGAGGAGCAAAC	587
<b>GRN 6 F</b>	GGGCCTCATTGACTCCAAGTGTA	
<b>GRN 6 R</b>	GGTCTTTGTCACTTCCAGGCTCA	401
<b>GRN 7 F</b>	TCCCTGTGTGCTACTGAG	
<b>GRN 7 R</b>	AAGCAGAGGAGAGGGTC	373
<b>GRN 8 F</b>	TACCCTCCATCTTCAACAC	
<b>GRN 8 R</b>	TCACAGCACACAGCCTGA	309
<b>GRN 9 F</b>	ATACCTGCTGCCGTCTAC	
<b>GRN 9 R</b>	GAGGGCAGAAAGCAATGA	457
<b>GRN 10 F</b>	TGTCCAATCCCAGAGGTATATG	
<b>GRN 10 R</b>	ACGTTGCAGGTGTAGCCAG	616
<b>GRN 11 F</b>	TGGACTGGAGAAGATGCC	
<b>GRN 11 R</b>	CGATCAGCACAAACAGACG	574
<b>GRN 12 F</b>	CATGATAACCAGACCTGC	
<b>GRN 12 R</b>	AGGGAGAATTTGGTTAGG	387
<b>GRN 3'UTR F</b>	AGCCAGGGGTACCAAGTGTTTG	
<b>GRN 3' UTR R</b>	GGGGTAATGTGATACAGCCGATG	658

Le miscele di reazione vengono preparate per ciascun campione aggiungendo: 1 µl di DNA genomico, 5 µl di buffer, 4 µl di dNTPs (mix), 37.3 µl di H<sub>2</sub>O, 0.2 µl di Taq polimerasi e 2.5 µl di primers (mix) per un totale di 50 µl.



Le reazioni di amplificazione vengono condotte utilizzando il protocollo di PCR touchdown (Baker et al., 2006). Questo protocollo di PCR prevede la denaturazione del doppio filamento di DNA a 94°C per 5 minuti e la ripetizione di 35 cicli di reazione divisi in due parti; la prima parte viene ripetuta per 10 cicli ciascuno composta da: 30 secondi a 94°, 30 secondi a 50°-60° e 40 secondi a 72°C. La seconda parte della reazione consiste nella ripetizione di 25 cicli ciascuno composto da: 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C, 40 secondi a 72°C e infine 10 minuti a 72°C.

I frammenti amplificati vengono purificati impiegando il kit ExoSAP-IT (usb, USA) secondo le specifiche indicate dal produttore e successivamente viene allestita la reazione di terminazione che impiega lo specifico kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (kit Applied Biosystem, Warrington, UK). In dettaglio la miscela di reazione viene preparata aggiungendo 3 µl di Buffer, 0.8 µl di Big Dye Terminator v 3.1, 0.8 µl di ciascun primer e 9.3 µl di H<sub>2</sub>O per un volume totale di 20 µl. Il protocollo di reazione di PCR prevede la ripetizione di 25 cicli. Ciascuno di questi è composto da 30 secondi a 96°C, 20 secondi a 50°C e 3 minuti a 60°C.

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

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

### **3.5 Estrazione dell'mRNA totale e analisi trascrizionale quantitativa di hnRNP-A1 mediante Real-Time PCR**

L'RNA totale sarà estratto col Trizol (Invitrogen) e retrotrascritto col kit Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Biosciences). Per una valutazione quantitativa dei livelli di mRNA verrà utilizzato l'ABI 7000 Sequence Detector con sonde TaqMan doppiamente marcate e la relativa quantità di mRNA sarà determinata comparandola con la sonda del gene di riferimento 18SrRNA (Hs99999901\_s1, Applied Biosystems). Il volume finale di reazione sarà di 20 µl utilizzando la TaqMan Universal Master Mix (ABI 4324018, Applied Biosystems). I parametri termici consistono in un ciclo di 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, seguiti da 40 cicli ciascuno comprendente: 15 sec a 95°C per la denaturazione e 1 min a 60°C per l'appaiamento/estensione. I livelli relativi di mRNA delle molecole analizzate

verranno calcolati come segue:  $2^{-[(DcT(campione) - DcT(calibratore))]} = 2^{-DDcT}$ , dove DcT sta a indicare Ct (della molecola in analisi) – Ct (housekeeping).

### **3.6 Estrazione del miRNA hsa-miR-590-3p e analisi quantitativa con Real-Time PCR**

L'RNA totale arricchito delle molecole più piccole di RNA viene isolato da circa 3-8 ml di liquor o PBMC attraverso l'utilizzo del mirVana miRNA isolation kit secondo le istruzioni della ditta produttrice

(Applied Biosystems). La concentrazione di RNA viene quindi quantificata attraverso l'utilizzo di un NanoDrop ND-3300 fluorospettrometro. La reazione di retrotrascrizione viene condotta attraverso l'impiego del kit ABI: TaqMan MicroRNA reverse transcription. Un totale di 2 ng/ $\mu$ L di RNA, 1X di stem-loop primer, 3.33 U/  $\mu$ L di trascrittasi inversa, 0.25 U/  $\mu$ L di inibitore RNase, 0.25 mM di dNTPs, e 1X di buffer di reazione vengono miscelati in un volume finale di 15  $\mu$ L e incubati a 16 °C per 30 minuti, e 42 °C per 30 minuti, e successivamente 85 °C per 5 min in un termociclatore.

Per una stima quantitativa dei livelli di miRNA, viene impiegato un sequence detector system ABI 7500 Fast con sonde TaqMan marcate. Nello specifico, 0.8  $\mu$ L della reazione di retrotrascrizione vengono miscelate con 0.5  $\mu$ L di Taqman microRNA assay e con 5  $\mu$ L di TaqMan Universal PCR master mix, No AmpEraseUNG in un volume finale di 10  $\mu$ L. Real Time PCR vengono condotte usando il seguente profilo termico: 95°C per 10 min seguito da 95 °C per 15 sec e 60 °C per 60 sec per un totale di 40 cicli. La quantificazione relativa di RNA viene calcolata attraverso il confronto con il livello di espressione del miRNA umano RNU48 (RT1006, ABI).

### 3.7 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software Sigma Stat 3.1.

Le frequenze alleliche e genotipiche sono state ottenute per conteggio diretto.

Il software Haploview 3.2 e il test di Chi quadrato sono stati utilizzati per valutare l'equilibrio di Hardy-Weinberg e la differenza nella distribuzione allelica e genotipica tra i gruppi.

La odds ratio (OR), che rappresenta un indice del rischio relativo di sviluppo della patologia, è stata calcolata considerando un intervallo di confidenza (CI) del 95%.

Il data-base informatico ([www.microna.org](http://www.microna.org)) è stato utilizzato per prevedere il legame di miR-590-3p con *hnRNP-A1*.

I livelli di espressione di *hnRNP-A1* e di miR-590-3p sono stati analizzati mediante One-Way Anova test.

Le correlazioni con i dati clinici e tra i livelli di espressione di HnRNP-A1 e i livelli di miR-590-3p sono state testate con il test di Spearman.

---

## RISULTATI

---

### 4.1 studio di associazione degli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti (*CDKN*) nella malattia di Alzheimer

Questo studio relativo agli inibitori delle chinasi cellulari (*CDKN*) 2A e 2B, proteine che agiscono come molecole regolatorie verso la progressione in fase fase G1 del ciclo cellulare , è stato condotto in una popolazione di 241 pazienti affetti da AD e 238 controlli di pari età.

In particolare, sono stati analizzati tre Tagging Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), rispettivamente noti come rs3731239 T/C, rs2811710 C/T e rs3217992 G/A, che sono localizzati in diversi blocchi di linkage disequilibrium (LD) di *CDKN2A* e *CDKN2B* e che rappresentano il 100% della variabilità genetica.

Come previsto, la frequenza dell'allele e4 della Apolipoprotein E (ApoE) è risultata significativamente maggiore nei pazienti rispetto ai controlli (42.7 versus 17.6%,  $P < 0.0001$ , OR=3.48, CI(95%)=2.29-5.30). Non sono state osservate differenze significative nella distribuzione allelica e genotipica dei polimorfismi in *CDKN 2A* e *2B* fra pazienti e controlli ( $P > 0.05$ ; tab.1) anche stratificando in base al sesso e alla presenza del fattore di rischio ApoE e4 ( $P > 0.05$ , dati non mostrati).

L'analisi di aploptipo non ha mostrato significative associazioni ( $P > 0.05$ , dati non mostrati).

In base a tali risultati, *CDKN2A* and *CDKN2B* non sembrano rappresentare dei fattori di rischio per lo sviluppo della AD.

SNP	n°	GENOTIPO%(n)			ALLELE%(n)	
<b>rs3731239</b>		<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
Casi	241	43(104)	46(111)	11(26)	66(319)	34(163)
Controlli	238	45(106)	45(108)	10(24)	67(320)	33(156)
<b>rs2811710</b>		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
Casi	241	34(82)	50(121)	16(38)	59(285)	41(197)
Controlli	238	33(78)	49(116)	18(44)	57(272)	43(204)
<b>rs3217992</b>		<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>	<b>G</b>	<b>A</b>
Case	241	30(72)	47(114)	23(55)	54(258)	46(224)
Controlli	238	34(80)	46(110)	20(48)	57(270)	43(206)

**Tabella 1:**

frequenze alleliche e genotipiche espresso come n(%) di rs3731239; rs2811710; rs3217992

## 4.2 studio di associazione di KIF 24 nella demenza frontotemporale

La regione del cromosoma 9 su cui è localizzato il gene della proteina associata all'ubiquitina (UBAP1) e che è legata a casi familiari e sporadici di FTLD, comprende altri geni di interesse per la regolazione del ciclo cellulare.

Il primo di essi è KIF24, membro della superfamiglia della chinesine, espresso dai neuroni e coinvolto nel trasporto assonale e nello sviluppo neuronale.

La regione in cui si trova KIF24 è stata precedentemente dimostrata essere associata ad un rischio aumentato di sviluppo della FTLD (Rollinson et al., 2009). Accanto a KIF1 si trova un secondo gene candidato, denominato UBAP1.

Alla luce di queste preliminari evidenze, sono stati studiati 5 polimorfismi (*UBAP1* rs7018487, *UBAP2* rs1785506 e rs307658, *KIF24* rs17350674 e rs10814083), che coprono il 100% della variabilità genetica della regione candida in un campione di 284 pazienti affetti da FTLD, tra cui 245 pazienti affetti dalla variante comportamentale (bvFTD), 23 con afasia progressiva primaria e 16 con demenza semantica, oltre che in 318 controlli sani di pari età.

Le frequenze alleliche e genotipiche di pazienti e controlli sono riportate in Tab.2. Un aumento statisticamente significativo della frequenza del genotipo di *KIF24* rs17350674 AA è stata osservata nei pazienti rispetto ai controlli (7.4 versus 2.5%;  $P=0.0068$ , OR: 3.63, CI: 1.58-8.35, Tab.2).

Stratificando per sindromi cliniche, si sono ottenuti simili risultati nei pazienti con bvFTD paragonati ai controlli (7.7 versus 2.5%,  $P=0.005$ , OR: 3.26, CI: 1.40-7.57, Tab3), ma non per i pazienti con PA (4.4% versus controlli,  $P>0.05$ , Tab. 4) o SD (6.3% versus controlli,  $P>0.05$ , Tab.3).

Stratificando per genere, un aumento statisticamente significativo della frequenza del genotipo AA è stato osservato nelle pazienti di sesso femminile rispetto ai controlli di sesso femminile (8.9 versus

2.5%,  $P=0.008$ , OR: 3.85, CI: 1.36-10.93, non mostrati), ma non nella popolazione maschile (5.6 versus 2.6%,  $P>0.05$ ). Sulla base dell'ipotesi che l'associazione osservata sia dovuta a rs17350674, è stata eseguita un'analisi in silico, che ha dimostrato una potenziale patogenicità dello SNP associato, mentre altri SNPs adiacenti a *KIF24* caratterizzati da sostituzione aminoacidica, tra cui rs16935508 (D50E), rs41274845 (R109G) e rs10972048 (M140V) non sono risultati essere dannosi riguardo la funzionalità della proteina (dati non mostrati).

L'analisi di aplotipi non è stata effettuata in quanto gli intervalli di confidenza non erano in accordo con i limiti dettati dal metodo (Gabriel et al., 2002).

In base ai risultati ottenuti su questo campione, il genotipo AA *KIF24* rs17350674 rappresenta probabilmente un fattore di suscettibilità per FTLD in pazienti senza mutazioni causali di MAPT o GRN e sembrerebbe aumentare il rischio di sviluppare la malattia di oltre 3 volte.

Considerando separatamente ogni variante clinica di FTLD (bvFTD, PA, SD), il livello di significatività statistica è stato raggiunto per la variante bvFTD, ma non per le varianti PA e SD. Tuttavia, la frequenza del genotipo AA risultava comunque aumentata anche in questi ultimi pazienti, senza raggiungere lo stesso livello soglia, verosimilmente a causa della più esigua dimensione del campione di pazienti PA e SD.

SNP	n	Genotipo n(%)			Allele n(%)		
<b>UBAP2</b> rs307658		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	
	Controlli	318	131 (41.2)	135 (42.5)	52 (16.3)	397 (62.4)	239 (37.6)
	Casi	284	118 (41.5)	132 (46.5)	34 (12.0)	368 (64.8)	200 (35.2)
<b>UBAP2</b> rs1785506		<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	
	Controlli	318	134 (42.1)	135 (42.5)	49 (15.4)	403 (63.4)	233 (36.6)
	Casi	284	126 (44.3)	125 (44.0)	33 (11.7)	377 (66.4)	191 (33.6)
<b>UBAP1</b> rs7018487		<b>TT</b>	<b>TG</b>	<b>GG</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	
	Controlli	318	121 (38.0)	147 (46.2)	50 (15.8)	389 (61.2)	247 (38.8)
	Casi	284	118 (41.5)	122 (43.0)	44 (15.5)	358 (63.0)	210 (37.0)
<b>KIF24</b> rs10814083		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	
	Controlli	318	124 (39.0)	152 (47.8)	42 (13.2)	400 (62.9)	236 (37.1)
	Casi	284	121 (42.6)	113 (39.7)	50 (17.7)	355 (62.5)	213 (37.5)
<b>KIF24</b> rs17350674		<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>AA</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	
	Controlli	318	206 (64.8)	104 (32.7)	8 (2.5)	516 (81.1)	120 (18.9)
	Casi	284	186 (65.5)	77 (27.1)	21 (7.4)*	449 (79.0)	119 (21.0)

**Tabella 2:** frequenze alleliche e genotipiche espresse in (%) in pazienti con FTLD paragonati a controlli  
\* $P=0.0068$ , OR: 3.63, CI: 1.58-8.35 versus controlli

Frequenze (n%)	bvFTD (n=245)	PA (n=23)	SD (n=16)	CON (n=318)
Allele				
C	386 (78.8)	38 (82.6)	25 (78.1)	516 (81.1)
A	104 (21.2)	8 (17.4)	7 (21.9)	120 (18.9)
Genotipo				
C/C	160 (65.3)	16 (69.6)	10 (62.5)	206 (64.8)
C/A	66 (27.0)	6 (26.0)	5 (31.2)	104 (32.7)
A/A	19 (7.7)*	1 (4.4)	1 (6.3)	8 (2.5)

**Tabella 3:** *KIF24* rs17350674: frequenze espresse in (%) in pazienti con bvFTD, PA e SD versus controlli .

\* $P=0.005$ , OR: 3.26 ; CI 1.40-7.57 versus controlli

### 4.3 studio di associazione di BAG1 nella demenza frontotemporale e nella malattia di Alzheimer

BCL-2 associated athanogene (BAG-1), una Hsc-70 binding protein con funzione anti-apoptotica (Takayama et al, 2006 potrebbe avere un effetto neuroprotettivo (Liman et al, 2008) ed i suoi livelli di espressione, particolarmente dell'isoforma BAG-1M, sono aumentati nell'ippocampo dei pazienti Alzheimer (Elliott et al, 2009) e la proteina colocalizza con tau e beta-amiloide.

Uno studio di associazione è stato condotto su *BAG1* in un campione di 291 pazienti con Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) e 374 con AD e 314 controlli di pari età e sesso. Inoltre, un altro candidato Chromatin-modifying protein 5 (*CHMP5*) localizzato nella stessa posizione di linkage disequilibrium, è stato incluso nello studio. E' stata determinata la distribuzione di due Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), rs844239 in *CHMP5* and rs706118 in *BAG1*, che rappresentano il 100% della variabilità genetica.

