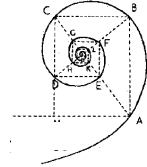




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVII

Anno Accademico 2013/2014

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Settore scientifico disciplinare: MED26

**RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE NELLA
DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE
(MALATTIA DI PICK) A TRASMISSIONE AUTOSOMICA
DOMINANTE E SPORADICA**

Dottorando : Rossana BONSI

Matricola N°: R09712

TUTORE : Ch.mo Prof. Elio Angelo SCARPINI

CO-TUTORE: Dott.ssa Daniela GALIMBERTI

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Ch.mo Prof. Mario Clerici

SOMMARIO

Le mutazioni nei geni Progranulina (GRN) e C9orf72 sono responsabili della maggior parte dei casi familiari di Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD), che è il tipo di demenza più frequente in età presenile ed è caratterizzata prevalentemente da disturbi comportamentali. Gli obiettivi di questa ricerca sono stati: 1) effettuare uno screening genetico su una popolazione di pazienti affetti da FTLD, al fine di identificare mutazioni causali 2) valutare i livelli di espressione di citochine e chemochine in pazienti portatori di mutazioni in GRN, c9orf72 e confrontarli con quelli dei casi sporadici e controlli 3) analizzare i livelli proteici di molecole infiammatorie nel liquor e sieri negli stessi gruppi di pazienti e controlli. Venti pazienti sono risultati portatori di mutazioni nel gene GRN, in due è stata rilevata una nuova mutazione, Cys149fs (g. 1159_1160TG), localizzata nell'esone 5 del gene GRN. La presenza dell'espansione della ripetizione G₄C₂, localizzata nel primo introne del gene c9orf72, è stata analizzata in un'ampia popolazione (772 pazienti FTLD, 22 con CBD e 33 PSP). Sono stati individuati quarantasei pazienti portatori dell'espansione. L'analisi condotta su pazienti affetti da CBD e PSP non ha prodotto alcun risultato positivo, così come lo screening su 222 controlli sani. Per quanto riguarda l'analisi dei livelli di espressione genica di citochine e chemochine, sono state utilizzate le piastre della Sabioscience selezionando 3 pazienti portatori dell'espansione in c9orf72, 6 pazienti portatori di mutazioni in GRN (3 sintomatici e 3 asintomatici), 3 casi sporadici di FTLD e 3 controlli di pari età. I risultati ottenuti mostrano una diminuzione generalizzata dei livelli di espressione di citochine e chemochine in pazienti portatori di mutazioni in GRN sintomatici rispetto ai controlli; in particolare, è stata rilevata una significativa down-regolazione dei livelli di interleuchina (IL)-4. Al contrario, prendendo in considerazione il profilo delle citochine nei casi sporadici di FTLD rispetto ai controlli, è emersa una tendenza opposta; in particolare, i livelli di espressione di IL-5 e Leukemia Inhibitory Factor (LIF) sono risultati aumentati in maniera statisticamente significativa. Nei pazienti portatori dell'espansione in c9orf72 invece abbiamo constatato un quadro più eterogeneo; in particolare, è emersa una significativa over-espressione dei livelli di chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL-2 o MCP-1) e chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL-10 o IP-10). I risultati di espressione ottenuti mettono in evidenza una tendenza opposta dei livelli di molecole infiammatorie tra i pazienti FTLD portatori di mutazioni in GRN o C9orf72 e casi sporadici di FTLD rispetto ai controlli, suggerendo la presenza di pathways patogenetici differenti tra pazienti portatori di mutazioni e non portatori. Sono stati infine valutati i livelli di citochine e chemochine nel liquor e sieri degli stessi gruppi di pazienti e controlli attraverso l'utilizzo della tecnologia Bioplex. L'analisi dei dati ottenuti mostra un aumento significativo dei livelli di CCL-2 e CXCL10 nel liquor di pazienti FTLD sporadici rispetto ai controlli; la medesima osservazione è stata fatta per i livelli liquorali di IP-10 in pazienti con FTLD portatori di mutazioni in GRN sintomatici rispetto ai controlli. D'altra parte, i livelli liquorali di RANTES sono risultati significativamente aumentati nel liquor di soggetti sani rispetto ai pazienti portatori di mutazione in GRN sintomatici e non portatori. I livelli liquorali di CXCL-10 e RANTES non sono influenzati dall'età, mentre MCP-1 correla positivamente

con l'età. Infine per quanto riguarda i portatori dell'espansione in C9orf72, nessuna molecola infiammatoria è stata trovata alterata in maniera statisticamente significativa.

ABSTRACT

Mutations in Progranulin (GRN) and Chromosome 9 Open Reading Frame 72 (C9orf72) genes are common causes of familial Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD), which represents the most common cause of dementia in presenile population. This study aimed to 1) perform a genetic screening in a population of patients with FTLD in order to identify pathogenic causal mutations 2) evaluate the expression of cytokines and chemokines in peripheral cells from GRN and C9orf72 carriers as compared with sporadic FTLD and controls 3) analyze protein levels of inflammatory molecules in CSF and sera of the same group of patients and controls. Twenty patients were carriers of GRN gene mutations, two of which had a novel mutation, Cys149fs (g. 1159_1160TG), located in exon 5 of GRN gene. The presence of G₄C₂ repeat expansion, positioned on the first intron of C9orf72 gene, was analyzed in a larger population (772 FTLD, 22 CBD and 33 PSP patients). Forty-six patients with FTLD were carriers of pathogenetic repeat expansion, whereas none of CBD and PSP patients as well as 222 controls carried the mutation. Concerning gene expression analysis of cytokines or chemokines, Sabioscience PCR arrays were used in 3 C9orf72 expansion carriers, 6 GRN carriers (3 symptomatic and 3 asymptomatic), 3 sporadic FTLD cases and 3 age-matched controls. We observed a generalized down-regulation of cytokine and chemokine expression levels in GRN symptomatic carriers compared with controls; in particular Interleukin (IL)-4 expression levels showed a significant down-regulation. On the contrary, considering cytokines profiling of sporadic cases compared to controls, the opposite trend was observed; in particular, IL-5 and Leukemia Inhibitory Factor (LIF) expression levels showed a significant overexpression compared to controls. In C9orf72 expansion carriers compared with controls, we showed a more heterogeneous situation; in particular, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL-2 or MCP-1) and chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL-10 or IP-10) were significantly over-expressed. These results showed an opposite trend of inflammatory molecules expression levels between FTLD GRN or C9orf72 carriers and sporadic patients compared with controls, suggesting different pathogenic pathways between mutation carriers and sporadic FTLD.

To complete the study, we evaluated protein expression levels of cytokines and chemokines in Cerebrospinal Fluid (CSF) and serum from the same group of patients and controls through Bioplex technology. Data analysis showed that CCL-2 and CXCL-10 levels were significantly increased in CSF from sporadic FTLD patients as compared to controls; the same observation was done for intrathecal CXCL-10 levels in patients with FTLD carrying GRN mutations compared with control subjects. Conversely, RANTES levels were increased in control subjects compared to sporadic FTLD cases and GRN symptomatic carriers. IP-10 and RANTES CSF levels were not likely to be influenced by age, whereas CCL-2 positively correlated with age. Finally regarding c9orf72 expansion carriers, none of inflammatory molecules was found statistically significant altered.

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	1
1.1	<i>La Degenerazione Lobare Frontotemporale.....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Epidemiologia.....	3
1.1.2	Clinica.....	4
1.1.3	Aspetti Neuropsicologici.....	7
1.1.4	Neuropatologia.....	9
1.1.5	Genetica.....	11
1.1.5.1	<i>MAPT.....</i>	<i>13</i>
1.1.5.2	<i>GRN.....</i>	<i>14</i>
1.1.5.3	<i>C9orf72.....</i>	<i>17</i>
1.1.5.4	<i>VCP-1.....</i>	<i>21</i>
1.1.5.5	<i>CHMP2B.....</i>	<i>22</i>
1.1.5.6	<i>TARDBP.....</i>	<i>23</i>
1.1.5.7	<i>FUS.....</i>	<i>23</i>
1.1.5.8	<i>CHCHD10.....</i>	<i>25</i>
1.1.6	Fattori di rischio genetici e FTLD sporadica.....	25
1.1.7	Infiammazione e Neurodegenerazione.....	27
2	SCOPO DELLA RICERCA.....	31
3	MATERIALI E METODI.....	32
3.1	<i>Arruolamento della popolazione oggetto dello studio ...</i>	<i>32</i>
3.2	<i>Purificazione del DNA genomico da sangue intero.....</i>	<i>34</i>
3.3	<i>Sequenziamento diretto dei geni MAPT e GRN.....</i>	<i>35</i>
3.4	<i>Genotipizzazione delle ripetizioni esanucleotidiche in C9orf72.....</i>	<i>38</i>
3.5	<i>Repeat Primed PCR ed analisi dei frammenti per la rilevazione dell'espansione in C9orf72.....</i>	<i>40</i>
3.6	<i>Analisi del livello di espressione genica di citochine e chemochine.....</i>	<i>43</i>
3.6.1	Estrazione e quantificazione dell'RNA totale da cellule periferiche.....	43
3.6.2	Analisi del livello di espressione di citochine e chemochine tramite RT ² Profiler PCR Array.....	43
3.6.3	Analisi statistica dei dati ottenuti tramite RT ² Profiler PCR Array.....	45
3.7	<i>Analisi del livello proteico di citochine e chemochine mediante Bio-plex pro assay.....</i>	<i>45</i>

3.7.1	Analisi statistica dei dati ottenuti mediante Bio-plex pro assay.....	46
4	RISULTATI	47
4.1	<i>Screening di mutazioni autosomiche dominanti</i>	<i>47</i>
4.2	<i>Frequenza di mutazioni nel gene GRN</i>	<i>47</i>
4.3	<i>Frequenza di mutazione nel gene MAPT</i>	<i>48</i>
4.4	<i>Frequenza dell'espansione esanucleotidica nel gene C9orf72</i>	<i>48</i>
4.5	<i>Confronto dei fenotipi clinici dei portatori delle mutazioni in GRN e dei portatori dell'espansione in C9orf72 rispetto ai non portatori</i>	<i>48</i>
4.6	<i>Analisi del livello di espressione di molecole infiammatorie</i>	<i>52</i>
4.6.1	<i>Profilo di espressione delle citochine</i>	<i>52</i>
4.6.2	<i>Profilo di espressione di chemochine e recettori</i>	<i>58</i>
4.7	<i>Analisi del livello liquorale o sierico di molecole infiammatorie</i>	<i>63</i>
4.7.1	<i>Livelli proteici di molecole infiammatorie nel liquor e sieri di pazienti portatori di mutazione in GRN, non portatori e controlli</i>	<i>63</i>
4.7.2	<i>Livelli proteici di molecole infiammatorie nel liquor e sieri di pazienti portatori di espansione in C9orf72, casi sporadici e controlli</i>	<i>69</i>
5	DISCUSSIONE	72
6	CONCLUSIONI	83
	BIBLIOGRAFIA	86
	PRODOTTI SCIENTIFICI	104
	RINGRAZIAMENTI	106

ABBREVIAZIONI

bvFTD:	Behavioral variant FTD
bvFTD-MND:	bvFTD with Motor Neuron Disease
CBS:	Corticobasal Syndrome
CCL-2:	C-C motif ligand 2
CHMP2B:	Chromatin Modifying Protein 2B
CHCHD10:	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10
C9orf72:	Chromosome 9 open reading frame 72
CSF:	Cerebrospinal fluid
CXCL-10:	C-X-C motif ligand 10
FGF-basic:	Fibroblast Growth Factor-basic
FTLD:	Frontotemporal Lobar Degeneration
FTLD-T:	Frontotemporal Lobar Degeneration with Tau
FTLD-U:	Frontotemporal lobar degeneration with Ubiquitinated inclusions
FUS:	Fused in sarcoma
G-CSF:	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF:	Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor
GRN:	Progranulin
GWAS:	Genome-Wide Association Studies
IFN-γ:	Interferon-gamma
IL:	Interlukin
IP-10:	Interferon-gamma-Inducible Protein 10
LIF:	Leukemia Inhibitory Factor
LPA:	Logopenic/Phonemic aphasia
MAPT:	Microtubule Associated Protein Tau
MCP-1:	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIP-1α:	Microphage Inflammatory Protein-1 alpha
MIP-1β:	Microphage Inflammatory Protein-1 beta
MMSE:	Mini Mental State Examination
PBMC:	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PDGF:	Platelets Derived Growth Factor
PNFA:	Progressive Non-Fluent Aphasia
PPA:	Primary Progressive Aphasia
PSP:	Progressive Supranuclear Palsy
RANTES:	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
SD:	Semantic Dementia
Taq:	Thermus aquaticus
TARBDP:	TAR-DNA binding protein 43 encoding
TGF-β:	Transforming Growth Factor-beta
Th1/Th2:	T Helper1/T Helper 2
TNF-α:	Tumor Necrosis Factor-alpha
VEGF-A:	Vascular Endothelial Growth Factor A
VCP-1:	Valosin-Containing Protein

1. INTRODUZIONE

1.1 La Degenerazione Lobare Frontotemporale

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

Nel 1998, Neary e collaboratori stilano i criteri internazionali per la diagnosi clinica della FTLD. I criteri includono tre diverse sindromi cliniche: la più frequente è la variante comportamentale Demenza Frontotemporale (bvFTD: behavioural variant Frontotemporal Dementia), rappresentata da un continuo e progressivo deterioramento della personalità e della condotta sociale, correlata alla disfunzione dei lobi temporali anteriori, generalmente simmetrica o più marcata a destra. I pazienti mostrano precocemente difficoltà nella gestione delle emozioni, per cui risultano disinibiti e mostrano comportamenti socialmente non appropriati al contesto, eccessiva giovialità, deficit di critica/giudizio ed iperoralità. I principali deficit cognitivi riguardano l'attenzione, le capacità astratte, la pianificazione e la risoluzione di problemi, mentre linguaggio, percezione e orientamento spazio-temporale sono conservati. Nonostante i pazienti non abbiano deficit amnesici, i test di memoria possono risultare deficitari a causa di disturbi di tipo frontale, quali mancanza di attenzione [Hou *et al.*, 2004].

Le altre due sindromi colpiscono il linguaggio: l'Afasia Primaria Non Fluente (PNFA: Primary Non Fluent Aphasia) è caratterizzata dal progressivo impoverimento del linguaggio, caratterizzato da importante agrammatismo,

con conseguente eloquio laborioso e/o espressione verbale interrotta da lunghe pause alla ricerca della parola, con riduzione significativa della durata media di un discorso, esitazione ed errori fonologici/fonetici o nella strutturazione della frase, fino talora al mutismo completo. La PNFA sembra essere associata, nella maggior parte dei casi, con l'AD [Rabinovici *et al.*, 2008]. Nella Demenza Semantica (SD: Semantic Dementia) vi è l'incapacità di correlare le parole con il loro significato. Il quadro anatomo-patologico è associato ad atrofia bilaterale ed asimmetrica della corteccia temporale.

Recentemente questi criteri sono stati rivisti, separando la bvFTD dalle forme prettamente di linguaggio. I criteri di Rascovski *et al.* (2011) suddividono la bvFTD in tre gradi di possibilità: "possibile" quando sono presenti solo criteri clinici; "probabile", quando vi è documentazione del quadro di atrofia tipico all'imaging; "definita" quando vi è la dimostrazione patologica in sede autoptica oppure in presenza di una mutazione autosomica dominante. Le forme di linguaggio sono invece state classificate da Gorno Tempini *et al.* (2011), che oltre alle già note forme PNFA e SD, hanno identificato una variante detta Afasia Logopenica (LPA: Logopenic Aphasia), caratterizzata da disturbi fonologici, da difetti nel recupero delle parole e da deficit nella ripetizione di frasi. Nel 10% dei casi, FTLD (soprattutto bvFTD) si sovrappone alla malattia del motoneurone (MND). Altre condizioni patologiche, espressione di disordini dei circuiti della base, come la paralisi sopranucleare progressiva (PSP) o la sindrome corticobasale (CBS), possono essere associate a FTLD [Cerami *et al.*, 2012; Piguet *et al.*, 2011]. Complessivamente l'insieme di tutti questi differenti fenotipi, riflette adeguatamente l'estrema eterogeneità clinica della FTLD e dei suoi aspetti clinico-patologici.

Nonostante la suddivisione delle varie forme patologiche, molti pazienti sviluppano nel corso del tempo caratteristiche cliniche appartenenti a più di

una sindrome, che potrebbero perciò sovrapporsi.

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

1.1.1 Epidemiologia

Considerando le principali cause di demenza (senile e presenile), la FTLD si colloca come terza, dopo la malattia di Alzheimer (AD) e la demenza a corpi di Lewy (DLB) [Arvanitakis *et al.*, 2010]. Si documenta che la prevalenza di FTLD sia approssimativamente il 10-15% di tutte le demenze confermate all'istopatologia [Snowden *et al.*, 2002].

Nell'ambito delle demenze presenili, cioè ad esordio precoce (<65 anni), FTLD, insieme alla demenza vascolare (VaD), è la prima causa dopo AD, corrispondendo a circa il 20% dei casi [Vieira *et al.*, 2013].

Diversamente dall'AD, la curva di incidenza della FTLD presenta un picco più precoce (45-65 anni), diventando una causa rara di demenza nella popolazione oltre i 65 anni [Ratnavalli *et al.*, 2002]. Ciò nonostante, è importante tener presente che raramente individui appartenenti alla fascia di età più elevata vengono sottoposti a test mirati, indispensabili per porre una diagnosi probabile o anche solo possibile di FTLD; esiste pertanto la possibilità che la reale incidenza della patologia sia sottostimata, come dimostrato in alcune casistiche autoptiche. Facendo sempre riferimento alla fascia di età compresa tra 45 e 64 anni, si stima che la prevalenza di FTLD sia 15-22/100.000 abitanti negli USA [Knopman *et al.*, 2011], 15/100.000 nel Regno Unito [Ratnavalli *et al.*, 2002] e 22/100.000 in Italia [Borroni *et al.*, 2010].

Si calcola che la sopravvivenza media sia di 6.6-11.0 anni dall'esordio dei sintomi [Gorno-Tempini *et al.*, 2011; Kipps *et al.*, 2009] e 3-4 anni dalla diagnosi clinica [Huey *et al.*, 2009]. Ciò mette in luce il significativo ritardo diagnostico [Gorno-Tempini *et al.*, 2011], il cui valore medio

corrisponderebbe a 3.6 anni rispetto ai 2.7 anni dei pazienti con AD [Piguet *et al.*, 2011]. Secondo uno studio longitudinale condotto con l'obiettivo di comparare la sopravvivenza dall'esordio di malattia in AD e in varianti di FTLD, bvFTD si accompagnerebbe alla minore sopravvivenza [Kipps *et al.*, 2009].

Non è ancora chiaro se vi sia o no una suscettibilità a FTLD legata al sesso. Molti studi suggeriscono che uomini e donne siano ugualmente affetti da questa malattia [Mesulam *et al.*, 2003; Rascovsky *et al.*, 2011; Taipa *et al.*, 2012]. Inoltre, la distribuzione in base al sesso varia da un sottotipo clinico all'altro dello spettro FTLD: è riportata una predominanza femminile in PNFA ed una maschile in bvFTD e SD [Huey *et al.*, 2009; Kipps *et al.*, 2009; Bonner *et al.*, 2010; Piguet *et al.*, 2011].

1.1.2 Clinica

Clinicamente la FTLD può essere suddivisa in due sottotipi che presentano delle caratteristiche predominanti; da un lato vi sono degli evidenti cambiamenti comportamentali e di personalità, dall'altro emergono importanti disturbi del linguaggio.

La variante comportamentale di FTLD (bvFTD), che si manifesta nel 50% dei casi di FTLD, è caratterizzata da un esordio insidioso in cui cambiamenti di personalità, fluttuazioni emotive e alterazioni del comportamento nei rapporti interpersonali testimoniano la progressiva degenerazione dei circuiti neurali coinvolti nel controllo della vita sociale, nella regolazione emozionale e nei processi decisionali [Kipps *et al.*, 2009]. La sintomatologia d'esordio è generalmente insidiosa. Tipicamente, risulta molto difficile ricostruire retrospettivamente l'epoca d'esordio: i pazienti sono anosognosici e diviene indispensabile la raccolta anamnestica dai parenti o dai *caregiver*. A questo scopo risultano utili questionari ad hoc che mirano ad evidenziare le caratteristiche salienti nei primi stadi della patologia (Neuropsychiatric Inventory, Cambridge Behavioural Inventory,

Frontal Behavioural Inventory) [Cummings *et al.*, 1994; Bozeat *et al.*, 2000; Kertesz *et al.*, 1997].