Solo pazienti con FTLD sporadica che non sono portatori di mutazioni causali dei geni *GRN* e *MAPT* sono stati inclusi in questo studio.

Le frequenze alleliche e genotipiche degli SNPs selezionati nei pazienti e nei controlli sono riportati nelle Tabelle 4 e 5. Una frequenza allelica ridotta in modo statisticamente significativo dell'allele polimorfico *BAG-1* rs706118 è stata osservata nei pazienti con FTLD rispetto ai controlli (16.7 versus 23.9%;  $P=0.007$ , OR: 0.35, CI: 0.25-0.50), mentre la frequenza allelica degli SNP nei pazienti affetti da AD è risultata simile ai controlli (24.3%,  $P>0.05$ , Tab.4). Al contrario, non è stata dimostrata alcuna associazione statisticamente significativa relativamente a *CHMP5* rs844239 (Tab. 5). Stratificando per genere, non si sono osservate differenze nella distribuzione di entrambi gli SNPs (dati non mostrati).

L'analisi di aplotipi non è stata effettuata in quanto gli intervalli di confidenza non erano in accordo con i limiti dettati dal metodo (Gabriel et al., 2002). L'analisi di aplotipi non è stata effettuata in quanto gli intervalli di confidenza non erano in accordo con i limiti dettati dal metodo (Gabriel et al., 2002).

<b>BAG-1 rs706118 frequenze</b>	<b>Controlli (n = 314)</b>	<b>Pz AD (n = 374)</b>	<b>Pz FTLD (n = 291)</b>	<b>bvFTD (n=253)</b>	<b>PA (n=24)</b>	<b>SD (n=14)</b>
Allele						
T	478 (76.1)	566 (75.7)	485 (83.3)	417 (82.4)	41 (85.4)	27 (96.4)
G	150 (23.9)	182 (24.3)	97 (16.7)*	89 (17.6)	7 (14.6)	1 (3.6)
Genotipo						
T/T	179 (57.0)	221 (59.0)	198 (68.0)	168 (66.4)	17 (70.8)	13 (92.8)
T/G	120 (38.2)	124 (33.2)	89 (30.6)	81 (32.0)	7 (29.2)	1 (7.2)
G/G	15 (4.8)	29 (7.8)	4 (1.4)	4 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)

**Tabella 4:** frequenze alleliche e genotipiche espresse in n(%) di BAG-1 rs706118 SNP in pazienti e controlli.\*

\*P=0.007, OR: 0.35, CI: 0.25-0.50

<b>CHMP5 rs844239 frequenze</b>	<b>Controlli (n = 314)</b>	<b>Pz AD (n = 374)</b>	<b>Pz FTLD (n = 291)</b>	<b>bvFTD (n=253)</b>	<b>PA (n=24)</b>	<b>SD (n=14)</b>
Allele						
G	486 (77.4)	573 (76.6)	480 (82.5)	412 (81.4)	41 (85.4)	27 (96.4)
A	142 (22.6)	175 (23.4)	102 (17.5)	94 (18.6)	7 (14.6)	1 (3.6)
Genotipo						
G/G	187 (59.6)	222 (59.3)	193 (66.3)	163 (64.5)	17 (70.8)	13 (92.8)
G/A	112 (35.6)	129 (34.5)	94 (32.3)	86 (34.0)	7 (29.2)	1 (7.2)
A/A	15 (4.8)	23 (6.2)	4 (1.4)	4 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)

**Tabella 5:** frequenze alleliche e genotipiche espresso in n(%) di CHMP5 rs844239 SNP in pazienti e controlli

#### 4.4 analisi genetica e di espressione genica di hnRNP-A1 e di miR-590-3p nella demenza frontotemporale e nella malattia di Alzheimer

Il gene codificante hnRNPA1 (*HNRPA1*) mappa a livello 12q13.13. Esso contiene un dominio ricco di glicina tipico di altre ribonucleoproteine nucleari, come TAR DNA binding protein (TDP)43, che è coinvolta nella FTLD e altre patologie neurodegenerative del SNC

Data la potenziale importanza di hnRNPA1, è stato condotto uno studio di associazione caso-controllo in un campione di 274 pazienti FTLD e 287 pazienti AD confrontati con 314 soggetti sani di pari età, avente lo scopo di analizzare due Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (rispettivamente rs7967622 e rs4016671). Il secondo si trova nella regione 3'-UTR, in un sito di legame di miR-590-3p. Pertanto è stata analizzata l'espressione di miR-590-3p nei monociti e la correlazione con i livelli di mRNA.

Solo pazienti con FTLD sporadica che non sono portatori di mutazioni causali dei geni *GRN* e *MAPT* sono stati inclusi in questo studio (rispettivamente n=274 e n=287).

Le frequenze alleliche e genotipiche di rs7967622 di pazienti e controlli sono riportati in Tabella 6. Un aumento significativo della frequenza del genotipo *hnRNP-A1* rs7967622 C/C si è osservato nei pazienti FTLD rispetto ai controlli (23.0 versus 15.4%;  $P=0.022$ , OR: 1.64, CI: 1.09-2.46, Tab. 6). Stratificando per genere, un aumento statisticamente significativo della frequenza del genotipo *hnRNP-A1* rs7967622 C/C è stato rilevato nei pazienti maschi rispetto ai controlli maschi (23.1 versus 11.3%;  $P=0.015$ , OR: 2.36, CI: 1.22-4.58, Tab. 7), ma non nelle femmine rispetto ai controlli dello stesso sesso (22.9 versus 18.3%,  $P>0.05$ , Tab. 7).

Non si sono invece osservate differenze significative nelle frequenze alleliche e genotipiche di *hnRNP-A1* rs7967622 nei pazienti AD rispetto ai controlli.

Rispetto al polimorfismo di singolo nucleotide (SNP) rs4016671, tutti i pazienti e i controlli erano wild-type (A/A).

Un aumento statisticamente significativo dei livelli di espressione relativa di *hnRNP-A1* nei PBMC si è osservato nei pazienti AD rispetto ai controlli ( $2.724 \pm 0.570$  versus  $1.076 \pm 0.187$ ,  $P=0.021$ , grafico 1), ma non nei pazienti con FTLD ( $1.495 \pm 0.426$  versus controlli,  $P>0.05$ , grafico 1).

Una riduzione dei livelli di espressione relative di hsa-miR-590-3p è stata osservata nei pazienti con AD rispetto ai controlli, sebbene la soglia di significatività statistica non sia stata raggiunta ( $0.685 \pm 0.080$  versus  $0.931 \pm 0.111$ ,  $P=0.079$ , grafico 2).

Una correlazione negativa tra i livelli di espressione di *hnRNP-A1* mRNA e hsa-miR-590-3p si è vista in tutti i soggetti ( $\rho = -0.316$ ,  $P=0.05$ , dati non mostrati). Considerando ciascun gruppo separatamente, è stata osservata una correlazione significativa nei pazienti affetti da AD ( $\rho = -0.615$ ,  $P=0.0237$ , dati non mostrati). Una tendenza simile si è osservata in entrambi i pazienti con FTLD e nei controlli ( $\rho = -0.373$  and  $-0.261$ , rispettivamente,  $P>0.05$ , dati non mostrati).

Un effetto del rs4016671 sul legame di miR-590-3p potrebbe essere ipotizzato, ma non è stato possibile testare questa ipotesi, poichè nessun individuo studiato era portatore dell'allele polimorfico



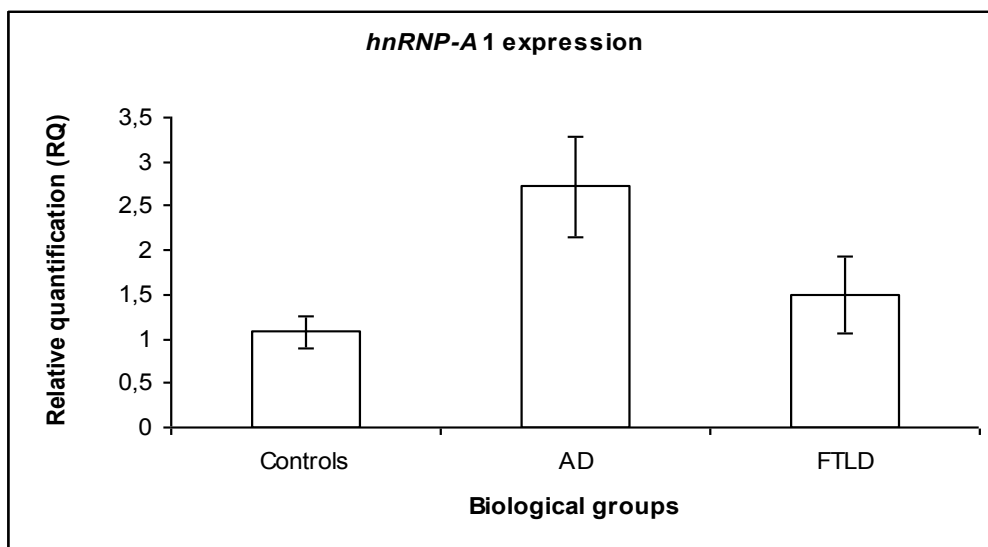
<i>hnRNP-A1</i> rs7967622 frequenze	Controlli (n = 344)	Pz AD (n = 287)	Pz FTLD (n = 274)			
				bvFTD (n=237)	PA (n=22)	SD (n=15)
Allele						
T	397 (57.7)	331 (57.7)	280 (51.1)	242 (51.1)	19(43.2)	19 (63.3)
C	291 (42.3)	243 (42.3)	268 (48.9)	232 (48.9)	25(56.8)	11 (36.7)
Genotipo						
T/T	106 (30.8)	94 (32.8)	69 (25.2)	58 (24.5)	4 (18.2)	7 (46.7)
T/C	185 (53.8)	143 (49.8)	142 (51.8)	126 (53.2)	11(50.0)	5 (33.3)
C/C	53 (15.4)	50 (17.4)	63 (23.0)*	53 (22.3)	7 (31.8)	3 (20.0)

**Tabella 6** frequenze alleliche e genotipiche in n(%) di *hnRNP-A1* rs7967622 SNP in pazienti e controlli.

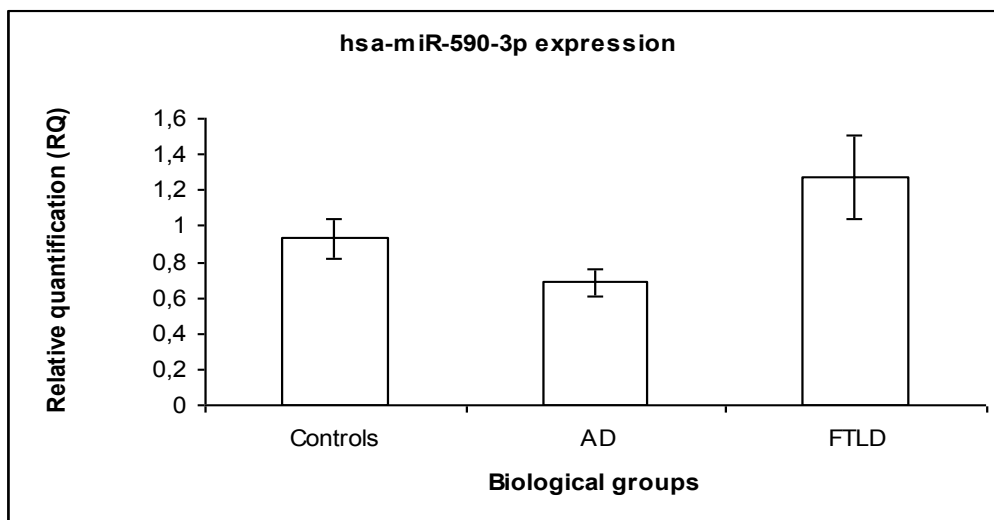
\*P=0.022, OR: 1.64, CI: 1.09-2.46

<i>hnRNP-A1</i> rs7967622 frequenze	Controlli maschi (n = 142)	pz FTLD maschi (n = 130)	Controlli femmine (n = 202)	pz FTLD femmine (n = 144)
Allele				
T	173 (60.9)	133 (51.2)	224 (55.4)	147 (51.0)
C	111 (39.1)	127 (48.8)	180 (44.6)	141 (49.0)
Genotipo				
T/T	47 (33.1)	33 (25.4)	59 (29.2)	36 (25.0)
T/C	79 (55.6)	67 (51.5)	106 (52.5)	75 (52.1)
C/C	16 (11.3)	30 (23.1)*	37 (18.3)	33 (22.9)

**Tabella 7.** frequenze alleliche e genotipiche espresse in n(%) di *hnRNP-A1* rs7967622 SNP in pazienti FTLD e controlli stratificati per genere; \* P=0.015, OR: 2.36, CI: 1.22-4.58



**Grafico 1:** livelli di espressione di hnRNPA1 nei PBMC di pazienti e controlli  
 \*P= 0.021, AD versus controlli



**Grafico 2:** livelli di espressione di hsa-miR590-3p in pazienti e controlli

**DISCUSSIONE**

La malattia di Alzheimer (AD) e la Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD) sono malattie multifattoriali e, fra i fattori che contribuiscono al loro sviluppo, si annoverano processi quali l'infiammazione e lo stress ossidativo, oltre a dinamiche legate alla sopravvivenza neuronale (trasporto, metabolismo, divisione cellulare), regolate da svariate proteine, come chinesine, proteine chinasi e loro inibitori, fattori pro e anti-apoptotici e fattori trascrizionali. Diversi geni codificanti proteine legate all'infiammazione (es. IL1a, IL1B, TNFa, IP10, MCP1, RANTES) e allo stress ossidativo (NOS3, NOS1) sono noti con possibile implicazione in queste malattie, oltre a geni identificati come causali di forme ereditarie di AD ed FTLD (PSEN1 e 2, MAPT e GRN).

In base a queste premesse, abbiamo studiato i seguenti geni candidati posizionali e funzionali, codificanti proteine coinvolte nei suddetti processi neuronali: gli inibitori delle chinasi cellulari (*CDKN*) 2A e 2B, la proteina KIF24 ( membro della superfamiglia della chinesine), la proteina antiapoptotica (BAG)-1M, il fattore trascrizionale hnRNPA1.

I risultati ottenuti dimostrano che la presenza di polimorfismi di singolo nucleotide dei geni KIF24, BAG1-M e hnRNP1 puo' aumentare la suscettibilità alla demenza frontotemporale, mentre non sembra conferire un aumentato rischio di sviluppare Alzheimer, anche se, relativamente al fattore trascrizionale hnRNP1, i suoi livelli di espressione sono risultati più elevati nella popolazione AD, in concomitanza al riscontro di livelli ridotti del suo regolatore trascrizionale hsa-miR-590-3p. Per quanto riguarda invece gli inibitori delle chinasi cellulari *CDKN* 2A e 2B, non sono emerse evidenze a favore di un loro ruolo come fattori di suscettibilità per la malattia di Alzheimer.

E' ben riconosciuto che esiste un impoverimento delle connessioni sinaptiche, che si instaura precocemente sin dalla fase prodromica di Alzheimer, che oggi, dopo l'ultima proposta di revisione dei criteri diagnostici operata da Dubois (Dubois et al, 2010), include molti casi tradizionalmente definiti "mild cognitive impairment" (MCI). La perdita sinaptica costituisce il maggior correlato anatomopatologico del decadimento cognitivo ed è più evidente a livello dell'ippocampo e della neocorteccia di pazienti affetti da Alzheimer (Arendt, 2009).

Oltre a questo dato, a livello dei neuroni corticali di pazienti affetti da Alzheimer, si documentano elevati livelli di proteine marcatori del ciclo cellulare, che dimostrano la tendenza dei neuroni a spostarsi dalla fase di quiescenza verso una fase di divisione cellulare. Tali proteine consistono in un accumulo di cicline, di chinasi ciclino-dipendenti e di inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti [Arendt et al, 1996; Nagy et al, 1996].

L'up-regolazione nei neuroni di molecole favorevoli la proliferazione cellulare può rappresentare un tentativo, sebbene in ultima analisi fallimentare, poichè esita in morte cellulare, di compensare l'impovertimento della rete sinaptica provocato da vari fattori solo in parte conosciuti, tra cui anche quelli genetici.

Geni regolatori della progressione verso la fase G1 del ciclo cellulare potrebbero influenzare la suscettibilità alla malattia di Alzheimer. A questo proposito, due studi hanno identificato una regione di linkage a livello di 9p21.3 nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer ad esordio tardivo (late-onset AD). Tale regione contiene *CDKN2A*, che regola proprio la progressione verso la fase G1 del ciclo cellulare [Hamshere et al, 2007; Zuchner et al, 2008].

Gli inibitori delle chinasi cellulari (*CDKN*) 2A e 2B, la cui espressione è aumentata nei cervelli di pazienti con AD, sono stati oggetto di uno dei nostri studi, che ha valutato la distribuzione di tre tagging SNPs (rispettivamente rs3731239 T/C, rs2811710 C/T e rs3217992 G/A) in un campione di pazienti AD e controlli. Dai risultati ottenuti in questa popolazione, essi non sembrano rappresentare fattori di suscettibilità per lo sviluppo della malattia di Alzheimer. Tuttavia, non è possibile escludere che altri geni codificanti proteine aventi un ruolo nella proliferazione cellulare possano giocare un ruolo nella predisposizione ad ammalare di tale patologia.

Altra classe di proteine che potrebbero influenzare la neurodegenerazione sia nella malattia di Alzheimer che nella FTLD, sono le chinesine, codificate da geni localizzati nella regione di UPAP (proteina associata all'ubiquitina), sul cromosoma 9, implicato nella trasmissione di forme ereditarie di FTLD. Le chinesine sono proteine dotate di attività ATPasica e si legano ai microtubuli, regolando la dinamica del citoscheletro e pertanto influenzano numerose funzioni cellulari, tra cui il trasporto assonale e la divisione cellulare. Di questa famiglia fa parte la proteina KIF24 (Serbus, et al, 2005), della quale abbiamo studiato tre SNPs potenzialmente in grado di influenzarne la funzione (*UBAP2* rs1785506 e rs307658, and *KIF24* rs17350674) in pazienti FTLD e controlli sani. Da un punto di vista funzionale, l'analisi "in silico" ha dimostrato che il polimorfismo rs17350674 può effettivamente alterare la funzione di KIF24, mediante la sostituzione da W ad L. Pertanto, la presenza di alleli polimorfici, in condizione di omozigosi, potrebbe influenzare la capacità della proteina KIF24 di regolare il trasporto assonale, con conseguente aumento di suscettibilità alla neurodegenerazione. In teoria, l'associazione osservata potrebbe ancora essere dovuta ad altre varianti alleliche localizzate in prossimità di quella studiata. Tuttavia, nessuno dei polimorfismi SNPs adiacenti in linkage disequilibrium con quello studiato e che danno luogo a sostituzione aminoacidica è predittivo di significativo impatto sulla funzione della proteina. Ciò supporta il concetto che l'aumento di rischio osservato sia veramente conferito dallo SNP rs1735074.

Quindi, il polimorfismo di singolo nucleotide (SNP) *KIF24* W218L potrebbe agire come fattore di rischio per la demenza frontotemporale (FTLD) sporadica, in particolare per la popolazione di sesso

femminile. La quota di rischio conferita dal genotipo AA è relativamente esigua, ma, nel contesto di una malattia multifattoriale, la presenza di tale polimorfismo potrebbe aumentare la suscettibilità alla FTLD tramite l'interazione con altri geni non ancora noti o con fattori ambientali. E' importante indubbiamente sottolineare che tali dati sono assolutamente preliminari e occorrono ulteriori analisi di conferma, preferibilmente su serie di casi la cui diagnosi sia supportata da marcatori di tipo neuropatologico (tau o TDP-43).

Sempre sul cromosoma 9, in una regione riportata essere in linkage con casi di FTLD familiare, si trova BCL2-associated athanogene 1 (BAG1), un gene che codifica per un fattore antiapoptotico che interagisce con la proteina tau e ne regola la degradazione mediante il sistema del proteasoma. Un aumento significativo dell'isoforma BAG-1M è stato rilevato nei cervelli di pazienti Alzheimer (AD) e la proteina colocalizza con le proteine tau e beta-amilode. BAG1 è espresso in sezioni di tessuto cerebrale di ippocampo ottenute da pazienti Alzheimer, il che pone interrogativi su un suo possibile ruolo nello sviluppo di questa patologia (Vance et al, 2006). Nonostante tale premessa, il nostro studio che ha analizzato l'associazione con pazienti AD, FTLD e controlli di due tagging SNPs (BAG1 rs706118 e CHMP5 rs844239), non ha riscontrato alcuna associazione con la malattia di Alzheimer (AD), trovandola invece con la demenza frontotemporale (FTLD). Si potrebbe perciò ipotizzare che, nonostante siano presenti alterazioni della regolazione della proteina tau in entrambe queste patologie neurodegenerative, vi siano meccanismi patogenetici differenti in ciascuna delle due. Inoltre, non vi sono studi sulla localizzazione cerebrale di BAG che escludano un ruolo di questa proteina nella FTLD. E ancora, non vi sono dati sulla capacità di BAG1 di legare differenti isoforme di proteina tau. Oltre al coinvolgimento nella regolazione della tau, BAG-1 è coinvolta in modo certo nella modulazione dell'apoptosi e della proliferazione cellulare, processi che possono contribuire alla morte neuronale.

Da ultimo, l'identificazione di fattori regolatori della processazione, metabolismo e trasporto dei mRNA, quali sono i miRNA e le hnRNPs, fornisce spunti di riflessione su come agiscano nella regolazione di proliferazione e differenziazione cellulare e dell'apoptosi nell'ambito della neurodegenerazione.

Sulla base dei dati ottenuti nella nostra popolazione di pazienti AD, FTLD e controlli sani, il genotipo della *hnRNP-A1* rs7967622 C/C sembra agire come fattore di rischio per la degenerazione frontotemporale (FTLD) in pazienti privi di mutazioni causali nei geni *GRN* e *MAPT* e prevalentemente nel sesso maschile, mentre non sembra avere effetto sulla suscettibilità verso la malattia di Alzheimer (AD).

I soggetti inclusi in questo studio sono stati reclutati in 6 sedi dell'Italia del nord, tutti di etnia caucasica e viventi in quelle zone da almeno due generazioni, ma non è possibile escludere in modo certo una parentela, poichè non vi sono dati disponibili sulla condivisione di aplotipi. Il rs7967622 tagging SNP si trova in una regione intronica ed il meccanismo mediante il quale aumenterebbe il rischio di sviluppare la FTLD non è noto.

Anche se il suddetto genotipo non influenza la suscettibilità a sviluppare l'AD, i livelli di espressione di *hnRNP-A1* appaiono aumentati nel campione di pazienti Alzheimer, mentre si osserva una riduzione dei livelli di trascritto del suo regolatore miR-590-3p. Tali risultati fanno perciò pensare ad una disregolazione di *hnRNP-A1*, forse mediata da miR590-3p, come è dimostrato da una correlazione

nettamente negativa tra i due trascritti. Sulla base di tali dati, possiamo ipotizzare un aumento di produzione di fattore trascrizionale hnRNP-A1, che potrebbe avere un ruolo nella patogenesi dell' AD, poiché esso è coinvolto nel processo di maturazione dell' mRNA della proteina APP (Donev et al, 2009). Tale disregolazione non è stata osservata nella FTLD, dove hnRNP-A1 potrebbe avere un ruolo, poiché contiene un dominio ricco di glicina che è comune ad altri fattori trascrizionali, quale è TDP-43, ben noto nella FTLD. E' tuttavia da sottolineare che la popolazione studiata è relativamente piccola e studi più ampi sono necessari per confermare queste conclusioni.

In conclusione, gli studi condotti supportano l'influenza di polimorfismi genetici di proteine che hanno un ruolo nei processi di proliferazione ed apoptosi neuronale e di fattori trascrizionali implicati nel metabolismo della proteina APP, con possibili ripercussioni sulla neurodegenerazione che è comune nella malattia di Alzheimer (AD) e nella degenerazione frontotemporale (FTLD)

Tali risultati sono da considerarsi preliminari e necessitano di replicazione in popolazioni indipendenti e, possibilmente, di analisi su tessuto cerebrale di pazienti.

## CONCLUSIONI

---

Questo studio ha preso in considerazione il ruolo di geni codificanti molecole legate ai processi neuronali di sopravvivenza, divisione, trasporto e metabolismo cellulare, come possibili fattori di suscettibilità, in quanto potenzialmente in grado di influenzare la neurodegenerazione, che rappresenta il punto d'arrivo comune della patogenesi di due patologie multigeniche ad eziologia complessa, la malattia di Alzheimer (AD) e la Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD).

Dai risultati dello studio di associazione di geni candidati posizionali e funzionali condotto nel nostro campione di pazienti affetti da Alzheimer (AD), demenza frontotemporale (FTLD) e controlli sani di pari età, è emerso che la presenza di polimorfismi di singolo nucleotide dei geni KIF24, BAG1-M e hnRNP1 può aumentare la suscettibilità alla demenza frontotemporale, mentre non sembra conferire un aumentato rischio di sviluppare Alzheimer. Tuttavia, relativamente alla proteina hnRNP1, i suoi livelli di espressione sono risultati più elevati nella popolazione AD, in concomitanza al riscontro di livelli ridotti del suo regolatore trascrizionale hsa-miR-590-3p.

Per quanto riguarda invece gli inibitori delle chinasi cellulari CDKN 2A e 2B, non sono emerse evidenze a favore di un loro ruolo come fattori di suscettibilità per la malattia di Alzheimer.

Quindi, benchè l'AD e la FTLD condividano processi molecolari comuni, le differenze emerse potrebbero essere correlate a meccanismi patogenetici specifici per le due patologie, soprattutto mediati dal peptide A $\beta$  nella AD e dalla proteina tau (o altre proteine) nella FTLD o anche allo specifico ruolo di alcuni geni in eventi patogenetici, che si verificano unicamente nella FTLD.

In futuro, sarebbe interessante approfondire il ruolo dei microRNA nella patogenesi delle malattie neurodegenerative, allo scopo di identificare nuovi fattori di suscettibilità.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Aisen P.S., "Anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease: implications of the prednisone trial", *Acta Neurol Scand Suppl.*, Vol. 176, 2000, pp. 85-9
- Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L., Finch C.E., Frautschy S., Griffin W.S., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrak R., Mackenzie I.R., McGeer P.L., O'Banion M.K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strommeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel F.L., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G., Wyss-Coray T., "Inflammation and Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.*, Vol. 21, no. 3, 2000, pp. 383-421
- Albers D.S., Beal M.F., "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease", *J Neural Transm Suppl.*, Vol. 59, 2000, pp. 133-54
- Amtul Z., Lewis P.A., Piper S., Crook R., Baker M., Findlay K., Singleton A., Hogg M., Younkin L., Younkin S.G., Hardy J., Hutton M., Boeve B.F., Tang-Wai D., Golde T.E., "A presenilin 1 mutation associated with familial frontotemporal dementia inhibits gamma-secretase cleavage of APP and notch", *Neurobiol Dis.*, Vol. 9, no. 2, 2002, pp. 269-73
- Andreasen N., Vanmechelen E., Van de Voorde A., Davidsson P., Hesse C., Tarvonen S., R  ih   I., Sourander L., Winblad B., Blennow K., "Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study", *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, Vol. 64, no. 3, 1998, pp. 298-305
- Andreasen N., Sjögren M., Blennow K., "CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42", *World J Biol Psychiatry.*, Vol. 4, no. 4, 2003, pp. 147-55
- Andreasen N., Blennow K., "CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease", *Clin Neurol Neurosurg.*, Vol. 107, no. 3, 2005, pp. 165-73
- Arendt T., Rodel L., Gartner U., Holzer M (1996) Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 7:3047-3049
- Arendt T. *Synaptic degeneration in Alzheimer's disease*. *Acta Neuropathol* (2009). 118:167-179



- Arnold S.E., Han L.Y., Clark C.M., Grossman M., Trojanowski J.Q., "Quantitative neurohistological features of frontotemporal degeneration", *Neurobiol Aging*, Vol. 21, no. 6, 2000, pp. 913-9
- Arosio B., Trabattoni D., Galimberti L., Bucciarelli P., Fasano F., Calabresi C., Cazzullo C.L., Vergani C., Annoni G., Clerici M., "Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging*, Vol. 25, no. 8, 2004, pp. 1009-15
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J., "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development", *Science*, Vol. 284, no. 5415, 1999, pp. 770-6
- Atwood C.S., Robinson S.R., Smith M.A., "Amyloid-beta: redox-metal chelator and antioxidant", *J Alzheimers Dis*. Vol. 4, no. 3, 2002, pp. 203-14
- Bagli M., Papassotiropoulos A., Knapp M., Jessen F., Luise Rao M., Maier W., Heun R., "Association between an interleukin-6 promoter and 3' flanking region haplotype and reduced Alzheimer's disease risk in a German population", *Neurosci Lett*. Vol. 283, no. 2, 2000, pp. 109-12
- Bagnoli S., Cellini E., Tedde A., Nacmias B., Piacentini S., Bessi V., Bracco L., Sorbi S., "Association of IL10 promoter polymorphism in Italian Alzheimer's disease", *Neurosci Lett*. Vol. 418, no. 3, 2007, pp. 262-5
- Baker M., Mackenzie I.R., Pickering-Brown S.M., Gass J., Rademakers R., Lindholm C., Snowden J., Adamson J., Sadovnick A.D., Rollinson S., Cannon A., Dwosh E., Neary D., Melquist S., Richardson A., Dickson D., Berger Z., Eriksen J., Robinson T., Zehr C., Dickey C.A., Crook R., McGowan E., Mann D., Boeve B., Feldman H., Hutton M., "Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17", *Nature*, Vol. 442, no. 7105, 2006, pp. 916-9
- Baumeister R., Leimer U., Zweckbronner I., Jakubek C., Grünberg J., Haass C., "Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing", *Genes Funct.*, Vol. 1, no. 2, 1997, pp. 149-59
- Beal M.F., "Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration", *Curr Opin Neurobiol.*, Vol. 6, no. 5, 1996, pp. 661-6
- Bentahir M., Nyabi O., Verhamme J., Tolia A., Horré K., Wiltfang J., Esselmann H., De Strooper B., "Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms", *J Neurochem.*, Vol. 96, no. 3, 2006, pp. 732-42
- Benussi L., Binetti G., Sina E., Gigola L., Bettecken T., Meitinger T., Ghidoni R., "A novel deletion in progranulin gene is associated with FTDP-17 and CBS", *Neurobiol Aging*, Vol. 29, no. 3, 2008, pp. 427-35
- Benzi G., Moretti A., "Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease?", *Neurobiol Aging*, Vol. 16, no. 4, 1995, pp. 661-74
- Berezovska O., Jack C., McLean P., Aster J.C., Hicks C., Xia W., Wolfe M.S., Kimberly W.T., Weinmaster G., Selkoe D.J., Hyman B.T., "Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of notch1 signaling", *J Neurochem.*, Vol. 75, no. 2, 2000, pp. 583-93
- Bernardi L., Tomaino C., Anfossi M., Gallo M., Geracitano S., Costanzo A., Colao R., Puccio G., Frangipane F., Curcio S.A., Mirabelli M., Smirne N., Iapaolo D., Maletta R.G., Bruni A.C., "Novel