In bvFTD, sono stati riportati due distinti profili [Le Ber *et al.*, 2006; Snowden *et al.*, 2001], denominati rispettivamente “apatico” e “disinibito”. Nel primo il paziente mostra eminente apatia, inerzia ed abulia. L’apatia può tradursi in ridotta motivazione sul lavoro o negli hobby precedentemente svolti e in un graduale isolamento sociale che può essere misdiagnosticato come depressione [Zamboni *et al.*, 2008]. Generalmente si rende necessaria la presenza di un caregiver che sproni all’adempimento dei compiti più semplici. Nel secondo, il malato manifesta soprattutto disinibizione, impulsività ed incapacità di giudizio; è portato a spendere oltremodo, al gioco d'azzardo patologico, alla cleptomania, ad assumere atteggiamenti imbarazzanti o antisociali, ad infrangere la legge [Postiglione *et al.*, 2008]; è spesso irritabile, iperattivo e molto giocoso; si rivolge agli altri con eccessiva confidenza ricorrendo a commenti inappropriati, soprattutto a sfondo sessuale; non sperimenta comportamenti di vera e propria ipersessualità, piuttosto un calo della libido [Rabinovici *et al.*, 2010]. Non di rado viene erroneamente scambiato per un paziente psichiatrico. In letteratura è ampiamente documentata variabilità della sintomatologia durante il decorso della malattia perciò la distinzione fra i due prototipi descritti è manifesta soprattutto negli stadi più precoci, poiché tardivamente possono sovrapporsi [Snowden *et al.*, 2001]. Lungo il decorso della malattia, i pazienti possono gradualmente disinteressarsi della propria igiene e perdere il controllo sfinterico [Rabinovici *et al.*, 2010]. Possono manifestarsi perseverazione e tendenza alla ripetizione di frasi, comportamenti ritualistici e stereotipie. La mancanza di empatia è un tratto costante; molti pazienti presentano reazioni di afflizione eccessive ai rimproveri [Shinagawa *et al.*, 2009].

Altra caratteristica fondamentale è la rigidità mentale: i soggetti faticano ad

adattarsi a situazioni ed ambienti nuovi, con estrema conformità alla routine. In alcuni casi si può osservare uno stato simil-ipomaniacale o francamente depressivo. Sono costantemente descritti cambiamenti nelle abitudini alimentari, probabilmente correlati a cambiamenti patologici nei circuiti neuronali ipotalamici deputati al buon controllo metabolico [Piguet *et al.*, 2011]. Sintomi psicotici, quali ideazioni paranoide e allucinazioni, sono possibili nella FTLD, soprattutto in pazienti con FTLD associata a malattia del motoneurone (MND) con FTLD-FUS o con FTLD-C9orf72, in cui la prevalenza di tali disturbi raggiunge anche il 50% [Pasquier *et al.*, 1999].

Rappresentazione clinica alternativa a bvFTD, è l'afasia primaria progressiva (PPA). L'esordio è caratterizzato da un deficit isolato e selettivo delle abilità linguistiche. Segue un graduale e progressivo declino della produzione linguistica, della denominazione, della sintassi o della comprensione verbale.

Il sistema di classificazione di Gorno-Tempini *et al.*, stilato nel 2011, guida l'identificazione di 3 sottotipi. La variante non fluente o agrammatica (PNFA) è caratterizzata da importante agrammatismo, con conseguente eloquio laborioso e/o espressione verbale interrotta da lunghe pause alla ricerca della parola, con riduzione significativa della durata media di un discorso, esitazione ed errori fonologici/fonetici o nella strutturazione della frase [Ogar *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2013]. La diagnosi di PNFA dovrebbe essere limitata a pazienti che non presentino una chiara sindrome motoria, come rigidità generalizzata o tremore.

I pazienti affetti da demenza semantica (SD) dimostrano una precoce ed importante compromissione della comprensione di singole parole, espressione di un deficit diffuso della memoria semantica. Quando danneggiata, non è più consentito il riconoscimento di parole, forme, oggetti, volti, e quindi persone, anche quando vengono presentate attraverso input sensoriali diversi [Bozeat *et al.*, 2000].

In merito alla variante logopenica o fonologica, la più recente e la meno conosciuta delle tre, le caratteristiche principali sono: difficoltà nella rievocazione di nomi (anomia) che si accompagna al fenomeno patologico de “l’aver la parola sulla punta della lingua” e difficoltà nella ripetizione e nella comprensione di frasi [Leyton *et al.*, 2014]; l’eloquio spontaneo è povero, difficoltoso e continuamente interrotto.

1.1.3 Aspetti Neuropsicologici

In pazienti affetti dalla variante bvFTD, diventa difficile avere un profilo neuropsicologico tipico nei primi stadi di malattia, poiché spesso la valutazione è sovrapponibile a quella di soggetti sani nonostante la presenza importanti cambiamenti comportamentali e di personalità [Mioshi *et al.*, 2007]. In questa fase sembrerebbe essere più utile una valutazione di tipo osservazionale di quei comportamenti che presuppongono una disfunzione delle aree prefrontali (disinibizione, mancato controllo degli impulsi, comportamenti d'utilizzo) ed un colloquio con i familiari per ottenere informazioni relative a modificazioni comportamentali e della personalità del paziente [Mioshi *et al.*, 2007].

Il MMSE (*Mini Mental State Examination*) non è considerato un test attendibile nel contesto diagnostico della FTLD. Il test di Addenbrooke, altra batteria di screening come il MMSE, indaga più nello specifico eventuali disturbi di natura prefrontale. Questi, come in generale tutti i test e le batterie di screening, non consentono da soli di tracciare un profilo neuropsicologico completo. Pertanto ai fini della diagnosi è sempre utile una valutazione neuropsicologica più approfondita.

Allo stato attuale non sembrerebbe esistere un profilo cognitivo deficitario universale per i pazienti affetti da bvFTD, anche se uno scrupoloso screening neuropsicologico dovrebbe indicare una compromissione delle funzioni esecutive agli stadi precoci di malattia [Piguet *et al.*, 2011], mentre, con la progressione della stessa e l’estendersi dell’atrofia anche ai lobi

temporali anteriori, il quadro deficitario diventerebbe più sfumato, sovrapponendosi ad altri sottotipi di FTLD, in particolare SD [Kertesz *et al.*, 1997]. Proprio la mancanza di un profilo neurocognitivo tipico ha spostato l'attenzione su test in grado di indagare la capacità di giudizio sociale, di riconoscimento delle emozioni e di risoluzione di problemi complessi. È noto, infatti, che la corteccia orbitomesiale rivesta un ruolo cruciale nel controllo di tutte queste abilità, ed effettivamente i pazienti affetti da bvFTD mostrano prestazioni deficitarie in test specifici (per esempio Iowa gambling tasks). Quando parliamo di profilo cognitivo tipico per bvFTD, ci riferiamo al relativo risparmio delle abilità linguistiche e visuospaziali; il risparmio della memoria episodica, a fronte di una compromissione delle funzioni esecutive, è indispensabile per poter porre diagnosi di bvFTD, ma in letteratura si documenta un coinvolgimento di tale dominio in una percentuale variabile dal 10 al 15% dei pazienti [Graham *et al.*, 2005; Galimberti *et al.*, 2013].

Nei pazienti affetti da PPA i domini linguistici fondamentali presi in considerazione nell'inquadramento sono: produzione linguistica, ripetizione e "spelling", correttezza grammaticale, comprensione sintattica, comprensione di singole parole, denominazione, abilità semantiche, lettura e compitazione. Per quanto riguarda la produzione linguistica, viene valutata soprattutto la fluenza verbale con eventuale presenza di agrammatismo e di deficit di tipo motorio, caratteristiche entrambe della variante non fluente. La denominazione è fortemente compromessa nella SD, moderatamente compromessa nella variante logopenica; nel primo gruppo di pazienti, inoltre, sono frequenti errori di tipo semantico, mentre nel secondo gruppo si riscontrano soprattutto errori fonemici. La difficoltà nella ripetizione è caratteristica della variante logopenica, mentre la comprensione di singole parole e il riconoscimento di persone e/o oggetti risultano deficitarie nella demenza semantica. Prestazioni al di sotto dei

valori soglia nella comprensione di frasi è riscontrabile sia nella variante non fluente che in quella logopenica, con un'importante influenza nelle prestazioni della difficoltà grammaticale nel primo caso e della lunghezza del periodo nel secondo. Infine, si possono osservare disturbi nella lettura e nella compitazione nelle varianti semantica e logopenica [Gorno-Tempini *et al.*, 2004].

1.1.4 Neuropatologia

Attualmente col termine “Degenerazione Lobare Frontotemporale” si indicano tutti i cambiamenti patologici macroscopici e microscopici riscontrabili all'esame istologico di campioni autoptici prelevati da pazienti affetti da FTLD [Mesulam *et al.*, 1992].

Grazie ai recenti progressi nelle tecniche di immunohistochimica, è stato possibile trasformare ed ampliare il sistema nosologico che classifica FTLD secondo la neuropatologia, con l'intento di fornire una terminologia chiara e facile da adottare e di risalire alla patogenesi di malattia. L'attuale nomenclatura prevede sottotipi neuropatologici classificati in base alle lesioni e ai maggiori costituenti dell'inclusione, che si depositano all'interno delle cellule nervose delle aree atrofiche.

Circa il 40% dei casi FTLD, mostra all'esame immunohistologico, inclusioni tau-positive. I pazienti che presentano queste caratteristiche istologiche rientrano nella categoria definita di FTLD-T (FTLD associata a depositi di tau), cui appartengono i casi di malattia associati a mutazioni nel gene *MAPT* e si possono distinguere pazienti con predominanza di 3R tau e pazienti con predominanza 4R tau [Mackenzie *et al.*, 2010]. Le mutazioni di *MAPT* condizionano due principali pattern di accumulo patologico di tau, responsabili della neurodegenerazione: mutazioni al di fuori della regione codificante dell'esone 10 causano aggregati filamentosi insolubili sia di 3R-tau che di 4R-tau, mentre mutazioni nella regione codificante dell'esone 10 (o con aumentato splicing dell'esone 10) comportano l'instaurarsi di

depositi di 4R-tau sia nei neuroni sia nella glia. Le inclusioni citoplasmatiche composte dalla proteina anomala tau iperfosforilata, caratterizzano una percentuale di casi FTLD che includono anche la malattia di Pick (i corpi di Pick contengono principalmente 3R-tau) [De Silva *et al.*, 2006] ed altre tauopatie (4R-tau è il componente preponderante delle inclusioni nella PSP e nella CBD) [Sergeant *et al.*, 1999]. In casi molto rari è possibile che i neuroni degenerino anche in assenza di lesioni evidenti.

Negli ultimi anni è parso evidente che quasi il 60% dei casi di FTLD risultino tau-negativi e sono caratterizzati dalla presenza di depositi di ubiquitina, per cui vengono definiti FTDL-U (FTLD associata a depositi di ubiquitina). All'esame istologico dei casi tau-negativi, vengono documentati aggregati proteici citoplasmatici costituiti dalla proteina TDP-43 (*TAR DNA-binding protein 43*, quindi TDP-43 positivi) in una percentuale pari al 50% di tutti i casi di FTLD. Sono colpiti i neuroni appartenenti alle aree normalmente interessate dalla malattia, ma anche i neuroni del giro dentato dell'ippocampo. Pazienti che presentano queste caratteristiche istologiche rientrano nella categoria definita di FTLD-TDP. Nel 2009 sono stati descritti anche casi di malattia con depositi immunoreattivi per la proteina FUS (Fused in sarcoma) in pazienti che presentano SLA o FTLD. La categoria che li descrive è FTLD-FUS e costituirebbe l'8% di tutti i casi. Sia TDP-43 che FUS sono proteine coinvolte nella regolazione della processazione dell'RNA, tramite legame all'acido nucleico; purtroppo i meccanismi patogenetici scatenati da un loro accumulo nella cellula non sono ancora stati pienamente compresi.

In un numero esiguo di casi FTLD-U, corrispondente a meno dell'1% di tutti i casi di FTLD, le inclusioni proteiche rimangono ancora oggi sconosciute e sono stati classificati come FTLD legati al sistema del proteasoma (FTLD-UPS). A completamento del quadro neuropatologico attuale, vi è quel sottotipo minore relativo a casi in cui le cui inclusioni non possono essere

identificate dall'immunoistochimica (FTLD-ni, no inclusions) [Mackenzie *et al.*, 2009; Holm *et al.*, 2009].

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

In bvFTD non esiste un'associazione preferenziale tra un determinato quadro neuropatologico e uno specifico spettro di manifestazioni cliniche. La quasi totalità dei pazienti affetti mostra inclusioni tau positive o TDP-43 positive, con una distribuzione abbastanza equa. Solo una piccola percentuale di casi presenta inclusioni *FUS* positive [Peelaer *et al.*, 2010]. FTLD-*FUS* è invariabilmente associata con la diagnosi clinica di bvFTD, con o senza segni di malattia del motoneurone.

Al contrario, le varianti cliniche comprese sotto il termine di PPA sono state statisticamente associate a differenti quadri neuropatologici.

La variante non fluente (PNFA) mostra una significativa associazione con inclusioni tau-positive [Knibb *et al.*, 2006].

In alcuni casi, soprattutto familiari, il pattern neuropatologico sotteso può essere duplice, includendo FTLD-TDP e FTLD-T. Recenti studi hanno però dimostrato l'assenza d'interazione fra le rispettive alterazioni patologiche [Robinson *et al.*, 2014]. La SD risulta associata a inclusioni TDP-43 positive [Knibb *et al.*, 2006; Gainotti, 2007], sebbene alle volte siano state osservate inclusioni tau positive [Rabinovici *et al.*, 2010]. Infine, i pazienti affetti dalla forma logopenica sembrerebbero presentare un profilo neuropatologico compatibile con AD [Hodges *et al.*, 2004]. È, tuttavia, importante precisare come la corrispondenza tra sindrome clinica e quadro neuropatologico non sia assoluta con notevoli casi di sovrapposizione.

1.1.5 Genetica

La FTLD è un disordine geneticamente complesso: molti fattori genetici

contribuiscono all'insorgenza e alla progressione della malattia.

Precedenti studi hanno analizzato la storia familiare di ampie coorti di pazienti con FTLD, documentando familiarità positiva per demenza nel 30-50% dei casi [Borrioni *et al.*, 2010]. Di questi, il 15-40% sono ereditari secondo un pattern di trasmissione autosomico dominante [Wood *et al.*, 2013]. I parenti di primo grado presentano un rischio di sviluppare demenza prima degli 80 anni ben 3,5 volte superiore rispetto a coloro con familiarità negativa [Stevens *et al.*, 1998]. Anche il numero di parenti di primo grado affetti da demenza è altamente predittivo della presenza di mutazioni: la maggioranza dei pazienti con più di due parenti di primo grado colpiti da malattia presenta una mutazione genetica.

Tutti questi dati esaltano il ruolo della componente genetica nel determinare questo disordine e nell'influenzarne la progressione. Mettendo a confronto il grado di ereditarietà delle diverse manifestazioni cliniche di FTLD, bvFTD detiene il grado maggiore, soprattutto se concomitano sintomi da malattia del motoneurone (60%); al contrario, SD è la variante con grado di ereditarietà minore (20%) [Goldman *et al.*, 2005].

La dimostrazione della presenza di una mutazione autosomica dominante è richiesta per la diagnosi di bvFTD certa ed è anche l'unico strumento che attualmente permetta una diagnosi definitiva durante la vita del paziente [Rascovsky *et al.*, 2011].

Le conoscenze finora acquisite sulla genetica della FTLD sono state recentemente ampliate tramite l'identificazione di difetti in più loci cromosomici. I tre geni maggiormente responsabili delle forme familiari di FTLD sono: *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau gene), *GRN* (Progranulin) e *C9orf72* (chromosome 9 open reading frame 72).

Vi sono altri geni che in rari casi sono stati associati alla patologia: *VCP-1* (Valosin-Containing Protein), *CHMP2B* (Chromatin-Modifying 2B), *FUS* (fused in sarcoma), *TARBDP* o *TDP-43* (TAR DNA binding protein), ed

infine di recentissima scoperta il gene *CHCHD10* (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10).

La frequenza relativa delle differenti mutazioni in questi geni varia sostanzialmente nelle diverse popolazioni, dimostrando la presenza di un effetto fondatore. Nonostante ciò, la maggior parte dei casi di FTLD è sporadica e lo studio di geni candidati che possano agire da fattori di suscettibilità per la malattia riveste un ruolo importante.

Ad oggi sono pochi in letteratura gli studi che documentino un'associazione positiva tra geni e aumento dell'insorgenza della FTLD. A questo proposito Van Deerlin e collaboratori nel 2010 hanno pubblicato il primo studio GWAS (Genome Wide Analysis Study) che ha analizzato il DNA di 513 individui affetti da FTLD-TDP. In tale studio è stata riscontrata una forte associazione tra un gene presente sul cromosoma 7p21, *TMEM106b*, e un aumento del rischio d'insorgenza della FTLD [Van Deerlin *et al.*, 2010].

1.1.5.1 MAPT

La prima evidenza dell'esistenza di una causa genetica nelle forme di FTLD familiare è giunta nel 1994 dalla dimostrazione di un legame tra cromosoma 17q21.2 e forme autosomiche dominanti di FTLD associate a parkinsonismo [Lynch *et al.*, 1994], da cui è derivato successivamente il nome di "Demenza Frontotemporale e parkinsonismo legato al cromosoma 17" (FTDP-17).

Il gene responsabile di questa associazione, chiamato *MAPT*, codifica per la proteina tau associata ai microtubuli, la cui funzione è quella di stabilizzare e favorire l'assemblamento degli stessi [Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998]. Tale funzione è resa possibile grazie alla presenza nella regione carbossi-terminale di domini di legame con carica positiva, in grado di legare le cariche negative dei microtubuli.

Ad oggi sono state descritte più di 44 mutazioni in 134 differenti famiglie (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>), classificate in base alla

regione genica colpita, al loro effetto sulla trascrizione del gene stesso e al tipo di tauopatia che determinano.

Le mutazioni in *MAPT* possono essere missenso, delezioni o mutazioni introniche che si posizionano vicino al sito donatore di splicing. Tutte le mutazioni patogenetiche sono concentrate tra l'esone 9 e l'esone 13 tranne due che sono state identificate nell'esone 1 [Rademakers *et al.*, 2002].

I possibili effetti provocati sulla proteina tau si ripercuotono su differenti meccanismi associati alla proteina stessa, per cui dipendono dal tipo e dalla localizzazione della mutazione. Ad ogni modo, un numero considerevole di mutazioni ne promuovono l'aggregazione, mentre altre ne incrementano la fosforilazione, per cui risulta danneggiata la stabilizzazione dei microtubuli e del citoscheletro [Goedert *et al.*, 2005; Buée *et al.*, 1999]. Molte altre sono invece implicate in un processo di splicing anomalo [Goedert *et al.*, 1989] che porta alla produzione di differenti isoforme della proteina e ad un'alterazione del loro bilancio (3R/4R). Alcune mutazioni presenti in porzioni codificanti del gene *MAPT* mostrano un aumento della tendenza della proteina tau a formare aggregati neurotossici.

All'autopsia, i pazienti con mutazioni in *MAPT* mostrano inclusioni tau-positive. Inoltre, la manifestazione clinica nei portatori della mutazione *MAPT* si evidenzia soprattutto nei pazienti con bvFTD ad esordio intorno alla quinta decade di vita. Tuttavia, anche casi di PNFA sono stati segnalati, con un esordio precoce intorno alla sesta decade di vita [Yancopoulou *et al.*, 2003]. Anche se la presentazione clinica è eterogenea sia in termini di sintomi sia in termini d'esordio, i soggetti portatori di mutazioni in *MAPT* di solito presentano una grave atrofia del lobo temporale, per lo più lateralizzata a destra.

1.1.5.2 GRN

In seguito alla scoperta di *MAPT* come gene causale per la FTLD-17, rimanevano ancora numerose famiglie affette da FTLD a trasmissione

autosomica dominante e geneticamente correlate con la regione cromosomica 17q21, ma che non presentavano nessuna mutazione patogenetica sul gene *MAPT* [Lendon *et al.* 1998; Rosso *et al.* 2001; Van der Zee *et al.*, 2006]. Questi pazienti, inoltre, non presentavano depositi di proteina tau iperfosforilata, ma inclusioni neuronali citoplasmatiche e depositi intranucleari di ubiquitina. Per questo motivo, è stato ipotizzato che queste forme di FTLD potessero essere causate da altri tipi di mutazioni.

Grazie al sequenziamento di circa 80 geni, contenuti nella regione che causa questo tipo di malattia, è stata così identificata la prima mutazione (c.90-91insCTGC) sul gene *GRN*.

Essa consiste in un'inserzione di 4 paia di basi (CTGC) tra i nucleotidi 90 e 91 della regione codificante nell'esone 1. Tale mutazione causa un frameshift e una prematura terminazione della trascrizione della proteina Progranulina (C31LfsX34) [Baker *et al.*, 2006].