- 
- PSEN1 and PGRN mutations in early-onset familial frontotemporal dementia”, *Neurobiol Aging.*, 2008; epub ahead of print
- Bernardi L., Maletta R.G., Tomaino C., Smirne N., Di Natale M., Perri M., Longo T., Colao R., Curcio S.A., Puccio G., Mirabelli M., Kawarai T., Rogaeva E., St George Hyslop P.H., Passarino G., De Benedictis G., Bruni A.C., “The effects of APOE and tau gene variability on risk of frontotemporal dementia”, *Neurobiol Aging.*, Vol. 27, no. 5, 2006, pp. 702-9
  - Binetti G., Signorini S., Squitti R., Alberici A., Benussi L., Cassetta E., Frisoni G.B., Barbiero L., Feudatari E., Nicosia F., Testa C., Zanetti O., Gennarelli M., Perani D., Anchisi D., Ghidoni R., Rossini P.M., “Atypical dementia associated with a novel presenilin-2 mutation”, *Ann Neurol.*, Vol. 54, no. 6, 2003, pp. 832-6
  - Bisaglia M., Venezia V., Piccioli P., Stanzione S., Porcile C., Russo C., Mancini F., Milanese C., Schettini G., “Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation”, *Neurochem Int.*, Vol. 41, no. 1, 2002, pp. 43-54
  - Blenow K., Wallin A., Agren H., Spenger C., Siegfried J., Vanmechelen E., “Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical diagnostic marker for axonal degeneration in Alzheimer’s disease?”, *Mol Chem Neuropathology.*, Vol. 26, no. 3, 1995, pp. 231-45
  - Blenow K., Hampel H., “CSF markers for incipient Alzheimer’s disease”, *Lancet Neurol.*, Vol. 2, no. 10, 2003, pp. 605-613
  - Boeve B.F., Hutton M., “Refining frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17: introducing FTDP-17 (MAPT) and FTDP-17 (PGRN)”, *Arch Neurol.*, Vol. 65, no. 4, 2008, pp. 460-4
  - Borchelt D.R., Thinakaran G., Eckman C.B., Lee M.K., Davenport F., Ratovitsky T., Prada C.M., Kim G., Seekins S., Yager D., Slunt H.H., Wang R., Seeger M., Levey A.I., Gandy S.E., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L., Younkin S.G., Sisodia S.S., “Familial Alzheimer’s disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo”, *Neuron.*, Vol. 17, no. 5, 1996, pp. 1005-13
  - Borroni B., Archetti S., Alberici A., Agosti C., Gennarelli M., Bigni B., Bonvicini C., Ferrari M., Bellelli G., Galimberti D., Scarpini E., Di Lorenzo D., Caimi L., Caltagirone C., Di Luca M., Padovani A., “Progranulin genetic variations in frontotemporal lobar degeneration: evidence for low mutation frequency in an Italian clinical series”, *Neurogenetics.*, Vol. 9, no. 3, 2008, pp. 197-205
  - Bros M., Boissel J.P., Gödtel-Armbrust U., Förstermann U., “Transcription of human neuronal nitric oxide synthase mRNAs derived from different first exons is partly controlled by exon 1-specific promoter sequences”, *Genomics.*, Vol. 87, no. 4, 2006, pp. 463-73
  - Brown J., Ashworth A., Gydesen S., Sorensen A., Rossor M., Hardy J., Collinge J., “Familial non-specific dementia maps to chromosome 3”, *Hum Mol Genet.*, Vol. 4, no. 9, 1995, pp. 1625-8
  - Brown J., Gydesen S., Johannsen P., Gade A., Skibinski G., Chakrabarti L., Brun A., Spillantini M., Yancopoulou D., Thusgaard T., Sorensen A., Fisher E., Collinge J., FReJA (Frontotemporal Dementia Research in Jutland Association), “Frontotemporal dementia linked to chromosome 3”, *Dement Geriatr Cogn Disord.* Vol. 17, no. 4, 2004, pp. 274-6
-

- Buerger K., Zinkowski R., Teipel S.J., Arai H., De Bernardis J., Kerman D., "Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231", *Am J Psychiatry.*, Vol. 160, no. 2, 2003, pp. 376-9
- Busciglio J., Gabuzda D.H., Matsudaira P., Yankner B.A., "Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 90, no. 5, 1993, pp. 2092-6
- Butterfield D.A., Hensley K., Harris M., Mattson M., Carney J., "Beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease", *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 200, no. 2, 1994, pp. 710-5
- Capell A., Grünberg J., Pesold B., Diehlmann A., Citron M., Nixon R., Beyreuther K., Selkoe D.J., Haass C., "The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex", *J Biol Chem.*, Vol. 273, no. 6, 1998, pp. 3205-11
- Caramelli P., Robitaille Y., Laroche-Cholette A., Nitrini R., Gauvreau D., Joannette Y., Lecours A.R., "Structural correlates of cognitive deficits in a selected group of patients with Alzheimer's disease", *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol.*, Vol. 11, no. 4, 1998, pp. 184-90
- Catani M., Piccirilli M., Geloso M.C., Cherubini A., Finali G., Pelliccioli G., Senin U., Mecocci P., "Rapidly progressive aphasic dementia with motor neuron disease: a distinctive clinical entity", *Dement Geriatr Cogn Disord.*, Vol. 17, no. 1-2, 2004, pp. 21-8
- Cattaruzza M., Guzik T.J., Słodowski W., Pelvan A., Becker J., Halle M., Buchwald A.B., Channon K.M., Hecker M., "Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease", *Circ Res.*, Vol. 95, no. 8, 2004, pp. 841-7
- Chang KH, de Pablo Y, Lee HP, Lee HG, Smith MA, Shah K. Cdk5 is a major regulator of p38 cascade: relevance to neurotoxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2010 Jun;113(5):1221-9.
- Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J., et al., "Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene", *Nature.*, Vol. 353, no. 6347, 1991, pp. 844-6
- Chung H.M., Struhl G., "Nicastrin is required for Presenilin-mediated transmembrane cleavage in *Drosophila*", *Nat Cell Biol.*, Vol. 3, no. 12, 2001, pp. 1129-32
- Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G., Johnson-Wood K., Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R., Sherrington R., Perry B., Yao H., Strome R., Lieberburg I., Rommens J., Kim S., Schenk D., Fraser P., St George Hyslop P., Selkoe D.J., "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice", *Nat Med.*, Vol. 3, no. 1, 1997, pp. 67-72
- Colombo M.G., Paradossi U., Andreassi M.G., Botto N., Manfredi S., Masetti S., Biagini A., Clerico A., "Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease", *Clin Chem.*, Vol. 49, no. 3, 2003, pp. 389-95
- Colton C.A., Gilbert D.L., "Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia", *FEBS Lett.*, Vol. 223, no. 2, 1987, pp. 284-8

- Coon K.D., Myers A.J., Craig D.W., Webster J.A., Pearson J.V., Lince D.H., Zismann V.L., Beach T.G., Leung D., Bryden L., Halperin R.F., Marlowe L., Kaleem M., Walker D.G., Ravid R., Heward C.B., Rogers J., Papassotiropoulos A., Reiman E.M., Hardy J., Stephan D.A., "A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease", *J Clin Psychiatry.*, Vol. 68, no. 4, 2007, pp. 613-8
- Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families", *Nature.*, Vol. 261, no. 5123, 1993, pp. 921-3
- Corder E.H., Saunders A.M., Risch N.J., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C. Jr, Rimmler J.B., Locke P.A., Conneally P.M., Schmechel K.E., et al., "Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease", *Nat Genet.*, Vol. 7, no. 2, 1994, pp. 180-4
- Cruts M., Gijssels I., van der Zee J., Engelborghs S., Wils H., Pirici D., Rademakers R., Vandenberghe R., Dermaut B., Martin J.J., van Duijn C., Peeters K., Sciot R., Santens P., De Pooter T., Mattheijssens M., Van den Broeck M., Cuijt I., Vennekens K., De Deyn P.P., Kumar-Singh S., Van Broeckhoven C., "Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21", *Nature.*, Vol. 442, no. 7105, 2006, pp. 920-4
- Culpan D., Prince J.A., Matthews S., Palmer L., Hughes A., Love S., Kehoe P.G., Wilcock G.K., "Neither sequence variation in the IL-10 gene promoter nor presence of IL-10 protein in the cerebral cortex is associated with Alzheimer's disease", *Neurosci Lett.*, Vol. 408, no. 2, 2006, pp. 141-5
- Cummings J.L., Benson D.F., "Dementia: a clinical approach" 1992 2nd edition, Boston, Butterworths
- Dahiyat M., Cumming A., Harrington C., Wischik C., Xuereb J., Corrigan F., Breen G., Shaw D., St Clair D., "Association between Alzheimer's disease and the NOS3 gene", *Ann Neurol.*, Vol. 46, no. 4, 1999, pp. 664-7
- Das S., Potter H., "Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL-1", *Neuron.*, Vol. 14, no. 2, 1995, pp. 447-56
- Davis J.A., Naruse S., Chen H., Eckman C., Younkin S., Price D.L., Borchelt D.R., Sisodia S.S., Wong P.C., "An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos", *Neuron.* Vol. 20, no. 3, 1998, pp. 603-9
- Davis K.L., Mohs R.C., Marin D., Purohit D.P., Perl D.P., Lantz M., Austin G., Haroutunian V., "Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease", *JAMA.*, Vol. 281, no. 15, 1999, pp. 1401-6
- Dermaut B., Kumar-Singh S., Engelborghs S., Theuns J., Rademakers R., Saerens J., Pickut B.A., Peeters K., van den Broeck M., Vennekens K., Claes S., Cruts M., Cras P., Martin J.J., Van Broeckhoven C., De Deyn P.P., "A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques", *Ann Neurol.*, Vol. 55, no. 5, 2004, pp. 617-26
- De Strooper B., Umans L., Van Leuven F., Van Den Berghe H., "Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway", *J Cell Biol.*, Vol. 121, no. 2, 1993, pp. 295-304

- 
- De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K., Van Leuven F., "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein", *Nature.*, Vol. 391, no. 6665, 1998, pp. 387-90
  - De Strooper B., Annaert W., Cupers P., Saftig P., Craessaerts K., Mumm J.S., Schroeter E.H., Schrijvers V., Wolfe M.S., Ray W.J., Goate A., Kopan R., "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain", *Nature.*, Vol. 398, no. 6727, 1999, pp. 518-22
  - Di Bona D., Plaia A., Vasto S., Cavallone L., Lescai F., Franceschi C., Licastro F., Colonna-Romano G., Lio D., Candore G., Caruso C., "Association between the interleukin-1beta polymorphisms and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis", *Brain Res Rev.*, Vol. 59, no. 1, 2008, pp. 155-63
  - Dickson D.W., "The pathogenesis of senile plaques", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 56, no. 4, 1997, pp. 321-39
  - Donev R, Newall A, Thome J, Sheer D (2009) A role for SC35 and hnRNPA1 in the determination of Amyloid Precursor Protein isoforms. *Mol Psychiatry* 12(7), 681-690
  - Du Y., Dodel R.C., Eastwood B.J., Bales K.R., Gao F., Lohmüller F., Müller U., Kurz A., Zimmer R., Evans R.M., Hake A., Gasser T., Oertel W.H., Griffin W.S., Paul S.M., Farlow M.R., "Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease", *Neurology.*, Vol. 55, no. 4, 2000, pp. 480-3
  - Dubois B., Feldman H.H., Jacova C., Dekosky S.T., Barberger-Gateau P., Cummings J., Delacourte A., Galasko D., Gauthier S., Jicha G., Meguro K., O'Brien J., Pasquier F., Robert P., Rossor M., Salloway S., Stern Y., Visser P.J., Scheltens P., "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria", *Lancet Neurol.*, Vol. 6, no. 8, 2007, pp. 734-46
  - Dubois B., Feldman H.H., Jacova C, Cummings J, Dekosky S.T, Baberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza L, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*, 2010; 9:1118-27.
  - Duff K., Eckman C., Zehr C., Yu X., Prada C.M., Perez-tur J., Hutton M., Buee L., Harigaya Y., Yager D., Morgan D., Gordon M.N., Holcomb L., Refolo L., Zenk B., Hardy J., Younkin S., "Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1", *Nature.*, Vol. 383, no. 6602, 1996, pp. 710-3
  - Dursun E., Gezen-Ak D., Ertan T., Bilgiç B., Gürvit H., Emre M., Eker E., Engin F., Uysal O., Yilmazer S., "Interleukin-1alpha -889 C/T polymorphism in Turkish patients with late-onset Alzheimer's disease", *Dement Geriatr Cogn Disord.*, Vol. 27, no. 1, 2009, pp. 82-7
  - Edbauer D., Winkler E., Haass C., Steiner H., "Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 99, no. 13, 2002, pp. 8666-71
  - Edbauer D., Winkler E., Regula J.T., Pesold B., Steiner H., Haass C., "Reconstitution of gamma-secretase activity", *Nat Cell Biol.*, Vol. 5, no. 5, 2003, pp. 486-8
-

- 
- Eikelenboom P., Veerhuis R., "The importance of inflammatory mechanisms for the development of Alzheimer's disease", *Exp Gerontol.*, Vol. 34, no. 3, 1999, pp. 453-61  
Elliott E, Laufer O, Ginzburg I (2009) BAG-1M is up-regulated in hippocampus of Alzheimer's disease patients and associates with tau and APP proteins. *J Neurochem* 109(4),1168-78.
  - Engelborghs S., Dermaut B., Goeman J., Saerens J., Mariën P., Pickut B.A., Van den Broeck M., Serneels S., Cruts M., Van Broeckhoven C., De Deyn P.P., "Prospective Belgian study of neurodegenerative and vascular dementia: APOE genotype effects", *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, Vol. 74, no. 8, 2003, pp. 1148-51
  - Esch F.S., Keim P.S., Beattie E.C., Blacher R.W., Culwell A.R., Oltersdorf T., McClure D., Ward P.J., "Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor", *Science.*, Vol. 248, no. 4959, 1990, pp. 1122-4
  - Esler W.P., Kimberly W.T., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Moore C.L., Tsai J.Y., Rahmati T., Xia W., Selkoe D.J., Wolfe M.S., "Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1", *Nat Cell Biol.*, Vol. 2, no. 7, 2000, pp. 428-34
  - Esler W.P., Wolfe M.S., "A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces", *Science.*, Vol. 293, no. 5534, 2001, pp. 1449-54
  - Evans K.C., Berger E.P., Cho C.G., Weisgraber K.H., Lansbury P.T. Jr, "Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 92, no. 3, 1995, pp. 763-7
  - Farrer L.A., Abraham C.R., Volicer L., Foley E.J., Kowall N.W., McKee A.C., Wells J.M., "Allele epsilon 4 of apolipoprotein E shows a dose effect on age at onset of Pick disease", *Exp Neurol.*, Vol. 136, no. 2, 1995, pp. 162-70
  - Fenoglio C., Galimberti D., Lovati C., Guidi I., Gatti A., Fogliarino S., Tiriticco M., Mariani C., Forloni G., Pettenati C., Baron P., Conti G., Bresolin N., Scarpini E., "MCP-1 in Alzheimer's disease patients: A-2518G polymorphism and serum levels", *Neurobiol Aging.*, Vol. 25, no. 9, 2004, pp. 1169-73
  - Fenoglio C., Galimberti D., Ban M., Maranian M., Scalabrini D., Venturelli E., Piccio L., De Riz M., Yeo T.W., Goris A., Gray J., Bresolin N., Scarpini E., Compston A., Sawcer S., "SELPLG and SELP single-nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis", *Neurosci Lett.*, Vol. 394, no. 2, 2006, pp. 92-6
  - Finnerty JR, Wang WX, Hebert S, Wilfred B, Mao G, Nelson PT. The miR-15/107 Group of MicroRNA Genes: Evolutionary Biology, Cellular Functions, and Roles in Human Diseases. *J Mol Biol* (2010). In Press
  - Friedland R.P., Budinger T.F., Ganz E., Yano Y., Mathis C.A., Koss B., Ober B.A., Huesman R.H., Derenzo S.E., "Regional cerebral metabolic alterations in dementia of the Alzheimer type: positron emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose", *J Comput Assist Tomogr.*, Vol. 7, no. 4, 1983, pp. 590-8
  - Furukawa K., Sopher B.L., Rydel R.E., Begley J.G., Pham D.G., Martin G.M., Fox M., Mattson M.P., "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain", *J Neurochem.*, Vol. 67, no. 5, 1996, pp. 1882-96
-