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

Una stima della frequenza di mutazioni in *GRN* nei pazienti FTLD indica una percentuale del 6-10%, anche se il risultato dipende dal tipo di popolazione considerata [Pickering-Brown *et al.*, 2008]. Il gene *GRN*, formato da 13 esoni, codifica per la Progranulina (PGRN): una proteina di 593 amminoacidi, ricca in cisteine, il cui un peso molecolare è di 68.5 kDa. Il suo processamento da parte di elastasi, da origine a piccoli peptidi, chiamati granuline. La progranulina è un fattore di crescita con proprietà neutrofiche che appartiene ad una famiglia di proteine coinvolte in numerose funzioni biologiche tra cui lo sviluppo, la riparazione delle ferite e l'infiammazione (attivando specifiche cascate del segnale), la progressione del ciclo cellulare e la motilità cellulare [He *et al.*, 2003]. E' ubiquitariamente espressa: a livello del SNC è presente nei neuroni con un ruolo critico nello

sviluppo, nella differenziazione sessuale e nella sopravvivenza neuronale, ma anche nella microglia attivata [Suzuki *et al.*, 2009] in particolare durante il corso di molte malattie neurodegenerative. Sebbene PGRN abbia attività anti-infiammatoria, al contrario le granuline hanno proprietà pro-infiammatorie.

Ad oggi, sono state descritte 69 diverse mutazioni in 231 famiglie FTLD (<http://www.molgen.vib-ua.be/FTDMutations>). 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, a seguito della formazione di un codone di stop. L'mRNA prodotto risulta pertanto aberrante, viene tenuto nel nucleo e degradato, determinando così un fenomeno di aploinsufficienza [Gass *et al.*, 2006], al contrario di come invece accade per la proteina tau, la quale una volta mutata tende a depositarsi nei neuroni. Le mutazioni in *GRN* sono distribuite uniformemente lungo tutta la porzione codificante e nei siti di splicing del gene. Tali mutazioni comportano, come detto in precedenza, aploinsufficienza, ma è stata identificata anche una delezione totale (o quasi) del gene che comporta la mancata produzione della proteina.

Da un punto di vista clinico, le mutazioni nel *GRN* sono associate con fenotipi estremamente eterogenei, tra cui, oltre alla presentazione classica di FTLD, troviamo anche casi di AD [Carecchio *et al.*, 2009] e MCI. L'età di esordio della malattia è veramente ampia, anche all'interno della stessa famiglia e va dai 47 ai 79 anni.

Un importante contributo per ottenere una corretta diagnosi indipendente della presentazione fenotipica spesso così variabile, è la dimostrazione che i livelli plasmatici di progranulina sono estremamente bassi nei portatori della mutazione *GRN* ed anche in soggetti asintomatici [Carecchio *et al.*, 2009].

1.1.5.3 *C9orf72*

Una delle scoperte più interessanti che riguardano la genetica della FTLD è arrivata da uno studio di linkage in famiglie affette da FTD-MND ed ha portato all'identificazione di un potenziale locus di suscettibilità sul cromosoma 9p21-22 [Sieben *et al.*, 2012].

La prima evidenza scientifica di un linkage con questo locus genetico è emersa nel 2000 da uno studio pubblicato da Hosler e collaboratori condotto su famiglie affette da FTD-MND. Dopo questo, numerosi lavori hanno confermato tale linkage presente sul cromosoma 9p21-22. Nel corso dell'ultima parte del 2011, due gruppi di ricerca hanno identificato in maniera indipendente la presenza di un'anormale espansione di una ripetizione esanucleotidica (*GGGGCC*) presente in una porzione non codificante del gene *C9orf72*, posizionato sul cromosoma 9p21 [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011]. Tale espansione sembra essere responsabile di un elevato numero di casi familiari di SLA, e anche casi di FTD familiare. Nella popolazione normale la dimensione della ripetizione oscilla tra le 3 e le 40 unità, mentre nei pazienti vi è un aumento delle unità presenti che sono sicuramente superiori a 60.

Purtroppo non è ancora possibile attuare una stima precisa delle unità ripetute presenti nei pazienti, poiché il metodo di analisi attualmente utilizzato, che si basa su una *repeat-primed PCR*, non riesce a discriminare la presenza di espansioni superiori a 60 ripetizioni. In uno dei primi due lavori pubblicati sull'argomento sono riportati anche i risultati ottenuti da un esperimento condotto [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011] con il metodo Southern blot, grazie al quale è stato possibile stimare in un numero limitato di portatori dell'espansione che il numero delle unità ripetute oscilla tra le 700 e le 1600 unità.

Ad oggi non è ancora chiaro se esiste un numero minimo critico di ripetizioni che possa determinare l'insorgenza della malattia o se ci sia un

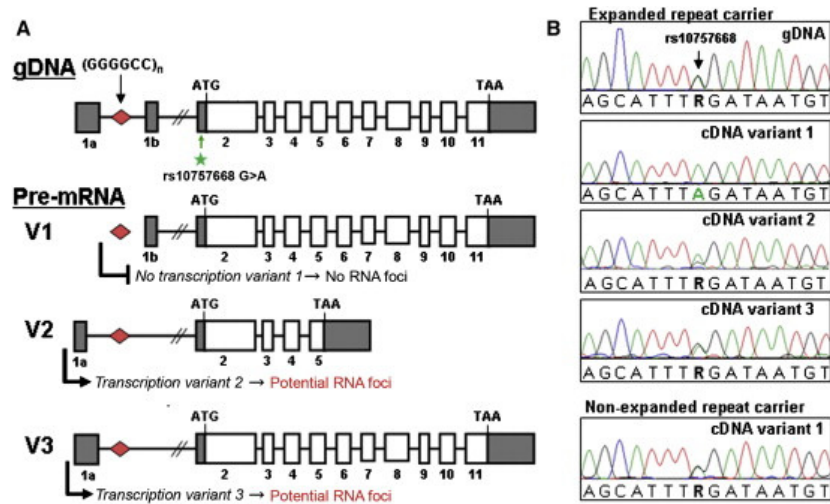
qualche fenomeno di anticipazione nell'età d'insorgenza, dovuto all'aumento delle ripetizioni nella progenie.

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

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

E' noto che, attraverso complicati processi di splicing alternativo, a partire dalla sequenza genica d'interesse, vengono prodotte tre trascritti differenti (Figura 1), che possono portare alla sintesi di due isoforme proteiche non ancora caratterizzate.

Figura 1: struttura del locus genico *C9orf72* e le possibili varianti di pre-mRNA che si possono generare per splicing alternativo.



E' stato descritto che le varianti V1 e V3 dei trascritti codificano per una proteina di 481 aminoacidi, poiché viene tradotta la regione compresa tra l'esone 2 e l'esone 11, generando l'isoforma proteica A. La variante V2 invece codifica per un'isoforma proteica B composta da 222 aminoacidi, poiché viene tradotta solo la regione compresa tra l'esone 2 e l'esone 5. L'analisi in RT-PCR ha dimostrato che tutte le isoforme trascrizionali di *C9orf72* sono presenti in una varietà di tessuti e l'analisi immunohistochimica su preparati istologici cerebrali, ha evidenziato la loro presenza anche nel citoplasma dei neuroni.

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

Il meccanismo attraverso il quale questa ripetizione determina il fenotipo FTD-MND, sembra essere associato ad un'interferenza con i normali processi di espressione della proteina *C9orf72*, ossia in modo trascrizionale-specifico. Mediante analisi quantitativa degli mRNA è stato verificato che nell'allele mutato, l'espansione delle ripetizione, abolisce

l'espressione della variante V1, portando così anche a una drastica diminuzione dei livelli proteici dell'isoforma A, i cui effetti sono però ancora da determinare. Alle proteine *C9orf72* infatti, oltre che non essere state ancora caratterizzate, non è stata attribuita nemmeno una funzione nota. Quel che è certo è che si tratta di proteine altamente conservate in diverse specie [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011].

Foci neurotossici costituiti dalle varianti descritte, sono state individuate con anticorpi commerciali, nel 25% dei nuclei di cellule nervose sia della regione corticale frontale sia nel midollo spinale, appartenenti a pazienti portatori dell'espansione. Al contrario lo stesso segnale è stato rilevato solo nell'1% di cellule ottenute da pazienti non portatori. Per queste ragioni è stata ipotizzata anche un effetto dell'espansione nel promuovere l'aggregazione degli mRNA. È doveroso sottolineare che poiché non esiste ancora una buona conoscenza della struttura molecolare della proteina, nelle analisi svolte sono stati utilizzati anticorpi non ancora altamente specifici. I risultati fin qui raggiunti, permettono l'inserimento dei casi di FTD-MND alla sempre crescente classe di malattie, associate all'espansione di ripetizioni non codificanti, come la Distrofia miotonica (DM1 e DM2), la Sindrome dell'X-fragile associata a tremori ed atassia (FXTAS) e a molte sindromi di atassia cerebrospinali (SCA8, SCA10, SCA31, SCA36) [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011]. Tutte queste patologie sono accomunate da un medesimo meccanismo patologico secondo cui: la mutazione presente negli mRNA determina un loro accumulo in foci a livello nel nucleo e/o del citoplasma delle cellule interessate. Tali depositi a loro volta, sequestrano varie RNA-binding proteins, portando così ad una disregolazione dei normali processi di splicing alternativo.

Dal punto di vista clinico i portatori dell'espansione patologica in *C9orf72* presentano una grandissima variabilità fenotipica che comprende pazienti affetti da FTLD, SLA o FTLD-SLA. Con una frequenza di circa il 30% nei

pazienti FTLD-SLA questa mutazione è sicuramente l'unico difetto genico comune a due patologie ad oggi conosciuto. Indipendentemente dalla presenza di SLA, il fenotipo clinico di FTLD maggiormente coinvolto è quello comportamentale, ma sono stati descritti anche casi di PPA.

Inoltre recentemente sono stati pubblicati lavori che hanno messo in evidenza l'esistenza di quadri atipici di presentazione, governati da sintomi psicotici (deliri megalomaniaci o mistici, aggressività seguita da stati ipomaniacali, allucinazioni visive) e disordini ossessivo-compulsivi in pazienti FTLD portatori dell'espansione esanucleotidica [Galimberti *et al.*, 2013; Arighi *et al.*, 2012]. La mutazione è stata descritta anche in famiglie con sindromi affettive bipolari [Meisler *et al.*, 2013].

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

Come in questi casi vi è però una grande variabilità nell'età d'insorgenza, anche tra individui della stessa famiglia. Come in tutte le malattie causate da un'espansione genica, l'età d'insorgenza diminuisce con il progredire delle generazioni; infatti nelle generazioni più giovani la malattia può insorgere fino a sette anni prima. La scoperta della mutazione di *C9orf72* nello 0.17% dei controlli, pari a 102.000 individui in Italia, ha posto un problema di sanità pubblica. Ci si chiede infatti se questi svilupperanno FTLD e/o SLA in futuro.

1.1.5.4 VCP-1

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

Ad oggi sono state riportate 18 mutazioni causali di malattia in 48 famiglie indipendenti (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>). È stato osservato

un fenomeno di penetranza incompleta per tutte e tre le manifestazioni cliniche interessate.

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

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

I pazienti con mutazioni in questo gene presentano anche inclusioni della proteina TDP-43 soprattutto in regioni neocorticali, comunque tali varianti patologiche sono molto rare; infatti sono state riscontrate in meno dell'1% dei casi familiari di FTLN, e più frequentemente nella bvFTD e nella SD.

1.1.5.5 CHMP2B

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

In letteratura solo 4 differenti mutazioni sono state riportate, tutte individuate tra o dentro gli esoni 5 e 6 e descritte in 5 famiglie totali (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>) [Sieben *et al.*, 2012].

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

Si ottengono così neuroni che presentano vacuoli enormi che impediscono

la fusione dell'endosoma con il lisosoma.

Dal punto di vista neuropatologico pazienti con queste mutazioni si presentano come FTLD-U ossia positivi per l'ubiquitina, ma negativi per le inclusioni TDP-43 [Holm *et al.*, 2007]. Clinicamente invece i pazienti presentano una diagnosi di bvFTD in cui si hanno cambiamenti della personalità molto precoci. Spesso è stata diagnosticata anche la presenza di afasia anche se non è mai stata fatta una diagnosi precisa di PNFA, SA o LPA. L'afasia è caratterizzata prevalentemente da una riduzione drastica dell'eloquio spontaneo che porta addirittura al mutismo. La media dell'età d'insorgenza nei pazienti affetti è di circa 58 anni con un range di età che va dai 45 ai 65 anni.

1.1.5.6 TARDBP

Inizialmente le mutazioni nel gene *TARDBP* sono state considerate diretta conseguenza degli aggregati della proteina TDP-43 presenti nei motoneuroni di pazienti affetti da SLA senza mutazioni nel gene *SOD-1* e in pazienti FTLD-U.

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

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

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

1.1.5.7 FUS

Inclusioni basofile (BIs) furono descritte per la prima volta nel 1941 in un

paziente affetto da SLA sporadica giovanile [Wohlfart *et al.*, 1941]. Successivamente, inclusioni simili furono riportate in pazienti non solo con SLA sporadica giovanile [Hilton *et al.*, 2001], ma anche con SLA sporadica ad esordio in età adulta, SLA familiare [Tsuchiya *et al.*, 2001], bvFTD o loro combinazioni [Yokota *et al.*, 2008]. La proteina patologica, costituente le inclusioni, rimase però per molti anni sconosciuta.

Inclusioni neuronali a filamenti intermedi (NIFIs) furono osservate in pazienti che si presentavano con precoci sintomi comportamentali, perciò affetti da bvFTD sporadica [Josephs *et al.*, 2003; Cairns *et al.*, 2004].

Nel 2009, il gene conosciuto come *fused in sarcoma* (FUS) fu identificato come gene causale di alcuni casi di SLA familiare [Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009]. Come TARDBP anche FUS è un membro della famiglia hnRNP; è localizzato sul cromosoma 16p11.2 e tale posizione fa di lui un eccellente gene candidato a spiegare il linkage genetico di questo cromosoma con numerose famiglie di pazienti affetti da SLA. Anche se FUS rappresenta un gene coinvolto nella patogenesi della SLA, dopo la sua scoperta, la presenza di inclusioni FUS-positive fu dimostrata in pazienti FTLD tau-negativi e TDP-43 negativi, con inclusioni basofile (BIs) [Neumann *et al.*, 2009] e inclusioni neuronali a filamenti intermedi (NIFIs) [Munoz *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2011]. Un'analisi mutazionale che ha riguardato 122 pazienti con FTLD ha portato all'identificazione di una nuova mutazione (p.Met254Val) in un paziente con diagnosi clinica di bvFTD tau-negativa e TDP-43 negativa. Di qui fu riconosciuto che la quasi totalità dei casi FTLD-U TDP-43 negativi, fosse caratterizzata da inclusioni immunoreattive per FUS [Neumann *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010]. FTLD-FUS include rare condizioni in cui FTLD coesiste con disfunzioni motorie piramidali e/o extrapiramidali.

1.1.5.8 CHCHD10

Recentemente una mutazione missenso (c.176C4T; p.Ser59Leu) nel gene *CHCHD10*, che codifica per una proteina coiled-coil helix a funzione ignota, è stata identificata tramite sequenziamento dell'intero esoma in due famiglie affette da FTD-SLA [Bannwarth *et al.*, 2014].

Il gene *CHCHD10* codifica per una proteina mitocondriale localizzata nello spazio intermembrana e sulle cristae interne mitocondriali.

Successivamente sono state individuate altre due mutazioni in eterozigosi del gene *CHCHD10*, c.44C4A (p.Arg15Leu) in due pazienti tedeschi e c.197C4A (p.Gly66Val) in un paziente finlandese [Muller *et al.*, 2014]. Alla luce di queste nuove promettenti scoperte è lecito dunque supporre che in alcuni casi familiari di FTD-SLA la causa genetica che contribuisce all'insorgenza e alla progressione della malattia sia da imputare a mutazione nel gene *CHCHD10*.

1.1.6 Fattori di rischio genetici e FTLD sporadica

A differenza di altre malattie neurodegenerative complesse, ad esempio l'AD, poco si conosce sui fattori di suscettibilità che potrebbero aumentare il rischio d'insorgenza della FTLD [Sieben *et al.*, 2012]. In questa malattia, infatti, è presente una forte componente ereditaria familiare e la maggior parte degli studi pubblicati ha avuto come obiettivo primario l'identificazione dei geni causali di malattia. Inoltre, l'elevata eterogeneità clinica della malattia non aiuta lo svolgimento di studi genetici su larga scala, i quali hanno necessità di disporre di una popolazione campione molto omogenea.

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

soggetti [Van Deerlin *et al.*, 2010]. *TMEM106b* è una proteina integrale di membrana di tipo 2, a funzione ancora ignota, localizzata nei lisosomi e negli endosomi tardivi. È stato osservato che *TMEM106b* potrebbe aumentare il rischio soprattutto in quei pazienti portatori di mutazioni in *GRN*, probabilmente modulando i livelli di secrezione di tale proteina [Finch *et al.*, 2011]. È interessante ricordare che *TMEM106b* è stato anche recentemente associato a declino cognitivo in alcuni casi di SLA.

Nel corso degli ultimi anni sono stati svolti moltissimi studi di associazione su geni candidati che hanno dimostrato la presenza di un'associazione genetica tra la FTLD e altri geni. Ad esempio in una serie di pazienti affetti da FTLD-U non portatori di mutazioni in *GRN* è stata localizzata una variante presente nel 3'UTR del gene, all'interno del sito di binding del miR-659; tale SNP, rs5848, ha dimostrato di essere il maggior fattore di rischio d'insorgenza della FTLD-U. In vivo i portatori omozigoti per l'allele T presentano una drastica riduzione dei livelli di *GRN*, suggerendo la presenza di un meccanismo patogenetico simile ai soggetti portatori di mutazioni [Rademakers *et al.*, 2008].

ApoE4 è il fattore di rischio meglio conosciuto nei casi di AD sporadico a tarda età d'insorgenza, ma esistono dati contrastanti anche riguardo a un suo possibile ruolo nell'insorgenza della FTLD. ApoE4 è il fattore di rischio meglio conosciuto nei casi di AD sporadico a tarda età d'insorgenza, ma esistono dati contrastanti riguardo al suo ruolo nell'insorgenza di FTLD. Numerosi studi hanno infatti suggerito un'associazione tra FTLD e ApoE4 [Bernardi *et al.*, 2006], ma altri autori non hanno confermato questi dati [Short *et al.*, 2005].

Questa diversità tra le informazioni riportate in letteratura, potrebbe essere spiegata grazie a una recente scoperta che mette in relazione la FTLD ed ApoE4 nei maschi, ma non nelle femmine. Tuttavia in tutti gli studi finora condotti, il rischio conferito dalla presenza dell'allele E4 nei soggetti affetti

da FTLD sembra essere più basso rispetto al rischio di sviluppare AD.

Per quanto riguarda il ruolo dell'allele ApoE2, Bernardi e collaboratori nel 2006 hanno mostrato un suo effetto protettivo verso la FTLD [Galimberti et al., 2010], mentre altri autori non hanno confermato questi dati.

Da quanto emerso in letteratura, altri possibili fattori di rischio per le FTLD sono stati individuati in alcuni polimorfismi presenti in *MAPT* [Anfossi et al., 2011], nel gene che codifica per la *NOS3* e in quello per la *NOS1* [Venturelli et al., 2009]. Al contrario è noto un polimorfismo nel gene *MCP-1* (Monocyte Chemoattractant-1 gene) che costituisce un fattore protettivo nei casi sporadici di FTLD [Galimberti et al., 2009]; la medesima osservazione per un polimorfismo nel gene *BAG1* [Venturelli et al., 2011].

1.1.7 Infiammazione e Neurodegenerazione

Le malattie neurodegenerative sono considerate disordini multifattoriali aventi un'importante componente genetica capace di influenzare la patogenesi e di contribuire all'ampia variabilità fenotipica. I geni coinvolti sono numerosi e mostrano un'intricata modalità di interazione reciproca, che non segue i classici modelli mendeliani, cui si aggiunge un'interazione con altre variabili non-genetiche. Per queste ragioni la genetica delle patologie neurodegenerative è stata definita complessa [Bertram et al., 2005].

È stato studiato un grande numero di geni candidati al fine di ricercare fattori di rischio per la loro insorgenza. Gli studi si sono concentrati su geni codificanti molecole infiammatorie, oppure coinvolti nella cascata ossidativa. Polimorfismi genetici a carico di molecole cruciali, infatti, quali citochine, chemochine o molecole prodotte nelle reazioni di stress ossidativo, potrebbero agire sia come fattori di suscettibilità, incrementando il rischio di sviluppare la patologia, sia come fattori di regolazione, modulando la severità del processo patogenetico o la capacità di risposta alle terapie. Il ruolo della neuro-infiammazione è stato, pertanto, rivalutato:

considerata in passato come un epifenomeno conseguente al danno neuronale, recenti studi hanno indicato come un'eccessiva o incontrollata risposta immunitaria abbia un ruolo determinante nell'insorgenza e nella progressione di diverse patologie, evidenziando un'azione centrale della glia nelle malattie neurodegenerative [Sailasuta *et al.*, 2011].