- Gahtan E., Overmier J.B., "Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli", *Neurosci Biobehav Rev.*, Vol. 23, no. 5, 1999, pp. 615-33
- Galea E., Feinstein D.L., Reis D.J., "Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 89, no. 22, 1992; pp. 10945-9
- Galimberti D., Schoonenboom N., Scarpini E., Scheltens P., Dutch-Italian Alzheimer Research Group., "Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients", *Ann Neurol.*, Vol. 53, no. 4, 2003, pp. 547-8
- Galimberti D., Fenoglio C., Lovati C., Gatti A., Guidi I., Venturelli E., Cutter G.R., Mariani C., Forloni G., Pettenati C., Baron P., Conti G., Bresolin N., Scarpini E., "CCR2-64I polymorphism and CCR5Delta32 deletion in patients with Alzheimer's disease", *J Neurol Sci.*, Vol. 225, no. 1-2, 2004, pp. 79-83
- Galimberti D., Venturelli E., Gatti A., Lovati C., Fenoglio C., Mariani C., Forloni G.L., Bresolin N., Scarpini E., "Association of neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism with Alzheimer's disease", *J Neurol.*, Vol. 252, no. 8, 2005, pp. 985-6
- Galimberti D., Schoonenboom N., Scheltens P., Fenoglio C., Venturelli E., Pijnenburg Y.A., Bresolin N., Scarpini E., "Intrathecal chemokine levels in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration", *Neurology.*, Vol. 66, no. 1, 2006, pp. 146-7
- Galimberti D., Schoonenboom N., Scheltens P., Fenoglio C., Bouwman F., Venturelli E., Guidi I., Blankenstein M.A., Bresolin N., Scarpini E., "Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease", *Arch Neurol.*, Vol. 63, no. 4, 2006, pp. 538-43
- Galimberti D., Scarpini E., Venturelli E., Strobel A., Herterich S., Fenoglio C., Guidi I., Scalabrini D., Cortini F., Bresolin N., Lesch K.P., Reif A., "Association of a NOS1 promoter repeat with Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.*, Vol. 29, no. 9, 2008, pp. 1359-65
- Gass J., Cannon A., Mackenzie I.R., Boeve B., Baker M., Adamson J., Crook R., Melquist S., Kuntz K., Petersen R., Josephs K., Pickering-Brown S.M., Graff-Radford N., Uitti R., Dickson D., Wszolek Z., Gonzalez J., Beach T.G., Bigio E., Johnson N., Weintraub S., Mesulam M., White C.L. 3rd, Woodruff B., Caselli R., Hsiung G.Y., Feldman H., Knopman D., Hutton M., Rademakers R., "Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration", *Hum Mol Genet.*, Vol. 15, no. 20, 2006, pp. 2988-3001
- Gearing M., Mori H., Mirra S.S., "Abeta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease", *Ann Neurol.*, Vol. 39, no. 3, 1996, pp. 395-9
- Geldmacher D.S., Whitehouse P.J., "Evaluation of dementia", *N Engl J Med.*, Vol. 335, no. 5, 1996, pp. 330-6
- Gella A., Durany N., "Oxidative stress in Alzheimer disease", *Cell Adh Migr.*, Vol. 3, no. 1, 2009, epub ahead of print
- Georgakopoulos A., Marambaud P., Efthimiopoulos S., Shioi J., Cui W., Li H.C., Schütte M., Gordon R., Holstein G.R., Martinelli G., Mehta P., Friedrich V.L. Jr, Robakis N.K., "Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts", *Mol Cell.*, Vol. 4, no. 6, 1999, pp. 893-902

- Gerst J.L., Siedlak S.L., Nunomura A., Castellani R., Perry G., Smith M.A., "Role of oxidative stress in frontotemporal dementia", *Dement Geriatr Cogn Disord.*, Vol. 10 Suppl 1, 1999, pp. 85-7
- Geschwind D., Karrim J., Nelson S.F., Miller B., "The apolipoprotein E epsilon4 allele is not a significant risk factor for frontotemporal dementia", *Ann Neurol.*, Vol. 44, no. 1, 1998, 134-8
- Ghilardi G., Biondi M.L., DeMonti M., Bernini M., Turri O., Massaro F., Guagnellini E., Scorza R., "Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene", *Clin Chem.*, Vol. 48, no. 7, 2002, pp. 989-93
- Ghiso J., Matsubara E., Koudinov A., Choi-Miura N.H., Tomita M., Wisniewski T., Frangione B., "The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex", *Biochem J.*, Vol. 293, no. Pt. 1, 1993, pp. 27-30
- Giovagnoli A.R., Marcon G., Giaccone G., Confaloni A.M., Tagliavini F., "Cognitive deficits in familial Alzheimer's disease associated with M239V mutation of presenilin 2", *Dement Geriatr Cogn Disord.*, Vol. 22, no. 3, 2006, pp. 238-43
- Glenner G.G., Wong C.W., "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein", *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 122, no. 3, 1984, pp. 1131-5
- Glenner G.G., Wong C.W., "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein", *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 120, no. 3, 1984, pp. 885-90
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al., "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease", *Nature.*, Vol. 349, no. 6311, 1991, pp. 704-6
- Goedert M., Spillantini M.G., Crowther R.A., "Tau proteins and neurofibrillary degeneration", *Brain Pathol.*, Vol. 1, no. 4, 1991, pp. 279-86
- Goedert M., Jakes R., "Mutations causing neurodegenerative tauopathies", *Biochim Biophys Acta.*, Vol. 1739, no. 2-3, 2005, pp. 240-50
- González-Scarano F., Baltuch G., "Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases", *Annu Rev Neurosci.*, Vol. 22, 1999, pp. 219-40
- Gowing E., Roher A.E., Woods A.S., Cotter R.J., Chaney M., Little S.P., Ball M.J., "Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease", *J Biol Chem.*, Vol. 269, no. 15, 1994, pp. 10987-90
- Green A.J., Keir G., Thompson E.J., "A specific and sensitive ELISA for measuring S-100b in cerebrospinal fluid", *J Immunol Methods.*, Vol. 205, no. 1, 1997, pp. 35-41
- Greenwald I., "LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies", *Genes Dev.*, Vol. 12, no. 12, 1998, pp. 1751-62
- Griffin W.S., Sheng J.G., Roberts G.W., Mrak R.E., "Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 54, no. 2, 1995, pp. 276-81



- Grimaldi L.M., Casadei V.M., Ferri C., Veglia F., Licastro F., Annoni G., Biunno I., De Bellis G., Sorbi S., Mariani C., Canal N., Griffin W.S., Franceschi M., "Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism", *Ann Neurol.*, Vol. 47, no. 3, 2000, pp. 361-5
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., Quinlan M., Wisniewski H.M., Binder L.I., "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 83, no. 13, 1986, pp. 4913-7
- Grupe A., Li Y., Rowland C., Nowotny P., Hinrichs A.L., Smemo S., Kauwe J.S., Maxwell T.J., Cherny S., Doil L., Tacey K., van Luchene R., Myers A., Wavrant-De Vrièze F., Kaleem M., Hollingworth P., Jehu L., Foy C., Archer N., Hamilton G., Holmans P., Morris C.M., Catanese J., Sninsky J., White T.J., Powell J., Hardy J., O'Donovan M., Lovestone S., Jones L., Morris J.C., Thal L., Owen M., Williams J., Goate A., "A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with late-onset Alzheimer disease", *Am J Hum Genet.*, Vol. 78, no. 1, 2006, pp. 78-88
- Guidi I., Galimberti D., Venturelli E., Lovati C., Del Bo R., Fenoglio C., Gatti A., Dominici R., Galbiati S., Virgilio R., Pomati S., Comi G.P., Mariani C., Forloni G., Bresolin N., Scarpini E., "Influence of the Glu298Asp polymorphism of NOS3 on age at onset and homocysteine levels in AD patients", *Neurobiol Aging.*, Vol. 26, no. 6, 2005, pp. 789-94
- Guil S, Cáceras JF (2007) The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* 14(7), 591-596
- Gustafson L., Abrahamson M., Grubb A., Nilsson K., Fex G., "Apolipoprotein-E genotyping in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia", *Dement Geriatr Cogn Disord.*, Vol. 8, no. 4, 1997, pp. 240-3
- Haass C., Hung A.Y., Selkoe D.J., "Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion", *J Neurosci.*, Vol. 11, no. 12, 1991, pp. 3783-93
- Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L., Lieberburg I., Koo E.H., Schenk D., Teplow D.B., et al., "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism", *Nature.*, Vol. 359, no. 6393, 1992, pp. 322-5
- Haass C., Lemere C.A., Capell A., Citron M., Seubert P., Schenk D., Lannfelt L., Selkoe D.J., "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway", *Nat Med.*, Vol. 1, no. 12, 1995, pp. 1291-6
- Halliday G.M., Song Y.J., Lepar G., Brooks W.S., Kwok J.B., Kersaitis C., Gregory G., Shepherd C.E., Rahimi F., Schofield P.R., Kril J.J., "Pick bodies in a family with presenilin-1 Alzheimer's disease", *Ann Neurol.*, Vol. 57, no. 1, 2005, pp. 139-43
- Halliwell B., "Antioxidants and human disease: a general introduction", *Nutr Rev.*, Vol. 55, no. 1 Pt 2, 1997, pp. S44-9
- Hampel H., Buerger K., Zinkowski R., Teipel S.J., Goernitz A., Andreasen N., Sjoegren M., DeBernardis J., Kerkman D., Ishiguro K., Ohno H., Vanmechelen E., Vanderstichele H., McCulloch C., Moller H.J., Davies P., Blennow K., "Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential

- diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study”, *Arch Gen Psychiatry.*, Vol. 61, no. 1, 2004, pp. 95-102
- Hamshere ML, Holmans PA, Avramopoulos D, Bassett SS, Blacker D, Bertram L, Wiener H, Rochberg N, Tanzi RE, Myers A, Wavrant-De Vrièze F, Go R, Fallin D, Lovestone S, Hardy J, Goate A, O'Donovan M, Williams J, Owen MJ (2007) Genome-wide linkage analysis of 723 affected relative pairs with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 16: 2703-2712
  - Hedley R., Hallmayer J., Groth D.M., Brooks W.S., Gandy S.E., Martins R.N., “Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia”, *Ann Neurol.*, Vol. 51, no. 6, 2002, pp. 795-7
  - Helisalmi S., Linnaranta K., Lehtovirta M., Mannermaa A., Heinonen O., Rynänen M., Riekinen P. Sr., Soininen H., “Apolipoprotein E polymorphism in patients with different neurodegenerative disorders”, *Neurosci Lett.*, Vol. 205, no. 1, 1996, pp. 61-4
  - Heese K., Nagai Y., Sawada T., “Induction of rat L-phosphoserine phosphatase by amyloid-beta (1-42) is inhibited by interleukin-11”, *Neurosci Lett.*, Vol. 288, no. 1, 2000, pp. 37-40
  - Hendriks L., van Duijn C.M., Cras P., Cruts M., Van Hul W., van Harskamp F., Warren A., McInnis M.G., Antonarakis S.E., Martin J.J., et al., “Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene”, *Nat Genet.*, Vol. 1, no. 3, 1992, pp. 218-21
  - Herreman A., Serneels L., Annaert W., Collen D., Schoonjans L., De Strooper B., “Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells”, *Nat Cell Biol.*, Vol. 2, no. 7, 2000, pp. 461-2
  - Hesse C., Rosengren L., Andreasen N., Davidsson P., Vanderstichele H., Vanmechelen E., Blennow K., “Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke”, *Neurosci Lett.*, Vol. 297, no. 3, 2001, pp. 187-90
  - Higgins L.S., Murphy G.M. Jr, Forno L.S., Catalano R., Cordell B., “P3 beta-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain”, *Am J Pathol.*, Vol. 149, no. 2, 1996, pp. 585-96
  - Hirai K., Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R.L., Atwood C.S., Johnson A.B., Kress Y., Vinters H.V., Tabaton M., Shimohama S., Cash A.D., Siedlak S.L., Harris P.L., Jones P.K., Petersen R.B., Perry G., Smith M.A., “Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease”, *J Neurosci.*, Vol. 21, no. 9, 2001, pp. 3017-23
  - Hodges J.R., Davies R.R., Xuereb J.H., Casey B., Broe M., Bak T.H., Kril J.J., Halliday G.M., “Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia”, *Ann Neurol.*, Vol. 56, no. 3, 2004, pp. 399-406
  - Holcomb L., Gordon M.N., McGowan E., Yu X., Benkovic S., Jantzen P., Wright K., Saad I., Mueller R., Morgan D., Sanders S., Zehr C., O'Campo K., Hardy J., Prada C.M., Eckman C., Younkin S., Hsiao K., Duff K., “Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes”, *Nat Med.*, Vol. 4, no. 1, 1998, pp. 97-100

- Hollister R.D., Xia M., McNamara M.J., Hyman B.T., "Neuronal expression of class II major histocompatibility complex (HLA-DR) in 2 cases of Pick disease", *Arch Neurol.*, Vol. 54, no. 3, 1997, pp. 243-8
- Holmberg B., Johnels B., Blennow K., Rosengren L., "Cerebrospinal fluid Abeta42 is reduced in multiple system atrophy but normal in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy", *Mov Disord.*, Vol. 18, no. 2, 2003, pp. 186-190
- Horwood N., Davies D.C., "Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease", *Virchows Arch.*, Vol. 425, no. 1, 1994, pp. 69-72
- Hosler B.A., Siddique T., Sapp P.C., Sailor W., Huang M.C., Hossain A., Daube J.R., Nance M., Fan C., Kaplan J., Hung W.Y., McKenna-Yasek D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Horvitz H.R., Brown R.H. Jr, "Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22", *JAMA.*, Vol. 284, no. 13, 2000; pp. 1664-9
- Hou C.E., Carlin D., Miller B.L., "Non-Alzheimer's disease dementias: anatomic, clinical, and molecular correlates", *Can J Psychiatry.*, Vol. 49, no. 3, 2004, pp. 164-71
- Hu Y.Y., He S.S., Wang X., Duan Q.H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Wang J., "Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients : an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay", *Am J Pathol.*, Vol. 160, no. 4, 2002, pp. 1269-1278
- Hung A.Y., Selkoe D.J., "Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein", *EMBO J.*, Vol. 13, no. 3, 1994, pp. 534-42
- Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlden H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., Hackett J., Adamson J., Lincoln S., Dickson D., Davies P., Petersen R.C., Stevens M., de Graaff E., Wauters E., van Baren J., Hillebrand M., Joosse M., Kwon J.M., Nowotny P., Che L.K., Norton J., Morris J.C., Reed L.A., Trojanowski J., Basun H., Lannfelt L., Neystat M., Fahn S., Dark F., Tannenberg T., Dodd P.R., Hayward N., Kwok J.B., Schofield P.R., Andreadis A., Snowden J., Craufurd D., Neary D., Owen F., Oostra B.A., Hardy J., Goate A., van Swieten J., Mann D., Lynch T., Heutink P., "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17", *Nature.*, Vol. 393, no. 6686, 1998, pp. 702-5
- Hyndman M.E., Parsons H.G., Verma S., Bridge P.J., Edworthy S., Jones C., Lonn E., Charbonneau F., Anderson T.J., "The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension", *Hypertension.*, Vol. 39, no. 4, 2002, pp. 919-22
- Illenberger S., Zheng-Fischhöfer Q., Preuss U., Stamer K., Baumann K., Trinczek B., Biernat J., Godemann R., Mandelkow E.M., Mandelkow E., "The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease", *Mol Biol Cell.*, Vol. 9, no. 6, 1998, pp. 1495-512
- Ishiguro K., Ohno H., Arai H., Yamaguchi H., Urakami K., Park J.M., Sato K., Kohno H., Imahori K., "Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease", *Neurosci Lett.*, Vol. 270, no. 2, 1999, pp. 91-4

- Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., Ihara Y., "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)", *Neuron.*, Vol. 13, no. 1, 1994, pp. 45-53
- Iwatsubo T., Mann D.M., Odaka A., Suzuki N., Ihara Y., "Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome", *Ann Neurol.*, Vol. 37, no. 3, 1995, pp. 294-9
- Jarrett J.T., Berger E.P., Lansbury P.T. Jr, "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease", *Biochemistry.*, Vol. 32, no. 18, 1993, pp. 4693-7
- Johnstone M., Gearing A.J., Miller K.M., "A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced", *J Neuroimmunol.*, Vol. 93, no. 1-2, 1999, pp. 182-93
- Kaether C., Lammich S., Edbauer D., Ertl M., Rietdorf J., Capell A., Steiner H., Haass C., "Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane", *J Cell Biol.*, Vol. 158, no. 3, 2002, pp. 551-61
- Kalaria R.N., "The blood-brain barrier and cerebral microcirculation in Alzheimer disease", *Cerebrovasc Brain Metab Rev.*, Vol. 4, no. 3, 1992, pp. 226-60
- Kalehua A.N., Nagel J.E., Whelchel L.M., Gides J.J., Pyle R.S., Smith R.J., Kusiak J.W., Taub D.D., "Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 are involved in both excitotoxin-induced neurodegeneration and regeneration", *Exp Cell Res.*, Vol. 297, no. 1, 2004, pp. 197-211
- Kamboh M.I., "Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease", *Ann Hum Genet.*, Vol. 68, no. Pt 4, 2004, pp. 381-404
- Khachaturian Z.S., "Plundered memories", *The Sciences.*, Vol. 37, no. 4, 1997, pp. 20-25
- Kim T.W., Pettingell W.H., Hallmark O.G., Moir R.D., Wasco W., Tanzi R.E., "Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells" *J Biol Chem.*, Vol. 272, no. 17, 1997, pp. 11006-10
- Kimonis V.E., Fulchiero E., Vesa J., Watts G., "VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder", *Biochim Biophys Acta.*, Vol. 1782, no. 12, 2008, pp. 744-8
- Knopman D.S., Boeve B.F., Parisi J.E., Dickson D.W., Smith G.E., Ivnik R.J., Josephs K.A., Petersen R.C., "Antemortem diagnosis of frontotemporal lobar degeneration", *Ann Neurol.*, Vol. 57, no. 4, 2005, pp. 480-8
- Kohnken R., Buerger K., Zinkowski R., Miller C., Kerkman D., DeBernardis J., Shen J., Möller H.J., Davies P., Hampel H., "Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients", *Neurosci Lett.*, Vol. 287, no. 3, 2000, pp. 187-90
- Kopan R., Schroeter E.H., Weintraub H., Nye J.S., "Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 93, no. 4, 1996, pp. 1683-8