Il sistema immunitario è un network complesso di molecole, mediatori chimici e cellulari, con la funzione di proteggere l'organismo da insulti ambientali. Per neuro-infiammazione s'intende un processo infiammatorio "citochina-mediato", che coinvolge e determina l'attivazione di cellule immunitarie, cellule gliali e neuroni. Il suo inizio e la sua diffusione sembrano essere legati alla stretta interazione tra questi elementi cellulari. La neuro-infiammazione può essere provocata da un danno tissutale sistemico, ma più spesso è associata a danno diretto del SNC: qualunque modificazione patologica a carico del tessuto cerebrale si associa ad una pronta risposta gliale, che coinvolge sia la microglia che l'astroglia [Aloisi *et al.*, 1999].

Quando si parla di tessuto nervoso, anche il concetto di infiammazione va ridefinito e analizzato nello specifico. La maggior parte delle molecole infiammatorie infatti non sono in grado di superare la barriera ematoencefalica (BEE) e la loro presenza all'interno del tessuto nervoso implica che questo sia in grado di produrle: infatti, le proteine infiammatorie nel SNC sono prodotte principalmente dalla microglia e dalla astroglia attivate [Gonzalez-Scarano *et al.*, 1999]. 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 con i rispettivi recettori, i componenti della via della coagulazione ed una serie di proteasi e loro inibitori specifici. Le cellule microgliali sono le principali produttrici di fattori pro-infiammatori. Sono cellule di derivazione mieloide e risiedono nel SNC, che esercitano una

funzione di immunosorveglianza. Sono assimilabili alle cellule macrofagiche circolanti, sia per la funzione che esse rivestono, sia per l'origine monocitaria. Reagiscono prontamente ad insulti neurotossici di diversa natura, con evidente modificazione morfologica [Kreutzberg *et al.*, 1996]. L'attivazione microgliale è generalmente considerata un fenomeno deleterio per la cellula, a causa del rilascio di molecole citotossiche che generalmente l'accompagna, quali radicali liberi, ossido nitrico, proteasi e numerose citochine pro-infiammatorie. Questa risposta cellulare non ha, tuttavia, effetti necessariamente citotossici e, entro certi limiti, potrebbe determinare effetti neuroprotettivi, ad esempio attraverso il rilascio di fattori trofici e di citochine anti-infiammatorie quali le interleuchine 4 e 10 [Kerschensteiner *et al.*, 2003; Scharz et al., 2004].

La prima e principale patologia in cui è stato studiato il ruolo dell'infiammazione è stata l'AD e sulla scia di importanti evidenze scientifiche, il ruolo della neuro-infiammazione è stato studiato anche nell'ambito di altre patologie, tra cui la FTLD, in particolare nelle forme legate a mutazione del gene *GRN*.

Recenti studi, infatti, suggeriscono un ruolo centrale della Progranulina nella regolazione della produzione di citochine infiammatorie. E' stato dimostrato infatti che la presenza di mutazioni nel gene *GRN* in pazienti affetti da FTLD sintomatici determina a livello sierico l'alterazione del profilo della citochina pro-infiammatoria IL-6 [Bossù *et al.*, 2011]. Nel liquor di pazienti affetti da FTLD sporadica invece è stato evidenziato un aumento del livello di TNF- α e di TGF- β [Sjögren *et al.*, 2004]. In merito all'espressione delle chemochine non sono state riscontrate differenze nei livelli liquorali di CXCL-10 (IP-10), diversamente dai soggetti con AD; è probabile che i livelli aumentati di CXCL-10 osservati nei pazienti con AD, comparati con quelli affetti da FTLD, possano essere correlati al deposito di A β , deposto che tipicamente si osserva nell'AD e meno nell'FTLD

[Galimberti *et al.*, 2006]. I livelli liquorali di CCL-2 (MCP-1), al contrario, sono incrementati in pazienti FTLD rispetto ai controlli sani; un pattern simile è stato riscontrato per livelli di IL-8. Non sono state identificate, invece, differenze significative nella quota di chemochine tra i differenti sottotipi di malattia: bvFTD, PA e SD [Galimberti *et al.*, 2006]. Quest'aumento nei livelli di citochine e chemochine non è da correlare ad un'alterata funzione della BEE e nemmeno all'età o al genere. È stato proposto un ruolo protettivo da parte di CCL-2, dal momento che è coinvolto nella rigenerazione del tessuto neurale attraverso l'induzione di fattori neurotrofici come bFGF, da parte di astrociti e microglia [Kalehua *et al.*, 2004]. Analogamente, l'incremento di IL-8 potrebbe essere correlato all'attivazione di meccanismi di compenso e riparazione, data la sua capacità di promuovere la sopravvivenza neuronale [Araujo *et al.*, 1993]. Un effetto positivo potrebbe essere esteso anche a TNF- α : questa citochina, di cui è nota l'azione pro-infiammatoria e pro-apoptica, attiva la trascrizione di TGF- β [Tracey *et al.*, 1994], il quale agisce come fattore anti-infiammatorio inibendo la produzione di IL-1, IL-6 e TNF- α da parte della microglia [Suzumura *et al.*, 1993]. Perciò, nei pazienti con FTLD, l'incremento dei livelli di TNF- α potrebbe scatenare la produzione di TGF- β attraverso un meccanismo di feedback negativo, controbilanciando così la propria azione pro-infiammatoria (Sjögren *et al.*, 2004).

Si tratta di azioni tra loro contrastanti, che sottolineano la complessità delle interazioni cellulari all'interno del SNC. In presenza di un processo neurotossico in atto, infatti, l'insieme delle risposte gliali potrebbe esacerbare il danno o, al contrario, esercitare un effetto neuroprotettivo, a seconda dell'equilibrio che si viene a determinare tra le funzioni citoprotettive e gli effetti citotossici legati all'attivazione microgliale, dipendente, a sua volta, dall'entità e dalla durata dello stimolo lesivo [Hirsch *et al.*, 2003].

2. SCOPO DELLA RICERCA

Nel corso degli scorsi anni è stato dimostrato che esistono diversi geni responsabili di forme a trasmissione autosomica dominante di malattia. I due geni più frequentemente mutati sono *GRN*, che codifica per la proteina progranulina, che ha attività anti-infiammatoria, e *C9orf72*, il cui prodotto ha funzione ad oggi sconosciuta. Lo scopo di questo studio è stato di:

- determinare la frequenza delle mutazioni note (*MAPT*, *GRN* e *C9orf72*) nella popolazione italiana di pazienti diagnosticati con FTLD
- condurre un'analisi di espressione genica di molecole infiammatorie, quali citochine e chemochine, su cDNA estratto da cellule del sangue isolate da pazienti portatori sintomatici e asintomatici di mutazioni in *GRN*, portatori dell'espansione di *C9orf72*, casi sporadici e controlli sani al fine di valutare il coinvolgimento della neuro-infiammazione nella patogenesi della FTLD e, più nel dettaglio, al fine di analizzare il differente ruolo dell'attivazione immunitaria nelle forme di FTLD sporadiche comparate con quelle determinate dalle due mutazioni autosomiche dominanti più frequenti (*GRN* e *C9orf72*).
- analizzare i livelli proteici di citochine, chemochine e fattori di crescita nei sieri e nei liquor di pazienti portatori sintomatici e asintomatici di mutazioni in *GRN*, portatori dell'espansione di *C9orf72*, casi sporadici e controlli sani.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Arruolamento della popolazione oggetto dello studio

Sono stati inclusi nello studio 772 pazienti con diagnosi di FTLD, di cui 392 di sesso maschile e 380 di sesso femminile. I pazienti sono stati reclutati fra i soggetti afferenti a Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale.

I soggetti che presentavano disturbi psichiatrici all'esordio sono stati sottoposti a valutazione psichiatrica con somministrazione di scale secondo i criteri del DSM IV.

La diagnosi di FTLD è stata formulata in base ai criteri clinici internazionali in vigore al momento dell'inizio dello studio [Neary *et al.*, 1998; Rascovsky *et al.*, 2011; Mesulam *et al.*, 2001; Gorno-Tempini *et al.*, 2011], individuando quattro sindromi cliniche:

- bvFTD (n = 647);
- afasia progressiva non fluente (PNFA, n = 87);
- demenza semantica (SD, n = 38);

Ventisette pazienti con bvFTD ed uno con PNFA presentavano in concomitanza una malattia del motoneurone (MND).

Sono stati, inoltre, inclusi:

- 22 pazienti con sindrome corticobasale (CBS), di cui 7 di sesso maschile e 15 di sesso femminile, con età media di insorgenza della malattia di $63,4 \pm 7,4$ anni (intervallo 47-77 anni);
- 33 pazienti con paralisi sopranucleare progressiva (PSP), di cui 17 di sesso maschile e 16 di sesso femminile, con età media di insorgenza della malattia di $65,8 \pm 7,9$ anni (intervallo 52-86 anni).

Nello stesso periodo sono stati arruolati 222 controlli sani di pari età e

nesso, di cui 92 di sesso maschile e 130 di sesso femminile, con un'età media di $67,8 \pm 9,3$ anni (intervallo 51-89 anni). I controlli non erano affetti da disturbi neurologici o psichiatrici.

Sia i pazienti che i controlli erano di origine italiana continentale. È stato ottenuto consenso informato scritto dai pazienti e dai loro caregiver.

Tutti i dati relativi a pazienti e controlli sono riassunti nella Tabella 1.

	CTRL	bvFTD	PNFA	SD	FTD/MND	CBD	PSP
Numero dei Soggetti	222	647	87	38	24	22	33
Genere (M : F)	92:130					7:15	17:16
Età media d'esordio (anni \pm DS)		66,7 \pm 8,4	64,8 \pm 8,5	63,5 \pm 8	62 \pm 11,3	63,4 \pm 7,4	65,8 \pm 7,9
Intervallo di età	51-89	41-85	47-81	47-78	32-79	44-77	52-86

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti e dei controlli inclusi nello studio

Tutti i soggetti afferiti all'Unità Valutativa Alzheimer dell'Ospedale Maggiore, dell'Ospedale S. Raffaele (Milano), dell'Ospedale L. Sacco (Milano), dell'Azienda Regionale di Neurogenetica (Lamezia Terme, Catanzaro), della Casa di Cura Santa Maria (Castellanza, Varese) e dell'Università di Firenze, Torino, Roma e Padova, sono stati sottoposti ai seguenti accertamenti:

- dettagliata raccolta anamnestica;
- esame obiettivo generale e neurologico;
- esami emato-chimici di routine;
- batteria neuropsicologica, atta a valutare le capacità di memoria, linguaggio, attenzione, efficienza frontale, ragionamento logico-deduttivo, pianificazione visuo-spaziale e prassie;
- tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica (RM) cerebrale. Inoltre, quando possibile, i pazienti sono stati sottoposti a:
 - tomografia ad emissione di positroni con ^{18}F -fluorodesossiglucosio cerebrale (PET con ^{18}F FDG);
 - esame del liquido cerebrospinale (CSF), con determinazione dei livelli liquorali di proteine β Amiloide, Tau totale e Tau fosforilata;

3.2 Purificazione del DNA genomico da sangue intero

Il DNA è stato estratto a partire da un prelievo di sangue venoso di circa 6 ml, raccolto in provette contenenti EDTA. Prima dell'estrazione, i campioni sono stati congelati per diversi giorni ad una temperatura di -30°C , in modo da facilitare la lisi dei leucociti. In seguito, il DNA genomico è stato estratto impiegando il kit FlexiGene (Qiagen). Il protocollo, fornito dalla casa produttrice, prevede nel dettaglio i seguenti passaggi:

- Si pipetta il Buffer FG1 (buffer di lisi) in una falcon da 50 ml. Si aggiungono i 7 ml di sangue intero e si vortexano per miscelare il tutto.

- Si centrifuga per 30 minuti a 2500 rpm a 10°C . La centrifugazione permette la separazione delle proteine (ed anche altre macromolecole e strutture subcellulari) in base alle loro dimensioni e alla loro forma, sottoponendole ad alti campi gravitazionali all'interno di una provetta posta in un'ultracentrifuga.

- Dopo aver eliminato il sovrantante, si aggiunge il Buffer FG2 Protease (Buffer di denaturazione) e si vortexa immediatamente; si suddivide quindi il volume totale della miscela in eppendorf da 1,5 ml.

- Si incuba per 10 minuti a 65°C in bagnetto termico: il colore del campione vira da rosso a verde oliva, a indicare l'avvenuta digestione delle proteine.

- Si aggiunge l'isopropanolo 100%, si mescola finché il DNA precipita e diviene visibile in forma di grovigli o di un blocchetto.

- Si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm a temperatura ambiente.

- Si elimina il sovrantante.

- Si aggiunge l'etanolo 95 % e si vortexa per 5 secondi.

- Si centrifuga per 10 minuti a 10000 rpm a temperatura ambiente.

- Si elimina il sovrantante.

- Si lascia asciugare all'aria il pellet di DNA finché tutto il liquido sia evaporato.

- Si aggiunge il Buffer FG3 (buffer di idratazione), si vortexa per 5 secondi a bassa velocità e si risospende il DNA incubandolo per un'ora a 65°C in bagnetto termico.

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

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

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

Per sequenziare un frammento di DNA target dopo la sua amplificazione mediante reazione di PCR, l'approccio più utilizzato per la ricerca di mutazioni specifiche, è quello secondo il metodo di Sanger, il quale si basa sul processo di terminazione della catena neo-sintetizzata con i di-deossinucleotidi (ddNTP). I ddNTPs sono molecole molto simili a deossiribonucleotidi (dNTPs) ma mancano dell'ossidrile nel carbonio 3', per

cui possono essere incorporati in una catena di DNA durante la fase di sintesi, ma ad essi non possono essere legati altri dNTP. Se un “di-deossi” viene per caso incorporato nella catena nascente di DNA, l’ulteriore allungamento (generalmente per esterificazione dell’ossidrile 3’) viene bloccato e la reazione termina. Nella pratica vengono allestite contemporaneamente 4 reazioni in parallelo, ciascuna contenente una delle 4 basi sotto forma di di-deossi marcati con fluorofori, in concentrazione molto debole; la miscela di reazione comprende anche: il templato, la DNA polimerasi, i dNTP e un primer di sequenza che funge da innesco per la polimerasi. La polimerasi genera, a partire dal primer, un filamento complementare allo stampo, che si estende per una lunghezza indefinita a valle del primer. Se nel frammento amplificato viene inserito un ddNTP, la reazione di allungamento non può procedere e la sintesi si arresta. Dal momento che questo nucleotide è presente in una concentrazione molto bassa esso verrà incorporato molto raramente e in modo casuale. Statisticamente si otterranno così tanti frammenti abortivi quante sono le volte in cui le basi corrispondenti sono rappresentate nel pezzo di DNA in questione.

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

- un sistema di 4 capillari, entro i quali un particolare polimero funziona da matrice per la separazione elettroforetica di singoli frammenti;
- di un laser che eccita continuamente e per tutta la lunghezza del capillare i vari cromofori legati ai prodotti di PCR;
- una camera CCD (charge-coupled device) che registra i segnali di emissione;
- un fotomoltiplicatore che converte i segnali luminosi in segnali elettrici

(digitali);

- un pacchetto di software che opera la raccolta, il processamento, l'estrazione e la conversione in elettroferogramma. Il dato in uscita è quindi rappresentato da una serie di picchi ciascuno dei quali corrisponde ad un frammento di lunghezza diversa.

Dal punto di vista pratico il protocollo prevede un primo passaggio di lavoro in cui avviene l'amplificazione del DNA genomico d'interesse, isolato da sangue periferico. Per il gene *GRN* le regioni codificanti dall'esone 1 all'esone 12, le regioni introniche adiacenti, l'esone 0 e la parte non codificante della regione non tradotta del 3'UTR sono state amplificate utilizzando primer specifici descritti in lavori precedenti [Gass *et al.*, 2006]. Le sequenze dell'esone 1 e dal 9 al 13 del gene *MAPT* invece sono amplificate attraverso l'utilizzo di specifici primer, come descritto in precedenti lavori [Rizzu *et al.*, 1999]. 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 H₂O, 0.2 µl di Taq polimerasi e 2.5 µl di primer specifici per l'esone di ciascun gene (forward e reverse) per un totale di 50 µl. Le reazioni di amplificazione vengono condotte utilizzando il protocollo di PCR touchdown. Questo protocollo di PCR prevede la denaturazione del doppio filamento di DNA a 94°C per 5 minuti e la ripetizione di 35 cicli di reazione, divisi in due parti. La prima parte viene ripetuta per 10 cicli ciascuno composta da: 30 secondi a 94°, 30 secondi a 50°-60° e 40 secondi a 72°C. La seconda parte della reazione consiste nella ripetizione di 25 cicli ciascuno composto da: 30 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C, 40 secondi a 72°C e infine 10 minuti a 72°C. Il protocollo di PCR touchdown costituisce un modo per aumentare la specificità della reazione di amplificazione. La maggior parte dei termociclatori può essere programmata per effettuare cicli in cui la temperatura di appaiamento venga abbassata progressivamente durante le varie fasi della PCR.

Mantenendo inizialmente molto alta la stringenza dell'ibridazione (per le alte temperature di appaiamento), si scoraggia la formazione di aspecifici, consentendo alla sequenza desiderata di predominare poiché man mano che si abbassano le temperature come previsto dal protocollo termico scelto, viene amplificato massivamente ciò che si è legato al primer. Contemporaneamente tali condizioni favoriscono il fatto che diverse regioni, che potrebbero avere diverse temperature ottimali di annealing dei primer, possano essere amplificate tutte nella stessa analisi.

I frammenti amplificati vengono poi purificati impiegando il kit ExoSAP-IT (usb, USA) secondo le specifiche indicate dal produttore e successivamente viene allestita la reazione di terminazione che impiega il kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (kit Applied Biosystem, Warrington, UK). In dettaglio la miscela di reazione viene preparata aggiungendo 3 µl di Buffer, 0.8 µl di Big Dye Terminator v 3.1, 1 µl di ciascun primer e 9.4 µl di H₂O per un volume totale di 13,2 µl. Il protocollo di reazione di PCR prevede la ripetizione di 25 cicli, ciascuno dei quali 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 30 minuti a 3000 rpm dopo aver lasciato il tempo al sodio acetato di agire. Infine per la fase di lavaggio sono stati aggiunti 150 µl di etanolo a ciascun campione che vengono eliminati subito. Dopo l'aggiunta di formamide i campioni vengono caricati nel sequenziatore (ABI PRISM 3130 gene analyzer, Applied Biosystems), per l'analisi genica. Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il software SeqScape versione 2.5 (Applied Biosystems).

3.4 Genotipizzazione delle ripetizioni esanucleotidiche in C9orf72

Per fornire una valutazione qualitativa sulla presenza o meno di un'estesa

regione espansa ripetuta (GGGGCC) in *C9orf72*, abbiamo eseguito una reazione di PCR, secondo il protocollo descritto in precedenza [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Hantash *et al.*, 2010]. I primer utilizzati sono:

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

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

Buffer (Mg^{2+})= 2.5 μ L

GC-Rich= 5 μ L

Mix oligo: A,T e C= 2.5 μ L

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

Primer (20pM)= 2.5 μ L

DMSO= 1 μ L

Taq polimerasi= 0.2 μ L

DNA (concentrazione madre)= 1.5 μ L

H₂O= 7.3 μ L

I prodotti ottenuti sono stati separati su gel di agarosio al 3.5%. Le bande visualizzate vengono interpretate come segue:

- se si ottengono 2 bande, il paziente è ritenuto verosimilmente sano, contiene cioè due alleli con un numero limitato di espansioni (non superiori a 30 ripetizioni) su entrambi gli alleli;
- se si acquisisce un'unica banda, è possibile che entrambi gli alleli abbiano lo stesso numero di ripetizioni oppure un allele sia wild-type, mentre l'altro sia costituito da un numero di ripetizioni talmente ampio da non essere neppure amplificato durante la PCR di prescreening e quindi conseguentemente non visualizzato su gel. In altre parole è possibile che il campione in analisi presenti una quantità patologica di espansioni; in tali

circostanze, si sceglie perciò di procedere con il sequenziamento [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011].

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

Questa metodica prevede l'amplificazione dell'espansione *GGGGCC*, mediante l'utilizzo di una miscela di tre primer, secondo quanto descritto in precedenti studi [Warner *et al.*, 1996]:

- ✓ P1, primer forward marcato in 5' con un fluoroforo (FAM), di 41pb;
- ✓ P2 e P3, entrambi primer reverse, rispettivamente di 54pb e 18pb.

P2 e P3 condividono una coda in 5' la cui sequenza viene definita di ancoraggio, poiché non complementare all'espansione. In più P2 dispone alla sua estremità 3' di una sequenza ripetuta per 4 volte, complementare all'espansione in studio [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011]. Questo ha l'effetto di favorire il suo legame a siti di ripetizione interni alla regione genomica considerata. Nella miscela di reazione P2 è in concentrazioni limitanti rispetto a P3 (1:10 molare); per cui durante i primi cicli di amplificazione tutto il primer P2 presente, tenderà a legarsi stocasticamente in siti espansi multipli e potenzialmente differenti, presenti nella regione d'interesse. Viene perciò generata una miscela di ampliconi con lunghezze differenti, successivamente rilevabili per la presenza della fluorescenza emessa da P1. Il fatto che P2 si esaurisca velocemente nei primi cicli di PCR, permette che nei cicli successivi non vengano amplificati frammenti più corti rispetto a quelli realmente presentati dal paziente in analisi. Dopo le prime fasi di PCR interviene perciò solo l'attività di P3, che grazie alla sua sequenza tende a legarsi all'estremità 3' degli ampliconi precedentemente ottenuti. Inoltre, per favorire le fasi di allungamento dei frammenti (che possono essere potenzialmente molto grandi) viene

utilizzato un profilo termico capace di favorire la fase di estensione del primer.

La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 μL , così costituita:

Buffer (Mg^{2+})= 2.5 μL

GC-Rich= 5 μL

Mix oligo: A,T e C= 2.5 μL

7-Deaza-2-desossi GTP (2.5 mM)= 2.5 μL

Primer mix= 2.5 μL

Taq Fast Start= 0.2 μL

DNA (concentrazione madre)= 1.5 μL

H_2O = 8.3 μL

Successivamente gli ampliconi ottenuti vengono sottoposti all'analisi dei frammenti. Tale analisi viene effettuata mediante l'utilizzo del sequenziatore (ABI PRISM 3130 gene analyzer, Applied Biosystems) e i dati ottenuti analizzati tramite il software Peak Scanner (ABI). In presenza di un elevato numero di espansioni esanucleotidiche, si ottiene un profilo tipico definito a "dente di sega", dove sono evidenziati i frammenti caratterizzati in ordinata dall'intensità del loro segnale fluorescente ed in ascissa dalla loro lunghezza in bp. I frammenti si ripetono con una periodicità di 6 bps. E' doveroso sottolineare comunque, che la metodologia descritta non è abbastanza sensibile da discriminare più di 60 ripetizioni. Poiché la soglia di patogenicità è stata fissata a 40 ripetizioni (ma ve ne possono essere fino a 1700), il limite metodologico consente allo sperimentatore solo di poter discriminare tra pazienti sani e pazienti portatori di un numero patologico di ripetizioni (Figure 2a e 2b).

Figura 2a: *Analisi dei frammenti ottenuta da un paziente con un numero patologico di unità ripetute in C9orf72 che presenta il tipico profilo a “dente di sega”.*

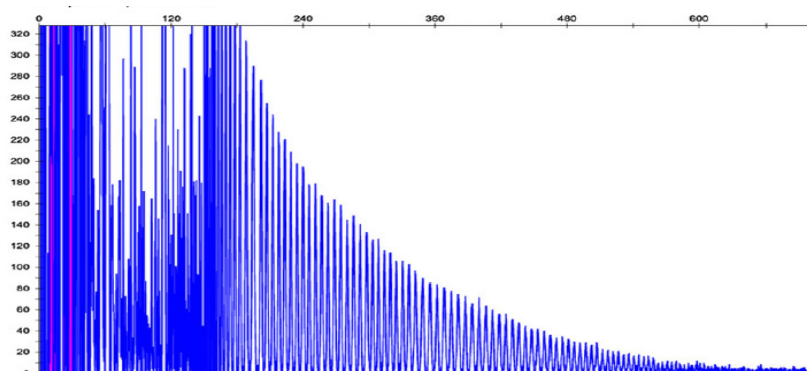
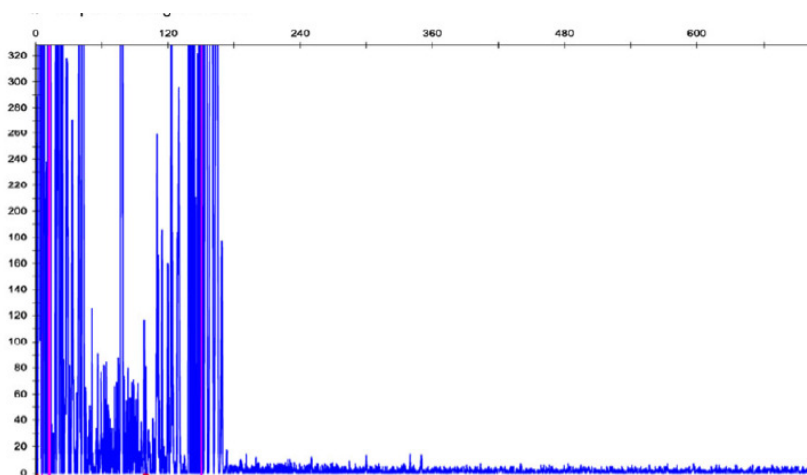


Figura 2b: *Analisi dei frammenti ottenuta da un paziente privo di un'espansione patologica in C9orf72.*



3.6 Analisi del livello di espressione genica di citochine e chemochine

3.6.1 Estrazione e quantificazione dell'RNA totale da cellule periferiche

Per lo studio sono stati prelevati 14 ml di sangue intero in specifiche provette contenenti Ficoll (uno dei principali reagenti per la preparazione di cellule mononucleate da sangue periferico) da ciascuno dei soggetti reclutati e controlli sani. In particolare, dopo una centrifugazione iniziale e due successivi lavaggi in PBS 1% (tampono fosfato salino), le cellule mononucleate del circolo periferico (PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells) isolate sono state conservate in Trizol (soluzione di lisi, Invitrogen) a -80°C. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule PBMC tramite l'utilizzo di cloroformio e successivi passaggi di precipitazione con isopropanolo ed etanolo. La quantità di RNA totale estratto per ogni campione è stata determinata misurando la densità ottica con uno spettrofotometro Nanodrop alla lunghezza d'onda λ di 260 nm, mentre per valutare la purezza dell'RNA si rileva la densità ottica alle lunghezze d'onda λ 260 e 280 e solamente campioni con un punteggio OD 260/280 compreso tra 1.8 e 2 sono stati selezionati per ulteriori esperimenti.

3.6.2 Analisi del livello di espressione di citochine e chemochine tramite RT² Profiler PCR Array

Gli Array RT² Profiler (SABioscience) permettono di analizzare l'espressione di 84 geni coinvolti nel pathway di citochine (Tabella 2) o chemochine con relativi recettori (Tabella 3); contengono inoltre un controllo per le contaminazioni da DNA genomico, 3 pozzetti per il controllo della reazione di retrotrascrizione e 3 controlli positivi per la reazione di PCR. L'RNA totale estratto da cellule mononucleate da sangue periferico viene retrotrascritto, come da indicazioni fornite nel protocollo del kit.

Successivamente, al cDNA ottenuto viene aggiunta la SYBR Green Mastermix e si distribuisce la mix di reazione nella piastra contenente in ciascun pozzetto i primer necessari all'amplificazione di un gene specifico; l'array viene quindi sottoposto a reazione di Real Time PCR per mezzo dello strumento ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems).

Tabella 2: Configurazione dell'array che permette di valutare il profilo di espressione genica delle citochine più comuni.

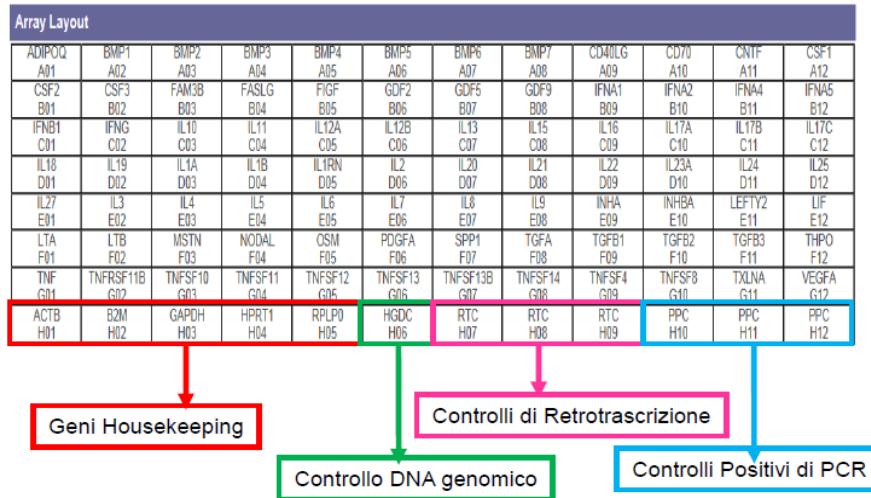
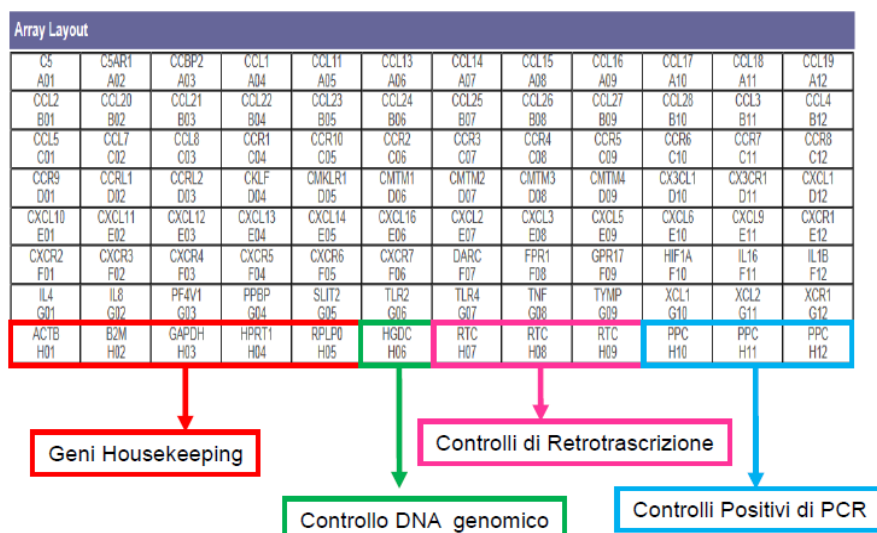


Tabella 3: Configurazione dell'array che permette di valutare il profilo di espressione genica delle chemochine e recettori.



3.6.3 Analisi Statistica dei dati ottenuti tramite kit RT² Profiler PCR Array

Il software RT² Profiler PCR Array Data Analysis versione 3.5 (SABioscience) è basato sul metodo $\Delta\Delta C_t$ e prevede la normalizzazione dei dati utilizzando cinque geni housekeeping. I P-values relativi ai dati di espressione ottenuti sono stati calcolati tramite il Test t di Student dei valori $2^{(-\Delta C_t)}$.

I risultati sono indicati con il parametro Fold-Regulation [$2^{(-\Delta\Delta C_t)}$], ricavato dal rapporto tra l'espressione genica normalizzata [$2^{(-\Delta C_t)}$] del campione in studio e quella del controllo.

3.7 Analisi del livello proteico di citochine e chemochine mediante Bio-plex Pro Assay

Gli array Bio-Plex Pro Human Cytokine, Chemokine, and Growth Factor (Biorad) consentono di analizzare l'espressione proteica di 27 citochine e

chemochine nel siero e nel liquido cerebro-spinale di pazienti e relativi controlli; il principio su cui si basano è del tutto analogo a quello dei sandwich ELISA. In ogni pozzetto delle piastre vi sono delle biglie magnetiche a cui sono legati gli anticorpi che permettono il riconoscimento dei diversi biomarcatori di interesse. Dopo aver effettuato alcuni lavaggi per rimuovere le proteine aspecifiche, un secondo anticorpo biotinilato viene aggiunto e questo verrà successivamente riconosciuto mediante l'utilizzo di straptavidina coniugata ad un reporter fluorescente, la ficoeritrina. Per eseguire l'acquisizione dei dati l'array viene posto nello strumento Bio-Plex 200 reader (Biorad), provvisto di due laser: quello rosso ($\lambda=635$ nm) consente la classificazione delle biglie mentre quello verde ($\lambda=532$ nm) eccita il reporter che emette un segnale rilevato da un tubo fotomoltiplicatore. Il software Bio-Plex Manager 6.1 permette, una volta completata la fase di acquisizione dati, di visualizzare i valori ottenuti sia come Intensità di Fluorescenza Media (MFI) che come concentrazioni (pg/ml).

3.7.1 Analisi Statistica dei dati ottenuti mediante Bio-plex Pro Assay

Il software GraphPad Prism 6 è stato utilizzato per compiere l'analisi statistica dei dati ottenuti tramite saggio Bio-plex. Per comparare i livelli di analiti tra diversi gruppi di pazienti e controlli il software si è servito del test ANOVA ad una via oppure se i dati non erano distribuiti normalmente è stato impiegato il Kruskal-Wallis test. Valori di p-value minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. Per confrontare invece i livelli proteici tra due gruppi è stato utilizzato il t-test non parametrico. Infine, per effettuare le correlazioni tra livelli di molecole infiammatorie ed età, è stata utilizzata la correlazione non parametrica di Spearman. In questo caso, il software fornisce sia il p-value che un coefficiente di correlazione chiamato $Rho(\rho)$.

4. RISULTATI

4.1 Screening di mutazioni autosomiche dominati

La coorte di pazienti reclutata consta di 772 pazienti con FTLD, 33 con PSP, 22 con CBS, e 222 controlli. In prima istanza si è cercato di individuare la presenza di eventuali mutazioni geniche note, che cadono nei geni tipicamente coinvolti nella FTLD. A causa della grande variabilità genetica e fenotipica associata alle forme familiari di questa malattia si è resa necessaria un'attenta analisi, infatti come risulta evidente in letteratura, diversi sono i geni candidati causali di malattia, come *MAPT* e *GRN* e di recente scoperta anche l'espansione esanucleotidica in *C9orf72*. Inoltre, il fenotipo clinico è estremamente eterogeneo, così come l'età d'esordio (40-80 anni).

4.2 Frequenza di mutazioni nel gene *GRN*

Ad oggi sono stati analizzati 397 pazienti per *GRN* e diverse mutazioni patogenetiche sono state identificate in 20 pazienti FTLD (5.3%), di cui 11 maschi e 9 femmine, mentre non è stata riscontrata in nessun paziente CBD o PSP, né in alcun soggetto non demente. In particolare, le mutazioni identificate sono le seguenti:

- ✓ Thr272fs (g1977_1980delCACT), n=11
- ✓ Asp22fs (g.63_64insC), n=5
- ✓ Cys157fs (g.1283_1289delCTGCTGT), n=2
- ✓ Cys149fs (g. 1159_1160TG), n=2

Per quanto riportato in letteratura, quest'ultima risulta essere una nuova mutazione a livello dell'esone 5 del gene *GRN*, la quale comporta una delezione di due nucleotidi TG a livello del codone 149 (p.Cys149fs).

4.3 Frequenza di mutazioni nel gene MAPT

Il gene *MAPT* ha penetranza completa entro i 60 anni, perciò l'analisi è stata compiuta solo su soggetti giovani e con familiarità positiva per demenza ed un solo soggetto su 111 (0,9%) è risultato portatore di una nuova mutazione, Gly304Ser (g123789 G>A). Questa è la prima descrizione di tale mutazione missenso, la quale comporta una sostituzione aminoacidica da Gly (*GGC*) a Ser (*AGC*) a livello del codone 304 (p.Gly304Ser). Tale codone è localizzato in un dominio di legame ai microtubuli.

4.4 Frequenza dell'espansione esanucleotidica nel gene C9orf72

L'espansione esanucleotidica in *C9orf72* è stata ricercata in 772 campioni di pazienti con FTLD, ed è stata rilevata in 46 pazienti (6,6%), di cui 23 maschi e 23 femmine, mentre non è stata riscontrata in nessun paziente con CBD o PSP, né in alcun controllo sano.

4.5 Confronto dei fenotipi clinici dei portatori delle mutazioni in GRN e dei portatori dell'espansione in C9orf72 rispetto ai non portatori

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra portatori della mutazione in *GRN*, portatori dell'espansione in *C9orf72* e non portatori per quanto riguarda l'età media di insorgenza dei sintomi (rispettivamente $60,1 \pm 8,1$ anni, intervallo: 47-69 e $63,1 \pm 8,4$ anni, intervallo: 45-77, rispettivamente, vs $66,3 \pm 8,6$, intervallo 32-85, $P > 0,05$), né per quanto riguarda la distribuzione di genere ($P > 0,05$).

Le diagnosi cliniche dei portatori della mutazione in *GRN* includevano:

- 15 pazienti con bvFTD (3,8% dei casi totali di bvFTD), di cui nessuno con

bvFTD/MND;

- 1 paziente con SD (0,4% dei casi di SD);
- 4 pazienti con PNFA (1.1% dei casi di PNFA).

Le diagnosi cliniche dei portatori dell'espansione in *C9orf72* includevano:

- 44 pazienti con bvFTD (6,3% dei casi totali di bvFTD) di cui 6 con bvFTD/MND (13,6% dei casi di bvFTD/MND);
- 2 pazienti con SD (0,3% dei casi di SD);
- nessuno dei pazienti con PNFA.

Per quanto concerne l'espansione in *C9orf72*, abbiamo osservato che:

- Le manifestazioni psicotiche (allucinazioni visive e uditive, deliri mistici e megalomaniaci) erano più frequenti nei portatori rispetto ai non portatori (30.3% vs 8.1%, $P=0.029$).
- L'esordio con deficit mnesico si riscontrava più frequentemente in portatori rispetto a non portatori (45.4% vs 13.5%, $P=0.0039$).
- Il parkinsonismo, assente nei non portatori, è stato osservato in quattro portatori: in due di essi aveva rappresentato il sintomo d'esordio, mentre negli altri due si era manifestato dopo i disturbi comportamentali o psicotici.

Da questi dati si evince che le mutazioni in *GRN* e *C9orf72* rappresentano una causa frequente di FTLD a trasmissione autosomica dominante, spesso con esordio con sintomi atipici (deficit di memoria, psicosi, parkinsonismo) ed eterogenee in termini di età di esordio.

Per quanto riguarda *GRN*, oltre alle mutazioni note già identificate in precedenza (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>), legate ad un meccanismo di aploinsufficienza, abbiamo identificato una nuova variante,

che consiste nella delezione di due paia di basi (TG) in posizione 1159_1160, in due famiglie entrambe originarie dell'Italia settentrionale.

I livelli plasmatici di progranulina, valutati con kit ELISA (Adipogene, Korea) erano indosabili (inferiori alla sensibilità del metodo, pari a 15 ng/ml), suggerendo la presenza di una mutazione legata al meccanismo di aploinsufficienza.

Per confermare questa ipotesi, il gene *GRN* è stato sequenziato, portando all'identificazione di una nuova mutazione nell'esone 5: g.1159_1160delTG, che induce il fenomeno di frameshift a livello di lettura dei codoni (c.445_446delTG), che porta alla generazione di un codone di stop che risulta in una proteina tronca (p.Cys149fsX10). La stessa mutazione non si ritrova nel cDNA isolato da cellule del sangue periferico, a conferma che l'mRNA aberrante viene degradato col meccanismo noto col nome di nonsense-mediated decay (NMD), che rappresenta un meccanismo cellulare di sorveglianza dell'mRNA che assolve la funzione di scoprire mutazioni nonsense e prevenire l'espressione di proteine tronche o aberranti.

Nelle figure 3a e 3b che seguono vengono messe a confronto le sequenze geniche del paziente portatore della delezione g.1159_1160delTG e di un paziente sano.

Figura 3a: Immagine elettroferografica della sequenza con la delezione g.1159_1160TG

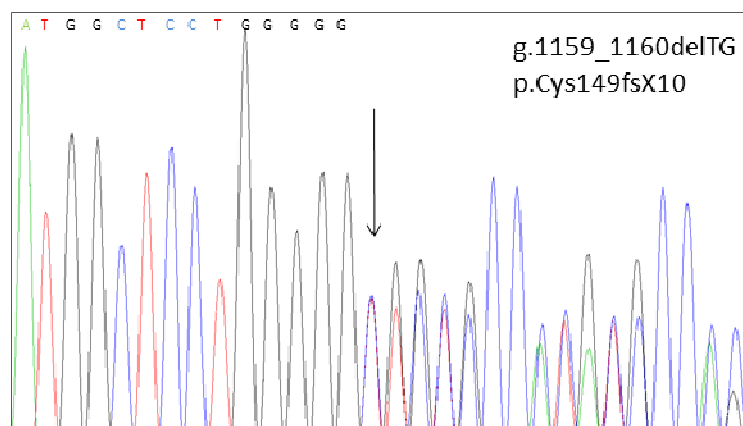
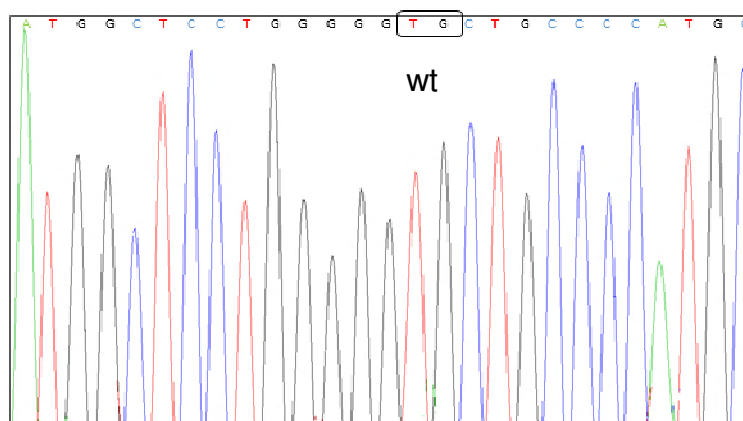


Figura 3b: Immagine elettroferografica della sequenza wild-type da cDNA.