- 
- Komori T., "Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease", *Brain Pathol.*, Vol. 9, no. 4, 1999, pp. 663-79
  - Koo E.H., Squazzo S.L., "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway", *J Biol Chem.*, Vol. 269, no. 26, 1994, pp. 17386-9
  - Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J., "Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 83, no. 11, 1986, pp. 4044-8
  - Kowaltowski A.J., Vercesi A.E., "Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress", *Free Radic Biol Med.*, Vol. 26, no. 3-4, 1999, pp. 463-71
  - Kuhl D.E., Metter E.J., Riege W.H., Hawkins R.A., "Determinations of cerebral glucose utilization in dementia using positron emission tomography", *Dan Med Bull.*, Vol. 32 Suppl 1, 1985, pp. 51-5
  - Kuo Y.M., Liao P.C., Lin C., Wu C.W., Huang H.M., Lin C.C., Chuo L.J., "Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia", *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, Vol. 17, no. 2, 2003, pp. 94-7
  - Lah J.J., Heilman C.J., Nash N.R., Rees H.D., Yi H., Counts S.E., Levey A.I., "Light and electron microscopic localization of presenilin-1 in primate brain", *J Neurosci.*, Vol. 17, no. 6, 1997, pp. 1971-80
  - Lannfelt L., Basun H., Wahlund L.O., Rowe B.A., Wagner S.L., "Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease", *Nat Med.*, Vol. 1, no. 8, 1995, pp. 829-32
  - Lau P, de Strooper B. *Dysregulated microRNAs in neurodegenerative disorders*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (2010) :768-773.
  - Lemere C.A., Lopera F., Kosik K.S., Lendon C.L., Ossa J., Saido T.C., Yamaguchi H., Ruiz A., Martinez A., Madrigal L., Hincapie L., Arango J.C., Anthony D.C., Koo E.H., Goate A.M., Selkoe D.J., Arango J.C., "The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology", *Nat Med.*, Vol. 2, no. 10, 1996, pp. 1146-50
  - Lemere C.A., Blusztajn J.K., Yamaguchi H., Wisniewski T., Saido T.C., Selkoe D.J., "Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation", *Neurobiol Dis.*, Vol. 3, no. 1, 1996, pp. 16-32
  - Lendon C.L., Lynch T., Norton J., McKeel D.W. Jr, Busfield F., Craddock N., Chakraverty S., Gopalakrishnan G., Shears S.D., Grimmett W., Wilhelmsen K.C., Hansen L., Morris J.C., Goate A.M., "Hereditary dysphasic disinhibition dementia: a frontotemporal dementia linked to 17q21-22", *Neurology.*, Vol. 50, no. 6, 1998, pp. 1546-55
  - Le Ber I., Camuzat A., Berger E., Hannequin D., Laquerrière A., Golfier V., Seilhean D., Viennet G., Couratier P., Verpillat P., Heath S., Camu W., Martinaud O., Lacomblez L., Vercelletto M., Salachas F., Sellal F., Didic M., Thomas-Anterion C., Puel M., Michel B.F., Besse C., Duyckaerts C., Meininger V., Campion D., Dubois B., Brice A., French Research Network on FTD/FTD-MND, "Chromosome 9p-linked families with frontotemporal dementia associated with motor neuron disease", *Neurology.*, Vol. 72, no. 19, 2009, pp. 1669-76
-

- 
- Lee S.C., Dickson D.W., Liu W., Brosnan C.F., "Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma", *J Neuroimmunol.*, Vol. 46, no. 1-2, 1993, pp. 19-24
  - Lee Y.B., Nagai A., Kim S.U., "Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia", *J Neurosci Res.*, Vol. 69, no. 1, 2002, pp. 94-103
  - Lesné S., Koh M.T., Kotilinek L., Kaye R., Glabe C.G., Yang A., Gallagher M., Ashe K.H. "A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory", *Nature.*, Vol. 440, no. 7082, 2006, pp. 352-7
  - Lesné S., Kotilinek L., "Amyloid plaques and amyloid-beta oligomers: an ongoing debate", *J Neurosci.*, Vol. 25, no. 41, 2005, pp. 9319-20
  - Levecque C., Elbaz A., Clavel J., Richard F., Vidal J.S., Amouyel P., Tzourio C., Alperovitch A., Chartier-Harlin M.C., "Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study", *Hum Mol Genet.*, Vol. 12, no. 1, 2003, pp. 79-86
  - Levitan D., Doyle T.G., Brousseau D., Lee M.K., Thinakaran G., Slunt H.H., Sisodia S.S., Greenwald I., "Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 93, no. 25, 1996, pp. 14940-4
  - Levitan D., Yu G., St George Hyslop P., Goutte C., "APH-2/nicastrin functions in LIN-12/Notch signaling in the *Caenorhabditis elegans* somatic gonad", *Dev Biol.*, Vol. 240, no. 2, 2001, pp. 654-61
  - Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., et al., "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus", *Science.*, Vol. 269, no. 5226, 1995, pp. 973-7
  - Li Y.M., Xu M., Lai M.T., Huang Q., Castro J.L., DiMuzio-Mower J., Harrison T., Lellis C., Nadin A., Neduveilil J.G., Register R.B., Sardana M.K., Shearman M.S., Smith A.L., Shi X.P., Yin K.C., Shafer J.A., Gardell S.J., "Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1", *Nature.*, Vol. 405, no. 6787, 2000, pp. 689-94
  - Li T., Ma G., Cai H., Price D.L., Wong P.C., "Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals", *J Neurosci.*, Vol. 23, no. 8, 2003, pp. 3272-7
  - Li H., Wetten S., Li L., St Jean P.L., Upmanyu R., Surh L., Hosford D., Barnes M.R., Briley J.D., Borrie M., Coletta N., Delisle R., Dhalla D., Ehm M.G., Feldman H.H., Fornazzari L., Gauthier S., Goodgame N., Guzman D., Hammond S., Hollingworth P., Hsiung G.Y., Johnson J., Kelly D.D., Keren R., Kertesz A., King K.S., Lovestone S., Loy-English I., Matthews P.M., Owen M.J., Plumpton M., Pryse-Phillips W., Prinjha R.K., Richardson J.C., Saunders A., Slater A.J., St George-Hyslop P.H., Stinnett S.W., Swartz J.E., Taylor R.L., Wherrett J., Williams J., Yarnall D.P., Gibson R.A., Irizarry M.C., Middleton L.T., Roses A.D., "Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease", *Arch Neurol.*, Vol. 65, no. 1, 2008, pp. 45-53
  - Liman J, Faida L, Dohm CP, Reed JC, Bahr M, Kermer P. (2008) Subcellular distribution affects BAG1 function. *Brain Res* 1198C, 21–26.
-

- Liu H., Chao D., Nakayama E.E., Taguchi H., Goto M., Xin X., Takamatsu J.K., Saito H., Ishikawa Y., Akaza T., Juji T., Takebe Y., Ohishi T., Fukutake K., Maruyama Y., Yashiki S., Sonoda S., Nakamura T., Nagai Y., Iwamoto A., Shioda T., "Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 96, no. 8, 1999, pp. 4581-5
- López-Schier H., St Johnston D., "Drosophila nicastrin is essential for the intramembranous cleavage of notch", *Dev Cell.*, Vol. 2, no. 1, 2002, pp. 79-89
- Lüth H.J., Holzer M., Gärtner U., Staufienbiel M., Arendt T., "Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology", *Brain Res.*, Vol. 913, no. 1, 2001, pp. 57-67
- Lüth H.J., Münch G., Arendt T., "Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation", *Brain Res.*, Vol. 953, no. 1-2, 2002, pp. 135-43
- Ma G., Li T., Price D.L., Wong P.C., "APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in gamma-secretase complexes during embryonic development", *J Neurosci.*, Vol. 25, no. 1, 2005, pp. 192-8
- Mackenzie I.R., Baker M., Pickering-Brown S., Hsiung G.Y., Lindholm C., Dwosh E., Gass J., Cannon A., Rademakers R., Hutton M., Feldman H.H., "The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene", *Brain.*, Vol. 129, no. Pt 11, 2006, pp. 3081-90
- Mackenzie I.R., Rademakers R., "The molecular genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: recent developments", *Neurogenetics.*, Vol. 8, no. 4, 2007, pp. 237-248
- Malinski T., "Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease", *J Alzheimers Dis.*, Vol. 11, no. 2, 2007, pp. 207-18
- Mann D.M., Iwatsubo T., Fukumoto H., Ihara Y., Odaka A., Suzuki N., "Microglial cells and amyloid beta protein (A beta) deposition; association with A beta 40-containing plaques", *Acta Neuropathol.*, Vol. 90, no. 5, 1995, pp. 472-7
- Mann D.M., Iwatsubo T., Cairns N.J., Lantos P.L., Nochlin D., Sumi S.M., Bird T.D., Poorkaj P., Hardy J., Hutton M., Prihar G., Crook R., Rossor M.N., Haltia M., "Amyloid beta protein (Abeta) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease: predominance of Abeta42(43)", *Ann Neurol.*, Vol. 40, no. 2, 1996, pp. 149-56
- Marcon G., Di Fede G., Giaccone G., Rossi G., Giovagnoli A.R., Maccagnano E., Tagliavini F., "A novel Italian presenilin 2 gene mutation with prevalent behavioral phenotype", *J Alzheimers Dis.*, Vol. 16, no. 3, 2009, pp. 509-11
- Mark R.J., Pang Z., Geddes J.W., Uchida K., Mattson M.P., "Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation", *J Neurosci.*, Vol. 17, no. 3, 1997, pp. 1046-54
- Markesbery W.R., "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease", *Free Radic Biol Med.*, Vol. 23, no. 1, 1997, pp. 134-47

- Marsden P.A., Heng H.H., Scherer S.W., Stewart R.J., Hall A.V., Shi X.M., Tsui L.C., Schappert K.T., "Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene", *J Biol Chem.*, Vol. 268, no. 23, 1993, pp. 17478-88
- Martins R.N., Harper C.G., Stokes G.B., Masters C.L., "Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress", *J Neurochem.*, Vol. 46, no. 4, 1986, pp. 1042-5
- Mattson M.P., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I., Rydel R.E., "Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity", *J Neurosci.*, Vol. 12, no. 2, 1992, pp. 376-89
- Mattson M.P., Cheng B., Culwell A.R., Esch F.S., Lieberburg I., Rydel R.E., "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein", *Neuron.*, Vol. 10, no. 2, 1993, pp. 243-54
- Mattson M.P., Lovell M.A., Furukawa K., Markesbery W.R., "Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons", *J Neurochem.*, Vol. 65, no. 4, 1995, pp. 1740-51
- McGeer P.L., Schulzer M., McGeer E.G., "Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies", *Neurology.*, Vol. 47, no. 2, 1996, pp. 425-32
- McGeer P.L., McGeer E.G., "Autotoxicity and Alzheimer disease", *Arch Neurol.*, Vol. 57, no. 6, 2000, pp. 789-90
- McGeer P.L., McGeer E.G., "Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease", *Neurobiol Aging.*, Vol. 22, no. 6, 2001, pp. 799-809
- McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M., "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.*, Vol. 34, no. 7, 1984, pp. 939-44
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ; Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease (2001) Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 58,1803-1809.
- McShea A., Wahl AF., Smith MA. Re-entry into the cell cycle: a mechanism for neurodegeneration in Alzheimer disease. *Med Hypothesis* 1999; 52:525-7
- Miyata M., Smith J.D., "Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides", *Nat Genet.*, Vol. 14, no. 1, 1996, pp. 55-61
- Momeni P., Schymick J., Jain S., Cookson M.R., Cairns N.J., Greggio E., Greenway M.J., Berger S., Pickering-Brown S., Chiò A., Fung H.C., Holtzman D.M., Huey E.D., Wassermann E.M., Adamson J., Hutton M.L., Rogaeva E., St George-Hyslop P., Rothstein J.D., Hardiman O., Grafman J., Singleton A., Hardy J., Traynor B.J., "Analysis of IFT74 as a candidate gene for chromosome 9p-linked ALS-FTD", *BCM Neurol.*, Vol. 6, 2006, p. 44



- 
- Monastero R., Cefalù A.B., Camarda C., Buglino C.M., Mannino M., Barbagallo C.M., Lopez G., Camarda L.K., Travali S., Camarda R., Averna M.R., "No association between Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism and Italian sporadic Alzheimer's disease", *Neurosci Lett.*, Vol. 841, no. 3, 2003, pp. 229-32
  - Montine T.J., Huang D.Y., Valentine W.M., Amarnath V., Saunders A., Weisgraber K.H., Graham D.G., Strittmatter W.J., "Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 55, no. 2, 1996, pp. 202-10
  - Morikawa Y., Arai H., Matsushita S., Kato M., Higuchi S., Miura M., Kawakami H., Higuchi M., Okamura N., Tashiro M., Matsui T., Sasaki H., "Cerebrospinal fluid tau protein levels in demented and non-demented alcoholics", *Alcohol Clin Exp Res.*, Vol. 23, no. 4, 1999, pp. 575-7
  - Morita M., Al-Chalabi A., Andersen P.M., Hosler B., Sapp P., Englund E., Mitchell J.E., Habgood J.J., de Belleruche J., Xi J., Jongjaroenprasert W., Horvitz H.R., Gunnarsson L.G., Brown R.H. Jr, "A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia", *Neurology.*, Vol. 66, no. 6, 2006, pp. 839-44
  - Morris J.C., Storandt M., Miller J.P., McKeel D.W., Price J.L., Rubin E.H., Berg L., "Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease", *Arch Neurol.*, Vol. 58, no. 3, 2001, pp. 397-405
  - Motter R., Vigo-Pelfrey C., Kholodenko D., Barbour R., Johnson-Wood K., Galasko D., Chang L., Miller B., Clark C., Green R., et al., "Reduction of beta-amyloid peptide<sub>42</sub> in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease", *Ann Neurol.*, Vol. 38, no. 4, 1995, pp. 643-8
  - Murphy T.H., Blatter L.A., Wier W.G., Baraban J.M., "Rapid communication between neurons and astrocytes in primary cortical cultures", *J Neurosci.*, Vol. 13, no. 6, 1993, pp. 2672-9
  - Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD (1997) Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl)* 94:6-15; Vincent I, Rosado M, Davies P (1996) Mitotic mechanism in Alzheimer's disease? *J Cell Biol* 132:413-425
  - Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M., Shimasaki Y., Ogawa H., Kugiyama K., Mizuno Y., Harada E., Nakamura S., Ito T., Saito Y., Miyamoto Y., Ogawa Y., Nakao K., "T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis", *Am J Cardiol.*, Vol. 86, no. 6, 2000, pp. 628-34
  - Namba Y., Tomonaga M., Kawasaki H., Otomo E., Ikeda K., "Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease", *Brain Res.*, Vol. 541, no. 1, 1991, pp. 163-6
  - Naruse S., Thinakaran G., Luo J.J., Kusiak J.W., Tomita T., Iwatsubo T., Qian X., Ginty D.D., Price D.L., Borchelt D.R., Wong P.C., Sisodia S.S., "Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons", *Neuron.*, Vol. 21, no. 5, 1998, pp. 1213-21
  - Neary D., Snowden J.S., Gustafson L., Passant U., Stuss D., Black S., Freedman M., Kertesz A., Robert P.H., Albert M., Boone K., Miller B.L., Cummings J., Benson D.F., "Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria", *Neurology.*, Vol. 51, no. 6, 1998, pp. 1546-54
-

- Nicoll J.A., Mrak R.E., Graham D.I., Stewart J., Wilcock G., MacGowan S., Esiri M.M., Murray L.S., Dewar D., Love S., Moss T., Griffin W.S., "Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease", *Ann Neurol.*, Vol. 47, no. 3, 2000, pp. 365-8
- Nukina N., Ihara Y., "One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein", *J Biochem.*, Vol. 99, no. 5, 1986, pp. 1541-4
- Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K., Jones P.K., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwood C.S., Petersen R.B., Smith M.A., "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 60, no. 8, 2001, pp. 759-67
- Oddo S., Caccamo A., Tran L., Lambert M.P., Glabe C.G., Klein W.L., LaFerla F.M., "Temporal profile of amyloid-beta (A $\beta$ ) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between A $\beta$  and tau pathology", *J Biol Chem.*, Vol. 281, no. 3, 2006, pp. 1599-604
- Oltersdorf T., Ward P.J., Henriksson T., Beattie E.C., Neve R., Lieberburg I., Fritz L.C., "The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway", *J Biol Chem.*, Vol. 265, no. 8, 1990, pp. 4492-7
- Pahan K., Namboodiri A.M., Sheikh F.G., Smith B.T., Singh I., "Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes", *J Biol Chem.*, Vol. 272, no. 12, 1997, pp. 7786-91
- Paradowski B., Celczyńska D., Dobosz T., Noga L., "Polymorphism 174 G/C of interleukin 6 gene in Alzheimer's disease--preliminary report", *Neurol Neurochir Pol.*, Vol. 42, no. 4, 2008, pp. 312-5
- Parnetti L., Lanari A., Amici S., Gallai V., Vanmechelen E., Hulstaert F., Phospho-Tau International Study Group, "CSF phosphorylated tau is a possible marker for discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies. Phospho-Tau International Study Group", *Neurosci Lett.*, Vol. 22, no. 1, 2001, pp. 77-8
- Perez R.G., Soriano S., Hayes J.D., Ostaszewski B., Xia W., Selkoe D.J., Chen X., Stokin G.B., Koo E.H., "Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including A $\beta$ 42", *J Biol Chem.*, Vol. 274, no. 27, 1999, pp. 18851-6
- Perry R.T., Collins J.S., Wiener H., Acton R., Go R.C., "The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.*, Vol. 22, no. 6, 2001, pp. 873-83
- Pickering-Brown S.M., Rollinson S., Du Plessis D., Morrison K.E., Varma A., Richardson A.M., Neary D., Snowden J.S., Mann D.M., "Frequency and clinical characteristics of progranulin mutation carriers in the Manchester frontotemporal lobar degeneration cohort: comparison with patients with MAPT and no known mutations", *Brain.*, Vol. 131, no. Pt 3, 2008, pp. 721-31
- Podlisny M.B., Citron M., Amarante P., Sherrington R., Xia W., Zhang J., Diehl T., Levesque G., Fraser P., Haass C., Koo E.H., Seubert P., St George-Hyslop P., Teplow D.B., Selkoe D.J., "Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue", *Neurobiol Dis.*, Vol. 3, no. 4, 1997, pp. 325-37

- Polvikoski T., Sulkava R., Haltia M., Kainulainen K., Vuorio A., Verkkoniemi A., Niinistö L., Halonen P., Kontula K., "Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein", *N Engl J Med.*, Vol. 333, no. 19, 1995, pp. 1242-7
- Poduslo J.F., Curran G.L., Sanyal B., Selkoe D.J., "Receptor-mediated transport of human amyloid beta-protein 1-40 and 1-42 at the blood-brain barrier", *Neurobiol Dis.*, Vol. 6, no. 3, 1999, pp. 190-9
- Possel H., Noack H., Putzke J., Wolf G., Sies H., "Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies", *Glia.*, Vol. 32, no. 1, 2000, pp. 51-9
- Postina R., Schroeder A., Dewachter I., Bohl J., Schmitt U., Kojro E., Prinzen C., Endres K., Hiemke C., Blessing M., Flamez P., Dequenne A., Godaux E., van Leuven F., Fahrenholz F., "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model", *J Clin Invest.*, Vol. 113, no. 10, 2004, pp. 1456-64
- Probst A., Anderton B.H., Brion J.P., Ulrich J., "Senile plaque neurites fail to demonstrate anti-paired helical filament and anti-microtubule-associated protein-tau immunoreactive proteins in the absence of neurofibrillary tangles in the neocortex", *Acta Neuropathol.*, Vol. 77, no. 4, 1989, pp. 430-6
- Rademakers R., Cruts M., Dermaut B., Sleegers K., Rosso S.M., Van den Broeck M., Backhovens H., van Swieten J., van Duijn C.M., Van Broeckhoven C., "Tau negative frontal lobe dementia at 17q21: significant finemapping of the candidate region to a 4.8 cM interval", *Mol Psychiatry.*, Vol. 7, no. 10, 2002, pp. 1064-74
- Ramos E.M., Lin M.T., Larson E.B., Maezawa I., Tseng L.H., Edwards K.L., Schellenberg G.D., Hansen J.A., Kukull W.A., Jin L.W., "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter region polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer disease", *Arch Neurol.*, Vol. 63, no. 8, 2006, pp. 1165-9
- Raux G., Gantier R., Thomas-Anterion C., Boulliat J., Verpillat P., Hannequin D., Brice A., Frebourg T., Campion D., "Dementia with prominent frontotemporal features associated with L113P presenilin 1 mutation", *Neurology.*, Vol. 55, no. 10, 2000, pp. 1577-8
- Ravaglia G., Paola F., Maioli F., Martelli M., Montesi F., Bastagli L., Bianchin M., Chiappelli M., Tumini E., Bolondi L., Licastro F., "Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for AD: a prospective study", *Exp Gerontol.*, Vol. 41, no. 1, 2006, pp. 85-92
- Ray W.J., Yao M., Mumm J., Schroeter E.H., Saftig P., Wolfe M., Selkoe D.J., Kopan R., Goate A.M., "Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch", *J Biol Chem.*, Vol. 274, no. 51, 1999, pp. 36801-7
- Rebeck G.W., Reiter J.S., Strickland D.K., Hyman B.T., "Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions", *Neuron.*, Vol. 11, no. 4, 1993, pp. 575-80
- Riemenschneider M., Diehl J., Müller U., Förstl H., Kurz A., "Apolipoprotein E polymorphism in German patients with frontotemporal degeneration", *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, Vol. 72, no. 5, 2002, pp. 639-41

- 
- Rizzu P., van Mil S.E., Anar B., Rosso S.M., Kaat L.D., Heutink P., van Swieten J.C., "CHMP2B mutations are not a cause of dementia in Dutch patients with familial and sporadic frontotemporal dementia", *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*, Vol. 141B, no. 8, 2006, pp. 944-6
  - Rocca W.A., Amaducci L.A., Schoenberg B.S., "Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease", *Ann Neurol.*, Vol. 19, no. 5, 1986, pp. 415-24
  - S. Rollinson, P. Rizzu, S. Sikkink, M. Baker, N. Halliwell, J. Snowden, B.J. Traynor, D. Ruano, N. Cairns, J.D. Rohrer, S. Mead, J. Collinge, M. Rossor, E. Akay, R. Guerreiro, R. Rademakers, K.E. Morrison, P. Pastor, E. Alonso, P. Martinez-Lage, N. Graff-Radford, D. Neary, P. Heutink, D.M. Mann, J. Van Swieten, S.M. Pickering-Brown. "Ubiquitin associated protein 1 is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration". *Neurobiol. Aging* 30 (2009) 656-665.)
  - The Ronald and Nancy Regan Research Institute of the Alzheimer's Association, "The National Institute on Aging Working Group: Consensus report of the Working Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease", *Neurobiol Aging.*, Vol. 19, 1998, pp. 109-16
  - Rothwell N.J., Hopkins S.J., "Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action", *Trends Neurosci.*, Vol. 18, no. 3, 1995, pp. 130-6
  - Saitoh T., Sundsmo M., Roch J.M., Kimura N., Cole G., Schubert D., Oltersdorf T., Schenk D.B., "Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts", *Cell.*, Vol. 58, no. 4, 1989, pp. 615-22
  - Sambamurti K., Shioi J., Anderson J.P., Pappolla M.A., Robakis N.K., "Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells", *J Neurosci Res.*, Vol. 33, no. 2, 1992, pp. 319-29
  - Saunders A.M., Schmeider K., Breitner J.C., Benson M.D., Brown W.T., Goldfarb L., Goldgaber D., Manwaring M.G., Szymanski M.H., McCown N., et al., "Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases", *Lancet.*, Vol. 342, no. 8873, 1993, pp. 710-1
  - Saur D., Seidler B., Paehge H., Schusdziarra V., Allescher H.D., "Complex regulation of human neuronal nitric-oxide synthase exon 1c gene transcription. Essential role of Sp and ZNF family members of transcription factors", *J Biol Chem.*, Vol. 277, no. 28, 2002, pp. 25798-814
  - Sayre L.M., Zelasko D.A., Harris P.L., Perry G., Salomon R.G., Smith M.A., "4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease", *J Neurochem.*, Vol. 68, no. 5, 1997, pp. 2092-7
  - Schellenberg G.D., Bird T.D., Wijsman E.M., Orr H.T., Anderson L., Nemens E., White J.A., Bonycastle L., Weber J.L., Alonso M.E., et al., "Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14", *Science.*, Vol. 258, no. 5082, 1992, pp. 668-71
  - Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., et al., "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease", *Nature.*, Vol. 375, no. 6534, 1995, pp. 754-60
  - Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T.D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R.,
-

- Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S., "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease", *Nat Med.*, Vol. 2, no. 8, 1996, pp. 864-70
- Schmechel D.E., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Crain B.J., Hulette C.M., Joo S.H., Pericak-Vance M.A., Goldgaber D., Roses A.D., "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.*, Vol. 90, no. 20, 1993, pp. 9649-53
  - Schreck R., Rieber P., Baeuerle P.A., "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1", *EMBO J.*, Vol. 10, no. 8, 1991, pp. 2247-58
  - Schubert D., Jin L.W., Saitoh T., Cole G., "The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion", *Neuron.*, Vol. 3, no. 6, 1989, pp. 689-94
  - Schwarzman A.L., Singh N., Tsiper M., Gregori L., Dranovsky A., Vitek M.P., Glabe C.G., St George-Hyslop P.H., Goldgaber D., "Endogenous presenilin 1 redistributes to the surface of lamellipodia upon adhesion of Jurkat cells to a collagen matrix", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 96, no. 14, 1999, pp. 7932-7
  - Selkoe D.J., "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy", *Physiol Rev.*, Vol. 81, no. 2, 2001, pp. 741-66
  - Sennvik K., Fastbom J., Blomberg M., Wahlund L.O., Winblad B., Benedikz E., "Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients", *Neurosci Lett.*, Vol. 278, no. 3, 2000, pp. 169-72
  - L.R. Serbus, B.J. Cha, W.E. Theurkauf, W.M. Saxton. Dynein and the actin cytoskeleton control kinesin-driven cytoplasmic streaming in *Drosophila* oocytes. *Development* 132 (2005) 3743-3752
  - Serretti A., Olgiati P., Politis A., Malitas P., Albani D., Dusi S., Polito L., De Mauro S., Zisaki A., Piperi C., Liappas I., Stamouli E., Mailis A., Atti A.R., Morri M., Ujkaj M., Batelli S., Forloni G., Soldatos C.R., Papadimitriou G.N., De Ronchi D., Kalofoutis A., "Lack of association between interleukin-1 alpha rs1800587 polymorphism and Alzheimer's disease in two Independent European samples", *J Alzheimers Dis.*, Vol. 16, no. 1, 2009, pp. 181-7
  - Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D., Sinha S., Schlossmacher M., Whaley J., Swindlehurst C., et al., "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids", *Nature.*, Vol. 359, no. 6393, 1992, pp. 325-7
  - Seubert P., Oltersdorf T., Lee M.G., Barbour R., Blomquist C., Davis D.L., Bryant K., Fritz L.C., Galasko D., Thal L.J., et al., "Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide", *Nature.*, Vol. 361, no. 6409, 1993, pp. 260-3
  - Sheng J.G., Mrak R.E., Griffin W.S., "Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1alpha+ microglia and S100beta+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 56, no. 3, 1997, pp. 285-90
  - Sherr C.J.. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79:551-5.

- 
- Shinkai T., Ohmori O., Hori H., Nakamura J., "Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia", *Mol Psychiatry*, Vol. 7, no. 6, 2002, pp. 560-3
  - Short R.A., Graff-Radford N.R., Adamson J., Baker M., Hutton M., "Differences in tau and apolipoprotein E polymorphism frequencies in sporadic frontotemporal lobar degeneration syndromes", *Arch Neurol*, Vol. 59, no. 4, 2002, pp. 611-5
  - Simpson I.A., Chundu K.R., Davies-Hill T., Honer W.G., Davies P., "Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease", *Ann Neurol*, Vol. 35, no. 5, 1994, pp. 546-51
  - Sinha S., Dovey H.F., Seubert P., Ward P.J., Blacher R.W., Blaber M., Bradshaw R.A., Arici M., Mobley W.C., Lieberburg I., "The protease inhibitory properties of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein", *J Biol Chem*, Vol. 265, no. 16, 1990, pp. 8983-5
  - Sisodia S.S., Koo E.H., Beyreuther K., Unterbeck A., Price D.L., "Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing", *Science*, Vol. 248, no. 4954, 1990, pp. 492-5
  - Sisodia S.S., "Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 89, no. 13, 1992, pp. 6075-9
  - Sjögren M., Minthon L., Davidsson P., Granérus A.K., Clarberg A., Vanderstichele H., Vanmechelen E., Wallin A., Blennow K., "CSF levels of tau, beta-amyloid(1-42) and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging", *J Neural Transm*, Vol. 107, no. 5, 2000, pp. 563-79
  - Sjögren M., Davidsson P., Wallin A., Granérus A.K., Grundström E., Askmark H., Vanmechelen E., Blennow K., "Decreased CSF-beta-amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mistreatment of beta-amyloid induced by disparate mechanisms", *Dement Geriatr Cogn Disord*, Vol. 13, no. 2, 2002, pp. 112-8
  - Sjögren M., Folkesson S., Blennow K., Tarkowski E., "Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications", *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Vol. 75, no. 8, 2004, pp. 1107-11
  - Skibinski G., Parkinson N.J., Brown J.M., Chakrabarti L., Lloyd S.L., Hummerich H., Nielsen J.E., Hodges J.R., Spillantini M.G., Thusgaard T., Brandner S., Brun A., Rossor M.N., Gade A., Johannsen P., Sørensen S.A., Gydesen S., Fisher E.M., Collinge J., "Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia", *Nat Genet*, Vol. 37, no. 8, 2005, pp. 806-8
  - Smith R.P., Higuchi D.A., Broze G.J. Jr, "Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein", *Science*, Vol. 248, no. 4959, 1990, pp. 1126-8
  - Smith C., Mitchinson M.J., Aruoma O.I., Halliwell B., "Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions", *Biochem J*, Vol. 286, no. Pt. 3, 1992, pp. 901-5
  - Smith M.A., Kutty R.K., Richey P.L., Yan S.D., Stern D., Chader G.J., Wiggert B., Petersen R.B., Perry G., "Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease", *Am J Pathol*, Vol. 145, no. 1, 1994, pp. 42-7
-