4.6 Analisi del livello di espressione di molecole infiammatorie

Con l'intento di eseguire una misura simultanea dell'espressione genica di 84 delle più comuni citochine e chemochine su campioni di cDNA ottenuto da cellule periferiche di soggetti affetti da malattia e di confrontare i livelli esaminati con quelli di soggetti sani, abbiamo utilizzato due piastre della Sabioscience. Questi array applicati alla metodica SYBR Green-based Real-Time PCR, consentono di analizzare l'espressione del pannello prescelto di geni, in questo caso codificanti per molecole infiammatorie coinvolte in diversi pathway. Con il primo array infatti sono stati analizzati i geni codificanti per le citochine, mentre con il secondo sono stati valutati i geni codificanti chemochine e recettori.

I risultati vengono descritti tramite grafici detti "heat-map": le aree del pannello di colore verde, nelle sue diverse intensità, indicano la presenza di una ridotta produzione dell'mRNA; al contrario, quelle di colore rosso invece indicano una up-regolazione dell'espressione del gene analizzato.

Le popolazioni poste a confronto sono quattro: 6 portatori della mutazione in *GRN* (di cui 3 sintomatici e 3 asintomatici), 3 portatori dell'espansione di *C9orf72*, 3 pazienti affetti da FTLD sporadica e 3 controlli sani.

4.6.1 Profilo di espressione delle citochine

L'analisi dei dati ottenuti ha evidenziato innanzitutto una generale up-regolazione nei livelli di espressione delle citochine in soggetti affetti da FTLD sporadica confrontati con i controlli sani (Pannello 1). In particolare, le citochine che subiscono una up-regolazione più marcata e statisticamente significativa sono risultate essere Interleukin-5 (IL-5), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) e Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Tabella 4).

Pannello 1 – FTLD sporadica vs Controlli

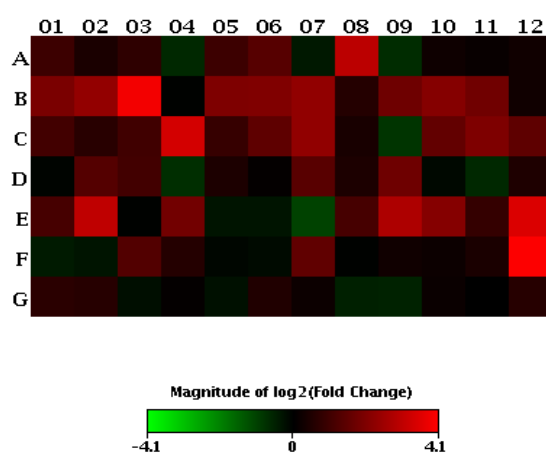
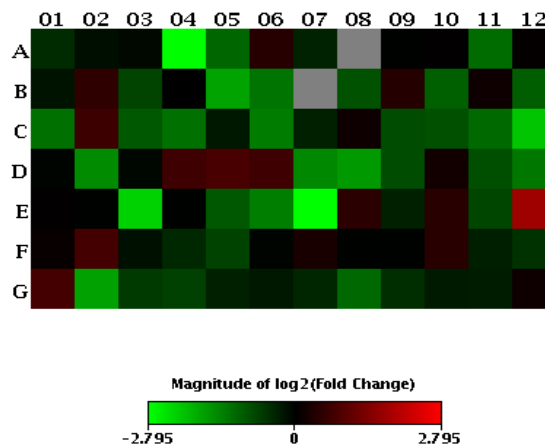


Tabella 4 - FTLD sporadica vs Controlli

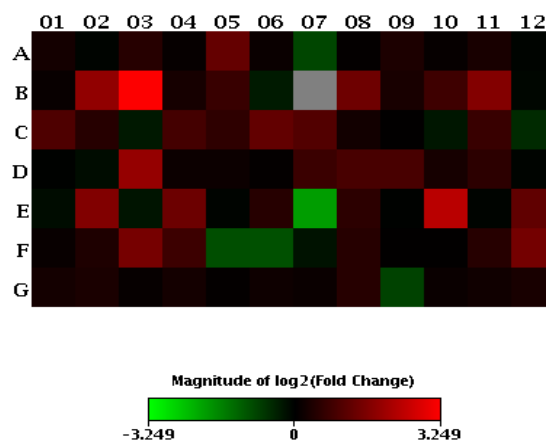
Gene	Fold-Regulation	P-value
IL-5	3,59	0,016
VEGFA	1,52	0,039
LIF	11,5	0,297

In antitesi rispetto ai precedenti risultati, in soggetti sintomatici portatori di mutazione del gene *GRN* è stato osservato un pattern di generale down-regolazione rispetto ai controlli sani (Pannello 2). In particolare, i livelli di espressione di IL-4 hanno mostrato una diminuzione significativa (Tabella 5). Il profilo di queste molecole in soggetti portatori dell'espansione esanucleotidica in *C9orf72*, rispetto ai controlli sani, appare invece contrassegnato da una certa eterogeneità: sussistono, cioè, differenze fra le varie citochine alcune delle quali risultano up-regolate, altre down-regolate (Pannello 3). In entrambi i gruppi di portatori di mutazioni (*GRN* e *C9orf72*) si è osservata una diminuita espressione di IL-4 (Tabella 5 e 6).

Pannello 2 e Tabella 5 – Portatori sintomatici *GRN* vs Controlli



Gene	Fold-Regulation	P-value
IL-4	-4,94	0,004
TNF	1,68	0,047
LIF	3,37	0,149

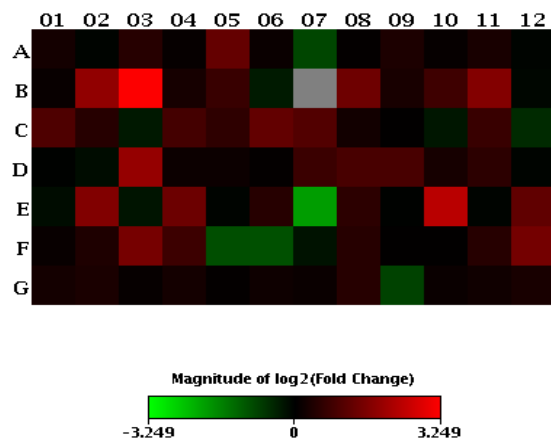
Pannello 3 e Tabella 6 – Portatori *C9orf72* vs Controlli

Gene	Fold-Regulation	P-value
IL-4	-2,55	0,023
TNFSF4	-2,32	0,006
LIF	7,44	0,309

Infine, sono stati confrontati i livelli di espressione delle citochine in soggetti portatori di mutazione del gene *GRN* asintomatici rispetto ai controlli sani, evidenziando in essi una alterazione così lieve da non esser considerata statisticamente significativa (Pannello 4 e Tabella 7).

Le differenze così emerse rivestono grande importanza, in quanto potrebbero suggerire l'implicazione di differenti pathways infiammatori nella patogenesi della FTLD nei soggetti portatori di mutazione rispetto ai casi sporadici di malattia.

Pannello 4 e Tabella 7 – Portatori asintomatici GRN vs Controlli



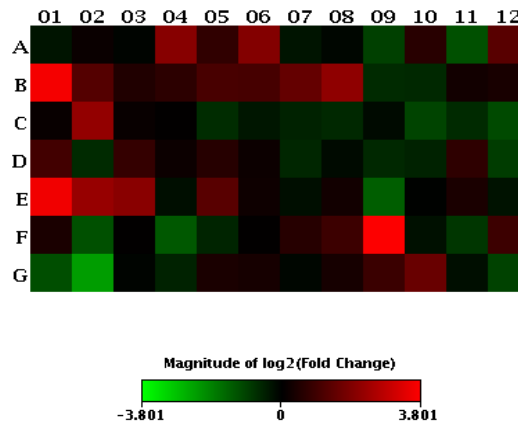
Gene	Fold-Regulation	P-value
IL1A	3,75	0,098
LIF	2,32	0,432

4.6.2 Profilo di espressione di chemochine e recettori

Analogamente, è stato utilizzato un secondo array per la valutazione dei livelli di espressione delle chemochine e relativi recettori.

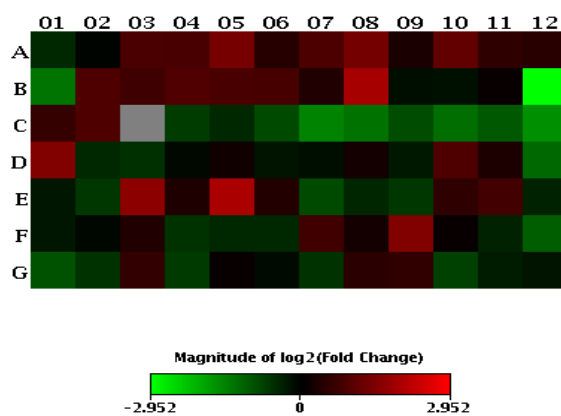
Nei portatori dell'espansione nel gene *C9orf72*, l'analisi dei livelli di chemochine ha mostrato una eterogeneità di espressione rispetto ai controlli sani (Pannello 5): alcuni trascritti risultano notevolmente down-regolati in modo statisticamente significativo come CXCL8 (IL-8) mentre altri sono up-regolati come C-C motif ligand 2 (CCL-2 o MCP-1) e C-X-C motif ligand 10 (CXCL10 o IP-10), (Tabella 8). La medesima osservazione è stata fatta nei casi di FTLN sporadica (Pannello 6), sempre se confrontati con i controlli; in questo caso è emerso che i livelli di espressione della chemochina CCL2 sono down-regolati in maniera statisticamente significativa (Tabella 9).

Pannello 5 e Tabella 8 – Portatori *C9orf72* vs Controlli



Gene	Fold-Regulation	P-value
CXCL5	-2,65	0,032
CXCL8	-5,11	0,097
CCL2	12,79	0,372
CXCL10	12,30	0,370

Pannello 6 e Tabella 9 - FTLD sporadica vs Controlli

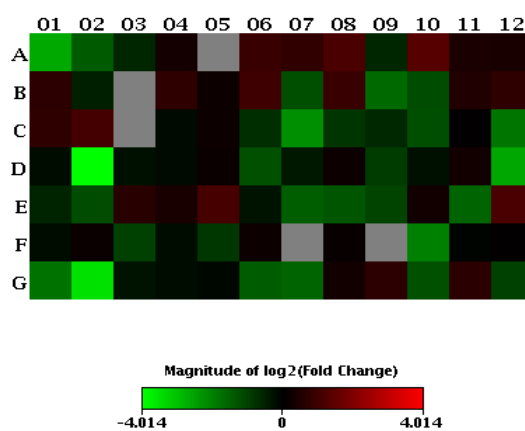


Gene	Fold-Regulation	P-value
CCR6	-2,43	0,005
CXCL1	-2,31	0,011
CCL4	-7,74	0,809
CXCL14	3,98	0,236

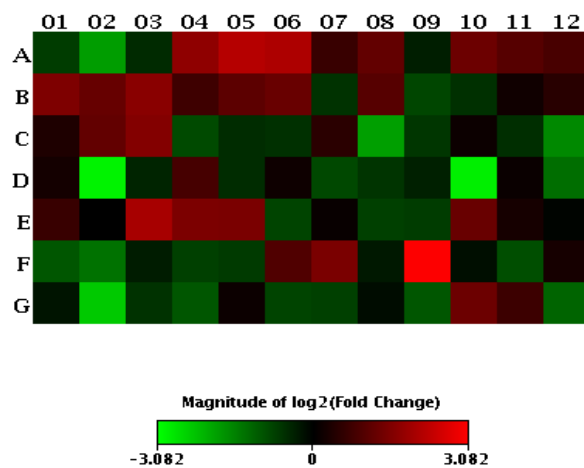
In contrasto con i risultati precedenti, ma coerentemente con i dati ottenuti con lo studio dell'espressione delle citochine, i soggetti portatori di mutazione in *GRN* sintomatici, se paragonati ai controlli sani, mostrano una generale down-regolazione dei livelli di espressione delle chemochine (Pannello 7 e Tabella 10), in particolare è riconfermata la diminuzione del livello di espressione di CXCL-8.

Infine, sono stati confrontati i livelli di espressione delle chemochine di soggetti asintomatici portatori di mutazione del gene *GRN* rispetto ai controlli sani, evidenziando in essi un'alterazione così lieve da non essere considerata statisticamente significativa. Questo dato ricalca ancora il trend dell'espressione delle citochine negli stessi soggetti (Pannello 8 e Tabella 11).

Anche in questo caso i dati potrebbero suggerire che la neuro-infiammazione riveste ruoli differenti nella patogenesi della malattia in presenza di una mutazione piuttosto che in sua assenza.

Pannello 7 e Tabella 10 – Portatori sintomatici *GRN* vs Controlli

Gene	Fold-Regulation	P-value
CCRL1	-16,16	0,002
CXCL1	-6,31	0,000085
CXCL8	-11,66	0,068

Pannello 8 e Tabella 11 - Portatori asintomatici *GRN* vs Controlli

Gene	Fold-Regulation	P-value
CCRL1	-7,73	0,001
CXCL1	8,47	0,107
CXCL8	-7,44	0,054

4.7 Analisi del livello liquorale o sierico di molecole infiammatorie

Per compiere l'analisi del livello proteico di 27 citochine e chemochine su campioni di liquor e siero ottenuto da soggetti affetti da malattia e di confrontare i livelli esaminati con quelli di soggetti sani, abbiamo utilizzato gli array Bio-plex Pro human cytokine, chemokine and growth factor (Biorad). I risultati sono descritti tramite grafici detti "box and whiskers plot" ("diagrammi a scatola e baffi") ovvero sono rappresentati tramite rettangoli posti verticalmente divisi in due parti, da cui escono due segmenti. I rettangoli (la "scatole") sono delimitati dal primo e dal terzo quartile, e sono divisi al loro interno dalla mediana. I segmenti (i "baffi") sono delimitati dal minimo e dal massimo dei valori.

Le popolazioni poste a confronto sono quattro: pazienti portatori della mutazione in *GRN* sintomatici e asintomatici, pazienti portatori dell'espansione in *C9orf72*, pazienti affetti da FTLD sporadica e controlli sani.

4.7.1 Livelli proteici di molecole infiammatorie nel liquor e sieri di pazienti portatori di mutazione in *GRN*, non portatori e controlli

L'analisi dei dati ottenuti ha evidenziato innanzitutto che Eotaxin, IL1b, IL-4, IL-5, IL-12, MIP-1 α , PDGF-BB sono risultate indosabili a livello liquorale mentre per i restanti fattori infiammatori analizzati è stato possibile dosarne i livelli. In particolare, il livello della chemochina CCL-2 (MCP-1) è significativamente aumentato nei casi sporadici di FTLD rispetto ai controlli sani (figura 4). Dalla figura 5 invece si evince che i livelli liquorali della chemochina CXCL10 (IP-10) aumentano in maniera statisticamente significativa sia nei casi sporadici di FTLD, sia nei pazienti portatori di mutazione in *GRN* rispetto ai controlli. Operando un confronto tra i livelli liquorali di CCL-2 e CXCL10 con quelli periferici, si sono potute costatare le

medesime tendenze, senza però raggiungere la significatività statistica. Un ulteriore confronto tra i livelli sierici di CCL-2 e CXCL10 in pazienti portatori di mutazione in *GRN* presintomatici con i livelli dei pazienti sintomatici ha evidenziato in entrambi i casi un aumento nella fase sintomatica della malattia. Un risultato interessante con significatività statistica è stato ottenuto dall'analisi dei livelli di RANTES: questa molecola è risultata aumentata nei controlli rispetto ai casi FTLD sporadici e ai pazienti portatori di mutazione in *GRN* (Figura 6).

Il passo successivo è stato quello di correlare i livelli liquorali delle chemochine significativamente deregolate con l'età: da quest'analisi è risultato che CCL-2 correla positivamente con l'età ($\rho=0.48$, $P=0.007$), mentre sui livelli di IP-10 e RANTES l'età non ha alcuna influenza ($\rho=0.24$, $P>0.05$, e $\rho=0.21$, $P>0.05$, rispettivamente).

In merito ai restanti fattori infiammatori analizzati, nella tabella 12 sono riportati i valori medi rilevati nel siero di pazienti con FTLD portatori di mutazione in *GRN* asintomatici e sintomatici, non portatori e controlli sani di pari età, mentre nella tabella 13 sono riportati i valori medi di ciascuna molecola infiammatoria rilevati nel CSF dei medesimi gruppi citati, tranne che nei pazienti asintomatici portatori di mutazione in *GRN*.

Dall'analisi accurata dei dati ottenuti è stato possibile riscontrare un incremento dei livelli sierici e liquorali di CXCL-8 nei casi sporadici di FTLD rispetto ai controlli, anche se non è stata raggiunta la significatività statistica. Contrariamente a quanto atteso, i livelli liquorali della citochina TNF- α non sono aumentati nei pazienti sporadici rispetto ai controlli; analogamente non è stato riscontrato l'aumento dei livelli di IL-6 a livello periferico nei pazienti portatori di mutazione in *GRN* confrontati ai livelli dei non portatori e controlli.

Figura 4: Livelli liquorali della chemochina CCL-2 in pazienti portatori di mutazione in *GRN*, pazienti con FTLD sporadica e controlli sani di pari età.

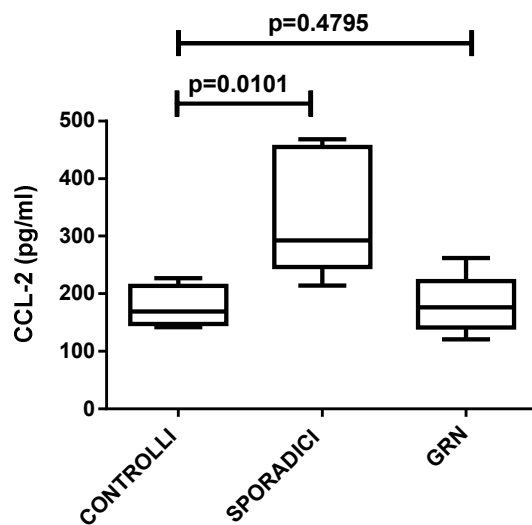


Figura 5: Livelli liquorali della chemochina CXCL-10 in pazienti portatori di mutazione in *GRN*, pazienti con FTLD sporadica e controlli sani di pari età.

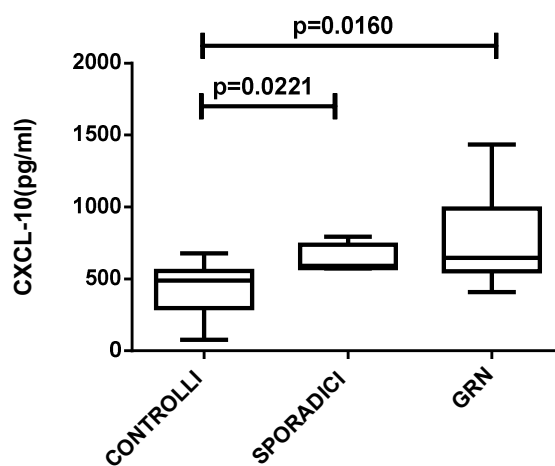


Figura 6: Livelli liquorali della chemochina RANTES in pazienti portatori di mutazione in GRN, pazienti con FTLN sporadica e controlli sani di pari età.

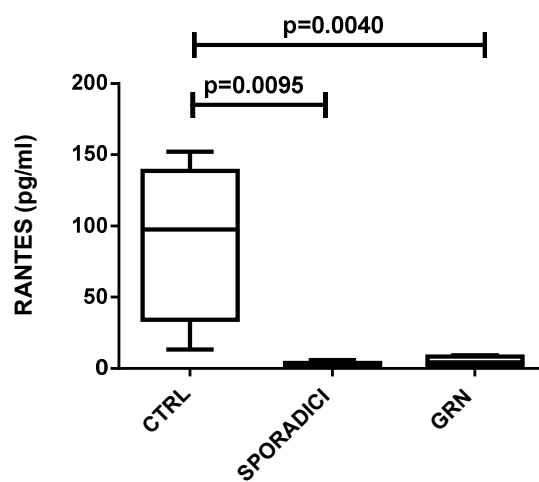


Tabella 12: sono riportati i valori medi di ciascun analita nel siero di pazienti con FTLD portatori di mutazione in *GRN* asintomatici e sintomatici, non portatori e controlli sani di pari età.