- Smith M.A., Perry G., "The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 56, no. 2, 1997, pp. 217
- Smith M.A., Casadesus G., Joseph J.A., Perry G., "Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain", *Free Radic Biol Med.*, Vol. 33, no. 9, 2002, pp. 1194-9
- Snell J.C., Chernyshev O., Gilbert D.L., Colton C.A., "Polyribonucleotides induce nitric oxide production by human monocyte-derived macrophages", *J Leukoc Biol.*, Vol. 62, no. 3, 1997, pp. 369-73
- Snow A.D., Kinsella M.G., Parks E., Sekiguchi R.T., Miller J.D., Kimata K., Wight T.N., "Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease", *Arch Biochem Biophys.*, Vol. 320, no. 1, 1995, pp. 84-95
- Snowden J.S., Neary D., Mann D.M., "Frontotemporal dementia", *Br J Psychiatry.*, Vol. 180, 2002, pp. 140-3
- Snowden J.S., Pickering-Brown S.M., Mackenzie I.R., Richardson A.M., Varma A., Neary D., Mann D.M., "Progranulin gene mutations associated with frontotemporal dementia and progressive non-fluent aphasia", *Brain.*, Vol. 129, no. Pt 11, 2006, pp. 3091-102
- Solà C., Casal C., Tusell J.M., Serratos J., "Astrocytes enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by microglial cells", *Eur J Neurosci.*, Vol. 16, no. 7, 2002, pp. 1275-83
- Song W., Nadeau P., Yuan M., Yang X., Shen J., Yankner B.A., "Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 96, no. 12, 1999, pp. 6959-63
- Spillantini M.G., Bird T.D., Ghetti B., "Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies", *Brain Pathol.*, Vol. 8, no. 2, 1998, pp. 387-402
- Srinivasan R., Davidson Y., Gibbons L., Payton A., Richardson A.M., Varma A., Julien C., Stopford C., Thompson J., Horan M.A., Pendleton N., Pickering-Brown S.M., Neary D., Snowden J.S., Mann D.M., "The apolipoprotein E epsilon4 allele selectively increases the risk of frontotemporal lobar degeneration in males", *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, Vol. 77, no. 2, 2006, pp. 154-8
- Steiner H., Capell A., Pesold B., Citron M., Kloetzel P.M., Selkoe D.J., Romig H., Mendla K., Haass C., "Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation", *J Biol Chem.*, Vol. 273, no. 48, 1998, pp. 32322-31
- Steiner H., Winkler E., Edbauer D., Prokop S., Basset G., Yamasaki A., Kostka M., Haass C., "PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin", *J Biol Chem.*, Vol. 277, no. 42, 2002, pp. 39062-5
- Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S., Roses A.D., "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 U S A.*, Vol. 90, no. 17, 1993, pp. 1977-81
- Struhl G., Greenwald I., "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*", *Nature.*, Vol. 398, no. 6727, 1999, pp. 522-5
- Suzuki N., Iwatsubo T., Odaka A., Ishibashi Y., Kitada C., Ihara Y., "High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy", *Am J Pathol.*, Vol. 145, no. 2, 1994, pp. 452-60

- Tabaton M., Perry G., Smith M., Vitek M., Angelini G., Dapino D., Garibaldi S., Zaccheo D., Odetti P., "Is amyloid beta-protein glycosylated in Alzheimer's disease?", *Neuroreport.*, Vol. 8, no. 4, 1997, pp. 907-9
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC (1995) Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80(2), 279-284.
- Tang-Wai D., Lewis P., Boeve B., Hutton M., Golde T., Baker M., Hardy J., Michels V., Ivnik R., Jack C., Petersen R., "Familial frontotemporal dementia associated with a novel presenilin-1 mutation", *Dement Geriatr Cogn Disord.*, Vol. 14, no. 1, 2002, pp. 13-21
- Tanzi R.E., McClatchey A.I., Lamperti E.D., Villa-Komaroff L., Gusella J.F., Neve R.L., "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease", *Nature.*, Vol. 331, no. 6156, 1988, pp. 528-30
- Tarkowski E., Blennow K., Wallin A., Tarkowski A., "Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia", *J Clin Immunol.*, Vol. 19, no. 4, 1999, pp. 223-30
- Tedde A., Nacmias B., Cellini E., Bagnoli S., Sorbi S., "Lack of association between NOS3 polymorphism and Italian sporadic and familial Alzheimer's disease", *J Neurol.*, Vol. 249, no. 1, 2002, pp. 110-1
- Tedde A., Putignano A.L., Nacmias B., Bagnoli S., Cellini E., Sorbi S., "Lack of association between TNF-alpha polymorphisms and Alzheimer's disease in an Italian cohort", *Neurosci Lett.*, Vol. 446, no. 2-3, 2008, pp. 139-42
- Teller J.K., Russo C., DeBusk L.M., Angelini G., Zaccheo D., Dagna-Bricarelli F., Scartezzini P., Bertolini S., Mann D.M., Tabaton M., Gambetti P., "Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome", *Nat Med.*, Vol. 2, no. 1, 1996, pp. 93-5
- Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, Vol. 57, no. 4, 1994, pp. 416-8
- Thinakaran G., Harris C.L., Ratovitski T., Davenport F., Slunt H.H., Price D.L., Borchelt D.R., Sisodia S.S., "Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors", *J Biol Chem.*, Vol. 272, no. 45, 1997, pp. 28415-22
- Thinakaran G., Regard J.B., Bouton C.M., Harris C.L., Price D.L., Borchelt D.R., Sisodia S.S., "Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP", *Neurobiol Dis.*, Vol. 4, no. 6, 1998, pp. 438-53
- Thomas T., Thomas G., McLendon C., Sutton T., Mullan M., "Beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage", *Nature.*, Vol. 380, no. 6570, 1996, pp. 168-71
- Tomita T., Maruyama K., Saido T.C., Kume H., Shinozaki K., Tokuhiro S., Capell A., Walter J., Grünberg J., Haass C., Iwatsubo T., Obata K., "The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 94, no. 5, 1997, pp. 2025-30
- Tomlinson B.E., Blessed G., Roth M., "Observations on the brains of demented old people", *J Neurol Sci.*, Vol. 11, no. 3, 1970, pp. 205-42



- Townsend M., Shankar G.M., Mehta T., Walsh D.M., Selkoe D.J., "Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers", *J Physiol.*, Vol. 572, no. Pt 2, 2006, pp. 477-92
- Urakami K., Mori M., Wada K., Kowa H., Takeshima T., Arai H., Sasaki H., Kanai M., Shoji M., Ikemoto K., Morimatsu M., Hikasa C., Nakashima K., "A comparison of tau protein in cerebrospinal fluid between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy", *Neurosci Lett.*, Vol. 259, no. 2, 1999, pp. 127-9
- Van der Zee J., Rademakers R., Engelborghs S., Gijssels I., Bogaerts V., Vandenberghe R., Santens P., Caekebeke J., De Pooter T., Peeters K., Lübke U., Van den Broeck M., Martin J.J., Cruts M., De Deyn P.P., Van Broeckhoven C., Dermaut B., "A Belgian ancestral haplotype harbours a highly prevalent mutation for 17q21-linked tau-negative FTL", *Brain.*, Vol. 129, no. Pt 4, 2006, pp. 841-52
- Vance C., Al-Chalabi A., Ruddy D., Smith B.N., Hu X., Sreedharan J., Siddique T., Schelhaas H.J., Kusters B., Troost D., Baas F., de Jong V., Shaw C.E., "Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3", *Brain.*, Vol. 129, no. Pt 4, 2006, pp. 868-76
- Vanmechelen E., Vanderstichele H., Davidsson P., Van Kerschaver E., Van Der Perre B., Sjögren M., Andreasen N., Blennow K., "Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization", *Neurosci Lett.*, Vol. 285, no. 1, 2000, pp. 49-52
- Vassar R., Citron M., "Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research", *Neuron.*, Vol. 27, no. 3, 2000, pp. 419-22
- Venturelli E., Galimberti D., Lovati C., Fenoglio C., Scalabrini D., Mariani C., Forloni G.L., Bresolin N., Scarpini E., "The T-786C NOS3 polymorphism in Alzheimer's disease: association and influence on gene expression", *Neurosci Lett.*, Vol. 382, no. 3, 2005, pp. 300-3
- Venturelli E., Galimberti D., Fenoglio C., Lovati C., Finazzi D., Guidi I., Corrà B., Scalabrini D., Clerici F., Mariani C., Forloni G., Bresolin N., Scarpini E., "Candidate gene analysis of IP-10 gene in patients with Alzheimer's disease", *Neurosci Lett.*, Vol. 404, no. 1-2, 2006, pp. 217-21
- Verbeek M.M., Eikelenboom P., de Waal R.M., "Differences between the pathogenesis of senile plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer disease", *J Neuropathol Exp Neurol.*, Vol. 56, no. 7, 1997, pp. 751-61
- Verbeek M.M., Van Nostrand W.E., Otte-Höller I., Wesseling P., De Waal R.M., "Amyloid-beta-induced degeneration of human brain pericytes is dependent on the apolipoprotein E genotype", *Ann N Y Acad Sci.*, Vol. 903, 2000, pp. 187-99
- Verpillat P., Camuzat A., Hannequin D., Thomas-Anterion C., Puel M., Belliard S., Dubois B., Didic M., Michel B.F., Lacomblez L., Moreaud O., Sellal F., Golfier V., Campion D., Clerget-Darpoux F., Brice A., "Association between the extended tau haplotype and frontotemporal dementia", *Arch Neurol.*, Vol. 59, no. 6, 2002, pp. 935-9

- 
- Vitek M.P., Snell J., Dawson H., Colton C.A., "Modulation of nitric oxide production in human macrophages by apolipoprotein-E and amyloid-beta peptide", *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 240, no. 2, 1997, pp. 391-4
  - Volicer L., Crino P.B., "Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: a hypothesis", *Neurobiol Aging.*, Vol. 11, no. 5, 1990, pp. 567-71
  - Walker D.G., Lue L.F., Beach T.G., "Increased expression of the urokinase plasminogen-activator receptor in amyloid beta peptide-treated human brain microglia and in AD brains", *Brain Res.*, Vol. 926, no. 1-2, 2002, pp. 69-79
  - Wallace J.L., Pittman Q.J., Cirino G., "Nitric oxide-releasing NSAIDs: a novel class of GI-sparing anti-inflammatory drugs", *Agents Actions Suppl.*, Vol. 46, 1995, pp. 121-9
  - Walker E.S., Martinez M., Wang J., Goate A., "Conserved residues in juxtamembrane region of the extracellular domain of nicastrin are essential for gamma-secretase complex formation", *J Neurochem.*, Vol. 98, no. 1, 2006, pp. 300-9
  - Walter J., Capell A., Hung A.Y., Langen H., Schnölzer M., Thinakaran G., Sisodia S.S., Selkoe D.J., Haass C., "Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations", *J Biol Chem.*, Vol. 272, no. 3, 1997, pp. 1896-903
  - Wang Y., Newton D.C., Robb G.B., Kau C.L., Miller T.L., Cheung A.H., Hall A.V., VanDamme S., Wilcox J.N., Marsden P.A., "RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 96, no. 11, 1999, pp. 12150-5
  - Wang W., Bu B., Xie M., Zhang M., Yu Z., Tao D., "Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol* 2009; 89: 1-17
  - Watson D., Castaño E., Kokjohn T.A., Kuo Y.M., Lyubchenko Y., Pinsky D., Connolly E.S. Jr, Esh C., Luehrs D.C., Stine W.B., Rowse L.M., Emmerling M.R., Roher A.E., "Physicochemical characteristics of soluble oligomeric Aβ and their pathologic role in Alzheimer's disease", *Neurol Res.*, Vol. 27, no. 8, 2005, pp. 869-81
  - Webster S., Lue L.F., Brachova L., Tenner A.J., McGeer P.L., Terai K., Walker D.G., Bradt B., Cooper N.R., Rogers J., "Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.*, Vol. 18, no. 4, 1997, pp. 415-21
  - Weidemann A., Paliga K., Dürrwang U., Czech C., Evin G., Masters C.L., Beyreuther K., "Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein", *Nat Med.*, Vol. 3, no. 3, 1997, pp. 328-32
  - Whitehouse P.J., "Genesis of Alzheimer's disease", *Neurology.*, Vol. 48, no. 5 Suppl 7, 1997, pp. S2-7
  - Wilhelmssen K.C., Lynch T., Pavlou E., Higgins M., Nygaard T.G., "Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22", *Am J Hum Genet.*, Vol. 55, no. 6, 1994, pp. 1159-65
  - Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T., Selkoe D.J., "Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity", *Nature.*, Vol. 398, no. 6727, 1999, pp. 513-7
-

- Wood J.G., Mirra S.S., Pollock N.J., Binder L.I., "Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau)", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. 83, no. 11, 1986, pp. 4040-3
- Xia W., Zhang J., Kholodenko D., Citron M., Podlisny M.B., Teplow D.B., Haass C., Seubert P., Koo E.H., Selkoe D.J., "Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins", *J Biol Chem.*, Vol. 272, no. 12, 1997, pp. 7977-82
- Xia W., Zhang J., Ostaszewski B.L., Kimberly W.T., Seubert P., Koo E.H., Shen J., Selkoe D.J., "Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi", *Biochemistry.*, Vol. 37, no. 47, 1998, pp. 16465-71
- Xia M.Q., Hyman B.T., "Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease", *J Neurovirol.*, Vol. 5, no. 1, 1999, pp. 32-41
- Xia M.Q., Bacskai B.J., Knowles R.B., Qin S.X., Hyman B.T., "Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease", *J Neuroimmunol.*, Vol. 108, no. 1-2, 2000, pp. 227-35
- Yamazaki T., Selkoe D.J., Koo E.H., "Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons", *J Cell Biol.*, Vol. 129, no. 2, 1995, pp. 431-42
- Yao T.C., Tsai Y.C., Huang J.L., "Association of RANTES promoter polymorphism with juvenile rheumatoid arthritis", *Arthritis Rheum.*, Vol. 60, no. 4, 2009, pp. 1173-8
- Ye Y., Lukinova N., Fortini M.E., "Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants", *Nature.*, Vol. 398, no. 6727, 1999, pp. 525-9
- Yu G., Chen F., Levesque G., Nishimura M., Zhang D.M., Levesque L., Rogaeva E., Xu D., Liang Y., Duthie M., St George-Hyslop P.H., Fraser P.E., "The presenilin 1 protein is a component of a high molecular weight intracellular complex that contains beta-catenin", *J Biol Chem.*, Vol. 273, no. 26, 1998, pp. 16470-5
- Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y.Q., Rogaeva E., Chen F., Kawarai T., Supala A., Levesque L., Yu H., Yang D.S., Holmes E., Milman P., Liang Y., Zhang D.M., Xu D.H., Sato C., Rogaev E., Smith M., Janus C., Zhang Y., Aebbersold R., Farrer L.S., Sorbi S., Bruni A., Fraser P., St George-Hyslop P., "Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing", *Nature.*, Vol. 407, no. 6800, 2000, pp. 48-54
- Zhang P., Liu B., Kang S.W., Seo M.S., Rhee S.G., Obeid L.M., "Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2", *J Biol Chem.*, Vol. 272, no. 49, 1997, pp. 30615-8
- Zhang J., Kang D.E., Xia W., Okochi M., Mori H., Selkoe D.J., Koo E.H., "Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells", *J Biol Chem.*, Vol. 273, no. 20, 1998, pp. 12436-42

- Zhang Z., Nadeau P., Song W., Donoviel D., Yuan M., Bernstein A., Yankner B.A., "Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1", *Nat Cell Biol.*, Vol. 2, no. 7, 2000, pp. 463-5
- Zekanowski C., Golan M.P., Krzyśko K.A., Lipczyńska-Łojkowska W., Filipek S., Kowalska A., Rossa G., Peplowska B., Styczyńska M., Maruszak A., Religa D., Wender M., Kulczycki J., Barcikowska M., Kuźnicki J., "Two novel presenilin 1 gene mutations connected with frontotemporal dementia-like clinical phenotype: genetic and bioinformatic assessment", *Exp Neurol.*, Vol. 200, no. 1, 2006, pp. 82-8
- Zhu X., Casadesus G., Raina AK., Perry G., Smith MA.. Neuronal cell cycle re-entry: a doomed journey in Alzheimer disease? In *Frontiers in Neurodegenerative Disorders and Aging: Fundamental Aspects, Clinical Perspectives and New Insights*. Eds T Ozben, N Chevion. Amsterdam: IOS Press. 2004; 200-6.
- Zuchner S, Gilbert JR, Martin ER, Leon-Guerrero CR, Xu PT, Browning C, Bronson PG, Whitehead P, Schmechel DE, Haines JL, Pericak-Vance MA (2008) Linkage and association study of late-onset Alzheimer disease Families linked to 9p21.3. *Ann Hum Genet* 72:725-731

## APPENDICE

---

I risultati che ho descritto nella mia tesi sono stati pubblicati nelle seguenti riviste scientifiche:

Cortini F, Fenoglio C, Venturelli E, Villa C, Clerici F, Serpente M, Cantoni C, Fumagalli C, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. Cell-dependent kinase inhibitor C 2A and 2B genetic variability in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol*, Nov 2010

Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Gallone S, Scalabrini D, Cortini F, Fumagalli G, Cappa S, Binetti G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. Is *KIF24* a genetic risk factor for Frontotemporal Lobar Degeneration? *Neurosci Lett*. 2010 Oct 4;482(3):240-4