Analita	Controlli		FTLD	
		Sporadici	GRN sint.	GRN pre-sint.
Eotaxin	141.33	204.81	183.55	111.09
FGF-basic	80.84	80.64	174.22	253.12
G-CSF	132.07	118.61	206.72	269.41
GM-CSF	37.49	70.46	27.22	185.33
IFN- γ	219.68	247.36	215.53	278.40
IL-1 β	3.14	3.61	3.18	4.12
IL-1Ra	156.14	176.40	286.66	744.03
IL-2	59.58	58.45	79.90	109.91
IL-4	12.00	11.00	11.63	13.27
IL-5	17.68	14.08	10.74	15.90
IL-6	19.35	22.81	20.37	29.33
IL-7	14.25	11.76	16.03	20.71
IL-8	69.82	77.06	74.49	62.58
IL-9	32.37	24.69	53.10	85.48
IL-10	15.46	12.86	36.12	48.06
IL-12	57.17	66.84	95.65	161.60
IL-13	20.33	18.74	24.30	25.03
IL-15	31.22	30.73	32.88	57.06
IL-17A	471.84	355.89	498.96	508.80
CXCL-10	1277.29	1370.53	1451.17	863.90
CCL-2	96.56	121.71	119.26	106.88
MIP-1 α	8.99	7.28	10.86	17.65
MIP-1 β	118.49	97.21	127.99	95.14
PDGF-BB	3790.38	3448.78	3078.73	4802.33
RANTES	12555.91	18216.73	9959.11	77082.89
TNF- α	59.69	79.68	67.86	147.80
VEGF	138.18	148.46	195.82	173.53

Tabella 13: sono riportati i valori medi di ciascun analita nel CSF di pazienti con FTLD portatori di mutazione in *GRN* sintomatici, non portatori e controlli sani di pari età.

Analita	Controlli	FTLD	
		Sporadici	GRN sint.
Eotaxin	n.d.	n.d.	n.d.
FGF-basic	19.09	8.03	9.77
G-CSF	35.60	16.95	9.47
GM-CSF	23.83	15.65	30.50
IFN- γ	36.84	20.59	20.82
IL-1 β	n.d.	n.d.	n.d.
IL-1Ra	12.36	11.30	6.23
IL-2	9.47	6.19	3.35
IL-4	n.d.	n.d.	n.d.
IL-5	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6	4.39	4.31	2.91
IL-7	5.16	2.57	2.56
IL-8	19.93	28.20	18.96
IL-9	7.11	3.57	2.61
IL-10	6.82	4.48	2.62
IL-12	n.d.	n.d.	n.d.
IL-13	22.67	22.51	7.43
IL-15	16.22	12.30	9.34
IL-17A	15.37	9.45	8.36
CXCL-10	436.61	644.94*	769.17*
CCL-2	159.74	334.27*	187.29
MIP-1 α	n.d.	n.d.	n.d.
MIP-1 β	7.94	8.18	9.70
PDGF-BB	n.d.	n.d.	n.d.
RANTES	87.57	2.58*	4.63*
TNF- α	27.18	10.54	5.03
VEGF	8.46	6.33	9.12

* $P < 0.05$, differenza significativa rispetto ai controlli sani

n.d. analita non dosabile

4.7.2 Livelli proteici di molecole infiammatorie nel liquor e sieri di pazienti portatori di espansione in C9orf72, casi sporadici e controlli

Dall'analisi dei risultati ottenuti nei pazienti portatori di espansione in C9orf72 si è nuovamente confermato che i livelli liquorali degli analiti Eotaxin, IL1 β , IL-4, IL-5, IL-12, MIP-1 α , PDGF-BB sono indosabili.

Tra i fattori infiammatori dosabili, in nessun caso è stato registrato un aumento o una diminuzione statisticamente significativa sia a livello liquorale sia a livello periferico. Nella tabella 14 sono riportati i valori medi rilevati nel siero di pazienti con FTLD portatori di espansione in C9orf72, non portatori e controlli sani di pari età, mentre nella tabella 15 sono riportati i valori medi di ciascuna molecola infiammatoria rilevati nel CSF degli stessi gruppi di pazienti e controlli.

Analizzando le tendenze dei dati riportati nelle tabelle 14 e 15, è stato possibile riscontrare che le molecole che sono risultate alterate nei pazienti portatori di mutazione in *GRN* sono le stesse anche nei pazienti portatori dell'espansione. Si è verificato infatti un incremento dei livelli di CCL-2 e CXCL-10 e una diminuzione dei livelli di RANTES nel liquor di pazienti portatori dell'espansione in C9orf72 rispetto ai controlli.

A livello periferico invece è stato registrato un aumento dei livelli di CXCL-8 e una diminuzione dei livelli di IL-6 nei pazienti portatori dell'espansione in C9orf72 rispetto ai casi sporadici di FTLD e controlli sani.

Tabella 14: sono riportati i valori medi di ciascun analita nel siero di pazienti con FTLD portatori dell'espansione in C9orf72, non portatori e controlli sani di pari età.

Analita	FTLD	
	Controlli	Sporadici C9orf72
Eotaxin	141.33	204.81 188.28
FGF-basic	80.84	80.64 72.07
G-CSF	132.07	118.61 111.41
GM-CSF	37.49	70.46 78.08
IFN- γ	219.68	247.36 191.38
IL-1 β	3.14	3.61 3.25
IL-1Ra	156.14	176.40 150.09
IL-2	59.58	58.45 57.31
IL-4	12.00	11.00 11.30
IL-5	17.68	14.08 17.01
IL-6	19.35	22.81 16.35
IL-7	14.25	11.76 14.33
IL-8	69.82	77.06 79.37
IL-9	32.37	24.69 18.56
IL-10	15.46	12.86 17.67
IL-12	57.17	66.84 46.20
IL-13	20.33	18.74 19.07
IL-15	31.22	30.73 32.80
IL-17A	471.84	355.89 422.11
CXCL-10	1277.29	1370.53 796.70
CCL-2	96.56	121.71 120.49
MIP-1 α	8.99	7.28 8.60
MIP-1 β	118.49	97.21 149.60
PDGF-BB	3790.38	3448.78 4566.74
RANTES	12555.91	18216.73 24789.64
TNF- α	59.69	79.68 69.71
VEGF	138.18	148.46 145.91

Tabella 15: sono riportati i valori medi di ciascun analita nel CSF di pazienti con FTLD portatori dell'espansione in C9orf72, non portatori e controlli sani di pari età.

Analita	Controlli	FTLD	
		Sporadici	C9orf72
Eotaxin	n.d.	n.d.	n.d.
FGF-basic	19.09	8.03	11.83
G-CSF	35.60	16.95	7.23
GM-CSF	23.83	15.65	22.29
IFN- γ	36.84	20.59	18.03
IL-1 β	n.d.	n.d.	n.d.
IL-1Ra	12.36	11.30	9.50
IL-2	9.47	6.19	4.59
IL-4	n.d.	n.d.	n.d.
IL-5	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6	4.39	4.31	2.80
IL-7	5.16	2.57	2.66
IL-8	19.93	28.20	17.51
IL-9	7.11	3.57	2.38
IL-10	6.82	4.48	3.95
IL-12	n.d.	n.d.	n.d.
IL-13	22.67	22.51	7.54
IL-15	16.22	12.30	11.09
IL-17A	15.37	9.45	13.12
CXCL-10	436.61	644.94*	535.55
CCL-2	159.74	334.27*	284.32
MIP-1 α	n.d.	n.d.	n.d.
MIP-1 β	7.94	8.18	6.71
PDGF-BB	n.d.	n.d.	n.d.
RANTES	87.57	2.58*	31.97
TNF- α	27.18	0.54	5.65
VEGF	8.46	6.33	6.43

* $P < 0.05$, differenza significativa rispetto ai controlli sani

n.d. analita non dosabile

5. DISCUSSIONE

La Degenerazione Lobare Frontotemporale (FTLD) rappresenta la forma più comune di demenza ad esordio presenile, ed è una patologia neurodegenerativa multifattoriale complessa nella cui eziopatogenesi giocano un ruolo sia fattori ambientali che fattori genetici. In una piccola percentuale di pazienti è presente familiarità positiva per demenza ed è possibile identificare un pattern di trasmissione autosomico dominante e la presenza di singole mutazioni geniche come fattore causale di malattia.

Lo screening genetico condotto sulla popolazione reclutata, costituita da 772 pazienti con diagnosi clinica di FTLD, ha confermato la presenza di mutazioni causali nei geni *GRN*, *MAPT* e dell'espansione esanucleotidica in c9orf72.

Per quanto riguarda il gene *GRN*, oltre alle mutazioni note già identificate in precedenza (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>) legate ad un meccanismo di aploinsufficienza, abbiamo identificato in due famiglie una nuova variante, che consiste nella delezione di due paia di basi (TG) in posizione g.1159_1160.

Le due famiglie descritte, essendo originarie della stessa regione dell'Italia Settentrionale, potrebbero derivare da un fondatore comune; avendo a disposizione il DNA di pochi soggetti non siamo però stati in grado di confermare questa ipotesi tramite l'analisi degli aplotipi.

Ponendo la nostra attenzione sulla fase pre-sintomatica di malattia, alla luce del dato di indosabilità della progranulina plasmatica anche in portatori asintomatici, si potrebbe ipotizzare che le alterazioni biologiche associate alla mutazione si verificano appena prima dell'esordio dei sintomi.

Pur riconoscendo la necessità di studiare altri membri della famiglia, al fine di dimostrare in essa la segregazione del difetto genetico, l'evidenza dei livelli plasmatici di progranulina molto bassi e della degradazione dell'RNA

mediato dalla formazione di un codone nonsense, supporta fortemente l'ipotesi che si tratti di una variante patogenetica e che conduca ad apoinsufficienza.

Prendendo in considerazione invece la frequenza di mutazioni nel gene *MAPT* nella nostra popolazione, questa risulta essere molto bassa (0.9%). Operando un confronto tra i due tipi di mutazione finora descritti, l'alta prevalenza di mutazioni in *GRN* risente probabilmente della facilità con cui tali pazienti vengono identificati grazie al dosaggio dei livelli plasmatici di progranulina, un marcatore biologico sensibile e specifico, anche se la conferma tramite sequenziamento è sempre necessaria.

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

In questo studio lo screening del gene *C9orf72* è stato condotto su una casistica molto ampia di pazienti diagnosticati clinicamente come FTLD. Sono stati infatti reclutati 772 pazienti con FTLD, 22 con CBD e 33 con PSP provenienti da diversi Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale. Inoltre sono stati analizzati anche 222 controlli sani che non presentavano alcun segno di disordine neurologico o psichiatrico.

E' stato dimostrato che tale espansione esanucleotidica può essere considerata una causa comune d'insorgenza di FTLD nella popolazione italiana, con una frequenza di circa il 6% molto simile a quella delle mutazioni in *GRN*. Dalla correlazione genotipo-fenotipo effettuata sui soggetti appartenenti alla coorte clinica, si riscontra che l'espansione in *C9orf72* si accompagna più frequentemente al fenotipo combinato bvFTD/MND (13,6%) rispetto al fenotipo bvFTD isolato (6,3%). Possiamo, dunque, formulare l'ipotesi secondo cui la presenza contemporanea di

sintomi FTLD e MND aumenti la probabilità che il soggetto sia portatore dell'espansione di *C9orf72*.

Tuttavia, sono stati individuati sia pazienti portatori dell'espansione senza segni di MND e senza familiarità per malattia del motoneurone, sia pazienti affetti da FTD/MND che non sono risultati portatori dell'espansione. Ciò sta a indicare che la MND non è una manifestazione costante nei portatori *C9orf72* e che la mutazione non rappresenta la causa della totalità dei casi di FTD/MND e, pertanto, che, per alcuni pazienti, altre mutazioni genetiche potrebbero essere responsabili del quadro in forme familiari.

E' da notare che nell'analisi di quest'ampia casistica, l'espansione è stata individuata in due pazienti con diagnosi clinica di SD, mentre nessun paziente portatore aveva una diagnosi di PNFA. Nel primo caso questi dati sono in accordo con quelli riportati in letteratura, dato che recentemente nella casistica analizzata da Abbate e collaboratori [Abbate et al., 2014] si è riscontrato un portatore dell'espansione esanucleotidica in *c9orf72* con deficit semantico, mentre un portatore sia di mutazione in GRN che dell'espansione in *C9orf72* è descritto nello studio di Mignarri e collaboratori [Mignarri et al., 2014] ed aveva una diagnosi clinica di PNFA [Gijssels et al., 2012]. Come atteso, nessun paziente con diagnosi di sindrome cortico basale (CBS) e paralisi sopranucleare progressiva (PSP), così come nessuno dei 222 controlli sani analizzati, è risultato portatore dell'espansione esanucleotidica in *C9orf72*.

Per quanto riguarda la sintomatologia d'esordio, sono stati osservati numerosi casi con presentazioni atipiche, che includono sintomi psicotici (deliri e allucinazioni), deficit cognitivi coinvolgenti il dominio mnesico e parkinsonismo.

Dall'analisi dei soggetti appartenenti alla nostra coorte è emersa l'associazione dei fenomeni psicotici con l'espansione esanucleotidica nel gene *C9orf72*, già suggerita in letteratura [Snowden et al., 2012; Dobson-

Stone *et al.*, 2012]: circa un terzo dei portatori di espansione in *C9orf72* (30,3%) ha manifestato, infatti sintomi psicotici, pur non avendo una precedente storia psicopatologica nota, mentre l'8,1% dei pazienti non portatori presentato sintomi psicotici.

L'elevata prevalenza di sintomi psicotici è importante in quanto può rappresentare un elemento distintivo dei pazienti portatori; nei pazienti FTLD in generale, infatti, la presenza di psicosi è notevolmente inferiore [Bathgate *et al.*, 2001; Mendez *et al.*, 2008].

I disturbi della memoria rappresentano un'altra caratteristica atipica riscontrata nei portatori della mutazione in *C9orf72*. Quasi la metà dei soggetti portatori analizzati (45,4%) presentava, infatti, disturbi di memoria sia soggettivi che obiettivabili attraverso i test neuropsicologici. Questo elemento può portare ad un'iniziale diagnosi di "Mild Cognitive Impairment" (MCI) o, addirittura, di AD come già descritto da altri studi [Murray *et al.*, 2011; Mahoney *et al.*, 2012].

E' da ricordare inoltre che la presentazione con compromissione della memoria può essere una caratteristica fenotipica dei portatori di mutazioni in *GRN* e di espansione in *C9orf72*, mentre non è mai stata associata nei portatori di mutazione nel gene *MAPT* [Galimberti *et al.*, 2012].

Una piccola percentuale di pazienti (n=4) ha presentato segni extrapiramidali inquadrabili come parkinsonismo. Presentazioni atipiche con disturbi del movimento nei portatori dell'espansione sono state segnalate nei portatori *C9orf72* [Lindquist *et al.*, 2013], così come nei portatori di mutazioni in *GRN* [Dickson *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 1997].

Nella coorte clinica analizzata in questo studio, l'età media d'esordio dei sintomi della malattia è risultata essere simile tra i portatori e i non portatori dell'espansione, in accordo con quanto già riportato in letteratura [Sha *et al.*, 2012]. È necessario però valutare adeguatamente i sintomi d'esordio che possono fuorviare da una corretta ipotesi diagnostica. Nonostante

siano state qui individuate alcune caratteristiche cliniche distintive della presenza dell'espansione, una buona accuratezza diagnostica può risultare difficile in virtù dell'eterogeneità fenotipica dei pazienti con mutazione in *C9orf72*. I sintomi di presentazione sono talvolta sfumati e, per sollevare il sospetto di FTLD, è necessaria un'attenta valutazione psicologica. Pertanto, è possibile ipotizzare che vi sia, in molti casi, un riconoscimento tardivo ed una sottostima delle prime manifestazioni della malattia, sia da parte dei membri della famiglia che dei medici di medicina generale. Questa stessa variabilità di presentazione clinica dei pazienti con l'espansione di *C9orf72* è, tuttavia, interessante: non è ancora chiaro perché solo alcuni pazienti sviluppino segni di MND, né perché altri manifestino psicosi, o, in casi meno frequenti, i portatori presentino un fenotipo con compromissione del linguaggio in assenza di sintomi psicotici o segni di MND.

L'ampia gamma di fenotipi clinici con cui si manifesta la FTLD può però essere solo in parte spiegata dall'influenza di fattori genetici, e ciò presuppone che vi siano anche dei fattori ambientali che contribuiscano a determinare l'eterogeneità clinica della FTLD.

Date le note proprietà antinfiammatorie di progranulina e infiammatorie delle granuline, nonché la dimostrazione di elevati livelli di chemochine nel liquor di pazienti con FTD [Galimberti *et al.*, 2006] abbiamo indirizzato la seconda parte dello studio all'analisi del profilo di espressione di citochine e chemochine come strumento per valutare il coinvolgimento del processo infiammatorio nella FTLD ed il suo ruolo nella patogenesi della malattia. Citochine e chemochine sono, infatti, fattori centrali nella regolazione del processo infiammatorio e nello sviluppo di malattie neurodegenerative: esse regolano l'attività e la sopravvivenza delle cellule infiammatorie e ne mediano la comunicazione. Un'alterata espressione di fattori infiammatori potrebbe indurre o modulare la progressione di malattie neurodegenerative.

L'età ha l'effetto di incrementare la suscettibilità a patologie dementigene ed il processo neuro-infiammatorio età-dipendente può giocare un ruolo importante nella produzione di tossine che provocano morte o disfunzione neuronale. Le modificazioni nelle abilità intellettive che si osservano con l'avanzare dell'età sono comunemente ritenute parte del processo fisiologico d'invecchiamento, il processo sottostante, però, non è stato chiaramente compreso. La capacità di risposta del sistema immunitario ad insulti esterni anch'essa cala con l'età, determinando maggiore suscettibilità alle infezioni in età senile. È stata evidenziata una ridotta efficienza dei meccanismi regolatori della risposta immune e questo deficit di modulazione potrebbe essere la ragione dell'incremento dei livelli di citochine circolanti osservati in soggetti anziani [Hawkey *et al.*, 2004].

Un aumento dell'attività infiammatoria intratecale nella FTLD è noto da tempo [Sjogren *et al.*, 2004]: è stato riscontrato un incremento dei livelli di alcune citochine, quali TNF α e TGF β , nel CSF di soggetti affetti da FTLD, paragonati a controlli sani. Questo incremento non è da correlarsi ad una disfunzione o danno a carico della barriera emato-encefalica (BEE), né a differenze in età o sesso dei soggetti posti a confronto. Inoltre, non è stata individuata una correlazione tra i livelli di citochine liquorali e sierici: l'aumentata presenza di queste molecole nel liquor non è dovuta ad un'aumentata produzione periferica, ma starebbe, anzi, a indicare la presenza di una attività immune intratecale in soggetti con FTLD. La causa sottostante quest'attività immune è tuttora sconosciuta, ma diverse evidenze suggeriscono come l'infiammazione costituisca parte importante dei meccanismi pato-fisiologici che conducono a FTLD.

In questo studio si è voluto approfondire il ruolo della neuro-infiammazione, distinguendo i casi di FTLD sporadica e di FTLD legata a mutazioni a carattere autosomico dominante, a carico di *GRN* o *C9orf72*. In tal modo è stato possibile formulare ipotesi in merito alla fase della patogenesi della

FTLD in cui risulta coinvolta l'attivazione immunitaria. L'infiammazione, cioè, può risultare essere un epifenomeno conseguente ad un danno neuronale primitivo, configurando, quindi, un quadro di infiammazione secondaria, o piuttosto il processo immunitario può rivestire un ruolo determinante nell'induzione del danno neuronale stesso, configurando un quadro primitivamente infiammatorio.

Per quanto riguarda la FTLD sporadica, abbiamo osservato una generale up-regolazione dell'espressione delle citochine più comuni, in particolare di IL-5, IL-12A, VEGF-A e LIF. Considerando che IL-5 e IL-12A sono molecole infiammatorie coinvolte nel processo di differenziazione rispettivamente delle cellule Th1/Th2 e B, questa evidenza è un'ulteriore conferma del fatto che nella patogenesi dell'FTLD vi è l'implicazione del sistema immunitario.

Al contrario, nei soggetti portatori sintomatici di mutazioni in *GRN*, il profilo di espressione delle citochine mostra una tendenza alla down-regolazione, indicando meccanismi infiammatori diversi in portatori di mutazioni autosomiche dominanti e ponendo l'accento su come possano esistere differenti pathway che conducono alla neurodegenerazione e possibilmente al fenotipo clinico della FTLD. Il profilo di queste molecole in soggetti portatori dell'espansione esanucleotidica in *C9orf72*, rispetto ai controlli sani, appare invece contrassegnato da una certa eterogeneità: sussistono, cioè, differenze fra le varie citochine alcune delle quali risultano up-regolate, altre down-regolate. In entrambi i gruppi di portatori di mutazioni (*GRN* e *C9orf72*) si è osservata una diminuita espressione di IL-4. Infine, sono stati confrontati i livelli di espressione delle citochine in soggetti asintomatici portatori di mutazione del gene *GRN* rispetto ai controlli sani, evidenziando in essi un'alterazione così lieve da non essere considerata statisticamente significativa.

In merito al profilo di chemochine e recettori, si è riscontrato nei soggetti

con mutazioni in *C9orf72* un quadro più eterogeneo: alcune molecole sono up-regolate (CCL-2 e CXCL-10) ed altre down-regolate (CXCL-8). La medesima osservazione è stata fatta nei casi di FTLD sporadica, sempre se confrontati con i controlli.

In soggetti sintomatici portatori di mutazione in *GRN*, invece, si riscontra una generale tendenza alla down-regolazione, in particolare per CXCL-8, CXCL-1 e CCRL-1. Quest'ultima osservazione è perciò simile a quella fatta per l'espressione delle citochine, nei medesimi pazienti.

Infine, sono stati confrontati i livelli di espressione delle chemochine e recettori di soggetti asintomatici portatori di mutazione del gene *GRN* rispetto ai controlli sani, evidenziando in essi un'alterazione così lieve da non esser considerata statisticamente significativa. E' da notare però che questi soggetti sono molto lontani dall'età media all'esordio dei portatori.

I risultati finora ottenuti suggeriscono il coinvolgimento di differenti meccanismi infiammatori nella FLTD in presenza di mutazioni autosomiche dominanti e nella malattia sporadica. Si rendono però necessari ulteriori studi per valutare approfonditamente quando e come l'infiammazione intratecale entra a far parte della patogenesi della FTLD e per risalire ai pathway studiando le singole molecole infiammatorie.

Un altro ambito di ricerca potrebbe essere lo studio dell'esistenza di un'eventuale correlazione tra i diversi livelli di espressione di citochine e chemochine e l'eterogeneità del fenotipo clinico di FTLD.

Una migliore comprensione dei processi biologici responsabili della malattia sarebbe infatti il primo step per poter disporre di una terapia che agisca a questo livello.

Per cercare di approfondire ulteriormente l'analisi relativa ai fattori infiammatori coinvolti nella FTLD, abbiamo analizzato i livelli proteici di citochine, chemochine e fattori di crescita tramite l'utilizzo della tecnologia Bioplex.

I risultati ottenuti a livello liquorale hanno messo in evidenza che la chemochina CCL-2 aumenta nei casi sporadici di FTLD rispetto ai controlli sani mentre la chemochina CXCL-10 aumenta in maniera statisticamente significativa sia nei casi sporadici di FTLD, che nei pazienti portatori di mutazione in *GRN* rispetto ai controlli. Il trend osservato per la molecola CCL-2 conferma i risultati precedentemente ottenuti dal nostro laboratorio con la metodica ELISA [Galimberti *et al.*, 2006]; è doveroso però sottolineare che quando venne effettuato lo studio non era noto il coinvolgimento del gene *GRN* nelle forme autosomiche dominanti di FTLD, perciò è probabile che molti pazienti con mutazione in *GRN* vennero considerati erroneamente casi sporadici di FTLD. In questo studio invece è stata volutamente esclusa la paziente portatrice di mutazione nel gene *MAPT*, in quanto risulta impossibile effettuare l'analisi statistica con un solo caso, mentre non sono stati svolti gli screening per mutazioni rare nei geni *VCP-1*, *FUS*, *CHMP2B* e *TDP-43*.

Prendendo in considerazione i livelli sierici di CCL-2 e CXCL-10 e confrontandoli con quelli liquorali, abbiamo constatato le medesime tendenze, senza però raggiungere la significatività statistica. Nuovamente, è bene sottolineare che c'è una corrispondenza tra questi risultati e i dati ottenuti in precedenza nel nostro laboratorio. Infine, avendo a disposizione una preziosa coorte di pazienti portatori di mutazione in *GRN* asintomatici, abbiamo messo a confronto i livelli sierici di CCL-2 e CXCL-10 dei pazienti menzionati con i livelli dei pazienti sintomatici ed in entrambi i casi abbiamo registrato un aumento nella fase sintomatica della malattia.

Dall'analisi effettuata a livello intratecale è emerso che oltre a CCL-2 e CXCL-10 anche la chemochina RANTES risulta alterata in maniera significativa ma con tendenza opposta: i livelli di RANTES infatti aumentano nei controlli rispetto ai casi FTLD sporadici ed ai pazienti portatori di mutazione in *GRN*. Una spiegazione che giustifichi questa

osservazione deriva dal fatto che RANTES è una chemochina che svolge un ruolo neuroprotettivo, poiché stimola la produzione di fattori neurotrofici e promuove la sopravvivenza neuronale [Tokami *et al.*, 2013]; è plausibile dunque affermare che la diminuzione dei livelli di RANTES sia nei pazienti portatori di mutazione che nei non portatori sia dovuta alla mancata protezione.

In seguito abbiamo deciso di correlare i livelli liquorali delle chemochine significativamente deregolate con l'età: come atteso, la chemochina CCL-2 correla positivamente con l'età mentre sui livelli di CXCL-10 l'età non ha alcuna influenza. Queste osservazioni risultano essere in linea con quanto visto in precedenza [Galimberti *et al.* 2006]. I livelli di chemochina RANTES infine non correlano positivamente con l'età.

Per quanto concerne l'analisi dei restanti fattori infiammatori è stato possibile riscontrare un incremento non significativo dei livelli sierici e liquorali di CXCL-8 nei casi sporadici rispetto ai controlli, come già precedentemente dimostrato [Galimberti *et al.*, 2006]. Diversamente a quanto atteso [Sjogren *et al.*, 2004], i livelli liquorali della citochina TNF- α non sono risultati in aumento nei pazienti sporadici rispetto ai controlli. Non è stato altresì riscontrato l'aumento significativo dei livelli di IL-6 a livello periferico nei pazienti portatori di mutazione in *GRN* rispetto ai non portatori e controlli, in antitesi con quanto riportato da Bossù e collaboratori [Bossù *et al.*, 2011]. Per la maggior parte dei fattori analizzati non è stata raggiunta la significatività statistica e un fattore determinante è sicuramente la bassa numerosità dei soggetti coinvolti nello studio. E' doveroso sottolineare però che in questa prima fase di screening ci siamo volutamente concentrati su una coorte ristretta e ben selezionata di pazienti. Come prospettiva futura invece ci prefiggiamo di ampliare la nostra casistica includendo soggetti provenienti da diverse etnie ed i campioni biologici su cui effettuare l'analisi ci verranno forniti dai numerosi centri internazionali con cui collaboriamo.

In ultimo, avendo a disposizione sieri e CSF di pazienti portatori di espansione esanucleotidica in C9orf72, abbiamo analizzato i livelli proteici di citochine, chemochine e fattori di crescita attraverso l'utilizzo dello strumento Bioplex.

A oggi non sono ancora presenti studi in letteratura che illustrino l'andamento del livello di molecole infiammatorie durante il decorso di malattia in pazienti con FTLD portatori dell'espansione nel gene C9orf72. In questostudio quindi è stata svolta per la prima quest'analisi; i risultati ottenuti però non hanno messo in evidenza nessuna differenza statisticamente significativa sia a livello intratecale che a livello periferico.

Dall'analisi dei valori medi degli analiti presi in considerazione, è stato possibile riscontrare le medesime tendenze sia nei pazienti portatori di mutazione in *GRN* che nei pazienti portatori dell'espansione in C9orf72. Si è verificato infatti un incremento dei livelli di CCL-2 e CXCL-10 ed una diminuzione dei livelli di RANTES nel liquor di pazienti portatori dell'espansione in C9orf72 rispetto ai controlli. Nei sieri di pazienti portatori dell'espansione in C9orf72 rispetto ai casi sporadici di FTLD e controlli è stato osservato un aumento dei livelli di CXCL-8 ed una diminuzione dei livelli di IL-6.

In conclusione, abbiamo identificato diversi portatori di geni causali di FTLD a trasmissione autosomica dominante nella popolazione Italiana. Abbiamo in seguito dimostrato che esistono delle disregolazioni nell'espressione e nei livelli circolanti di diverse citochine e chemochine, alcune specificamente de-regolate in pazienti con mutazioni in *GRN* e C9orf72, suggerendo l'esistenza di pathways patogenetici diversi che portano a morte neuronale. Questi dati preliminari necessitano comunque una replicazione in una popolazione indipendente più ampia.

6. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi si è focalizzato innanzitutto sulla ricerca di mutazioni autosomiche dominanti che potessero essere causa della malattia neurodegenerativa Degenerazione Lobare Frontotemporale. Sono stati infatti analizzati i più frequenti geni causali noti in letteratura, che sono *GRN*, *MAPT* e *C9orf72*. Tramite sequenziamento diretto sono stati individuati 20 pazienti portatori di mutazioni nel gene *GRN*, due dei quali presentavano una nuova mutazione a livello dell'esone 5 del gene *GRN*, Cys149fs (g. 1159_1160TG). Una paziente invece è risultata essere portatrice di una nuova variante, Gly304Ser (g. 123789 G>A), situata a livello dell'esone 10 di *MAPT*.

L'espansione esanucleotidica situata nel primo introne del gene *C9orf72* è stata analizzata, tramite *Primer-Repeat PCR* e relativa analisi dei frammenti, in una popolazione di pazienti affetti da FTLD molto ampia (772 FTLD, 22 CBS, 33 PSP) grazie alla collaborazione di diversi gruppi di ricerca afferenti a Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Centri di Ricerca e Università presenti su tutto il Territorio Nazionale.

Sono stati individuati 46 pazienti portatori dell'espansione patologica esanucleotidica (23 maschi e 23 femmine). Come ci si aspettava anche l'analisi condotta su 222 controlli sani non ha prodotto nessun risultato positivo così come lo screening sui pazienti affetti da CBS e PSP.

La seconda parte dello studio è stata dedicata all'analisi del profilo di espressione di citochine e chemochine per approfondire il ruolo del processo infiammatorio nei casi di FTLD sporadica e di FTLD legata a mutazioni a carattere autosomico dominante, a carico di *GRN* o *C9orf72*.

E' stata osservata una generale diminuzione dei livelli di espressione di citochine e chemochine in pazienti portatori di mutazioni in *GRN* sintomatici rispetto ai controlli; in particolare, è stata rilevata una significativa down-

regolazione dei livelli di interleuchina (IL)-4. Al contrario, nei casi sporadici di FTLD rispetto ai controlli è emersa una tendenza opposta; in particolare, i livelli di espressione di IL-5 e Leukemia Inhibitory Factor (LIF) sono risultati up-regolati in maniera statisticamente significativa. Per quanto riguarda i pazienti portatori dell'espansione in c9orf72 il quadro infiammatorio è piuttosto eterogeneo; è emersa sia una significativa over-espressione dei livelli di alcune chemochine come chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2 o MCP-1) e chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10 o IP-10) che la down-regolazione di alcune molecole, ad esempio CXCL-8. I risultati preliminari finora ottenuti suggeriscono il coinvolgimento di differenti meccanismi infiammatori nella FLTD in presenza di mutazioni autosomiche dominanti e nella malattia sporadica, si rende però necessario ampliare la numerosità dei soggetti coinvolti al fine di validare i risultati ottenuti.

In ultimo, è stato analizzato il livello proteico di citochine e chemochine nel liquido cerebro-spinale e siero degli stessi gruppi di pazienti e controlli. È stato osservato un aumento significativo dei livelli liquorali di CCL-2 e CXCL-10 in pazienti FTLD sporadici rispetto ai controlli; anche in pazienti con FTLD portatori di mutazioni in GRN sintomatici si è verificata una up-regolazione dei livelli liquorali di IP-10 rispetto ai soggetti sani. Al contrario, i livelli liquorali di RANTES sono risultati significativamente aumentati nel liquor di soggetti sani rispetto ai pazienti portatori di mutazione in GRN sintomatici e non portatori. Dalla correlazione tra livello proteico ed età è emerso che i livelli liquorali di CXCL-10 e RANTES non sono influenzati dall'età, mentre CCL-2 correla positivamente con l'età. Prendendo in considerazione i portatori dell'espansione in C9orf72, non è stata osservata alcuna alterazione statisticamente significativa nei livelli di citochine e chemochine se comparati a quelli dei controlli sani, sia a livello liquorale che a livello sierico. Un auspicabile sviluppo futuro potrebbe essere l'estensione dell'analisi anche a soggetti portatori di mutazioni rare causali

di malattia, come FUS, VCP-1 e il gene di più recente scoperta CHCHD10.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbate C, Arosio B, Galimberti D, Nicolini P, Chiara LR, Rossi PD, Ferri E, Gussago C, Deriz M, Fenoglio C, Serpente M, Scarpini E, Mari D, "Phenotypic variability associated with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: a sporadic case of frontotemporal lobar degeneration with prodromal hyposmia and predominant semantic deficits", *J Alzheimers Dis*, 40(4):849-55, 2014.
2. Aloisi F, "The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology", *Adv Exp Med Biol.*; 468:123-33, 1999.
3. Anfossi M, Bernardi L, Gallo M, Geracitano S, Colao R, Puccio G, Curcio SA, Frangipane F, Mirabelli M, Tomaino C, Smirne N, Maletta R, Bruni AC. *MAPT* V363I variation in a sporadic case of frontotemporal dementia: variable penetrant mutation or rare polymorphism?", *Alzheimer Dis Assoc Disord.*; 25(1):96-9, 2011.
4. Araujo DM, Cotman CW, "Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glia-derived factors" *Brain Res.*; 600(1):49-55, 1993.
5. Arighi A., Fumagalli G., Jacini F., Fenoglio C., ghezzi L., Pietroboni AM., De Riz M., Serpente M. et al., "Early onset behavioral variant frontotemporal demantia due to C9orf72 hexanucleotide repaet expansion: psychiatric clinical presentation" *J.Alzheimer Dis.* 31(2):447-52, 2012.
6. Arvanitakis Z., "Update on frontotemporal dementia", *Neurologist*; 16 (1): 16-22, 2010.
7. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chausseot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, Berg-Alonso L, Kageyama Y, Serre V, Moore DG, Verschueren A, Rouzier C, Le Ber I, Augé G, Cochaud C, Lespinasse F, N'Guyen K, de Septenville A, Brice A, Yu-Wai-Man P, Sesaki H, Pouget J, Paquis-Flucklinger

V., "A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement", *Brain*, 137(Pt 8):2329-45. Epub 2014 Jun 16.

8. Baker M., Mackenzie I.R., Pickering-Brown S.M., et al., "Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17" *Nature*; 442:916–919, 2006.

9. Bathgate D, Snowden JS, Varma A, Blackshaw A, Neary D, "Behaviour in frontotemporal dementia, Alzheimer's disease and vascular dementia" *Acta Neurol Scand*; 103(6):367-78, 2011.

10. Bernardi L, Maletta RG, Tomaino C, Smirne N, Di Natale M, Perri M, Longo T, Colao R, Curcio SA, Puccio G, Mirabelli M, Kawarai T, Rogaeva E, St George Hyslop PH, Passarino G, De Benedictis G, Bruni AC, "The effects of APOE and tau gene variability on risk of frontotemporal dementia", *Neurobiol Aging*.; 27(5):702-9, 2006.

11. Bertram L, Tanzi RE, "The genetic epidemiology of neurodegenerative disease", *J Clin Invest*; 115(6):1449-57, 2005.

12. Bonner MF, Ash S, Grossman M., "The new classification of primary progressive aphasia into semantic, logopenic, or nonfluent/agrammatic variants" *Curr Neurol Neurosci Rep*.; 10:484-90, 2010.

13. Borroni B, Alberici A, Archetti S, et al., "New insights into biological markers of frontotemporal lobar degeneration spectrum", *Curr Med Chem*; 17 (10): 1002-9, 2010.

14. Bossù P, Salani F, Alberici A, Archetti S, Bellelli G, Galimberti D, Scarpini E, Spalletta G, Caltagirone C, Padovani A, Borroni B., "Loss of function mutations in the progranulin gene are related to pro-inflammatory cytokine

dysregulation in frontotemporal lobar degeneration patients”, *J Neuroinflammation*, 2011.

15. Bozeat S., Gregory C.A., Ralph M.A., et al., “Which neuropsychiatric and behavioural features distinguish frontal and temporal variants of frontotemporal dementia from Alzheimer’s disease?”, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, Vol. 69, pp. 178–186, 2000.

16. Buée L., Delacourte A., “Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick’s disease”, *Brain Pathol.*; 9:681-693, 1999.

17. Carecchio M, Fenoglio C, De Riz M, Guidi I, Comi C, Cortini F, Venturelli E, Restelli I, Cantoni C, Bresolin N, Monaco F, Scarpini E, Galimberti D, “Progranulin plasma levels as potential biomarker for the identification of GRN deletion carriers. A case with atypical onset as clinical amnesic Mild Cognitive Impairment converted to Alzheimer's disease”, *J Neurol Sci.*; 287(1-2):291-3, 2009.

18. Cerami C., Scarpini E., Cappa SF, Galimberti D, “Frontotemporal lobar degeneration: current knowledge and future challenges”, *J Neurol.*; 259:2278-86, 2012.

19. Cummings J.L., Mega M., Gray K., et al., “The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia”, *Neurology*, Vol 44,, pp. 2308-2314, 1994.

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

21. De Silva R, Lashley T, Strand C, Shiarli AM, Shi J, Tian J, Bailey KL, Davies P, Bigio EH, Arima K, Iseki E, Murayama S, Kretzschmar H, Neumann M, Lippa C, Halliday G, MacKenzie J, Ravid R, Dickson D, Wszolek Z, Iwatsubo T, Pickering-Brown SM, Holton J, Lees A, Revesz T, Mann DM., "An immunohistochemical study of cases of sporadic and inherited frontotemporal lobar degeneration using 3R- and 4R-specific tau monoclonal antibodies", *Acta Neuropathol.*; 111(4):329-40, 2006.
22. Dickson DW¹, Kouri N, Murray ME, Josephs KA, "Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau).", *J Mol Neurosci.*, 45(3):384-9, 2011.
23. Dobson-Stone C, Hallupp M, Bartley L, Shepherd CE, Halliday GM, Schofield PR, Hodges JR, Kwok JB., "C9ORF72 repeat expansion in clinical and neuropathologic frontotemporal dementia cohorts.", *Neurology*, 79(10):995-1001, 2014.
24. Finch N, Carrasquillo MM, et al., "TMEM106B regulates progranulin levels and the penetrance of FTLD in GRN mutation carriers", *Neurology*, 1; 76 (5):467-74, 2011.
25. Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S., "Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants.", *Ann Neurol.*; 41(6):706-15, 1997.
26. Gainotti G., "Different patterns of famous people recognition disorders in patients with right and left anterior temporal lesions: a systematic review", *Neuropsychologia*; 2:1591–1607, 2007.
27. Galimberti D, Scarpini E., "Clinical phenotypes and genetic biomarkers of FTLD", *J Neural Transm*; 119:851-860, 2012.

28. Galimberti D, Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Cortini F, Scalabrini D, Perini L, Restelli I, Binetti G, Cappa S, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, "MCP-1 A-2518G polymorphism: effect on susceptibility for frontotemporal lobar degeneration and on cerebrospinal fluid MCP-1 levels", *J Alzheimers Dis.*;17(1):125-33, 2009.
29. Galimberti D., Fenoglio C., Cortini F., et al., "GRN variability contributes to sporadic frontotemporal lobar de generation", *J. Alzheimers Dis.*, 19:171-177, 2010.
30. Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Arighi A, Fumagalli GG, et al., "Autosomal dominant frontotemporal lobar degeneration due to the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: late-onset psychotic clinical presentation", *Biol Psychiatry*; 74(5):384-91, 2013.
31. Galimberti D, Fenoglio C, Lovati C, Venturelli E, Guidi I, Corrà B, Scalabrini D, Clerici F, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, "Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.*; 27(12):1763-8, 2006.
32. Gass JCannon, AMackenzie IR et al., "Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration", *Hum Mol Gene*; 15 (20) 2988-3001, 2006.
33. Gijselinck I., Van Langenhove T. et al., "A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study", *Lancet Neurol*, 11: 54-65, 2012.
34. Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A., "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences

and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease", *Neuron*, 3:519-526, 1989.

35. Goedert M., Jakes R., "Mutations causing neurodegenerative tauopathies", *Biochim. Biophys. Acta*; 1739:240-250, 2005.

36. Goldman JS, Farmer JM, Wood EM, Johnson JK, Boxer A, Neuhaus J, Lomen-Hoerth C, Wilhelmsen KC, Lee VM, Grossman M., "Comparison of family histories in FTLN subtypes and related tauopathies", *Neurology*, 2:1817–1819, 2005.

37. González-Scarano F, Baltuch G., "Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases", *Annu Rev Neurosci.*; 22:219-40, 1999.

38. Gorno-Tempini M.L., Brambati S.M., Ginex V., et al., "The logopenic/phonological variant of primary progressive aphasia", *Neurology*, 71:1227-1234, 2008.

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

40. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al., "Classification of primary progressive aphasia and its variants", *Neurology*; 76:1006-14, 2011.

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

42. Hantash F.M., Goos D.G., Tsao D., Quan F., Buller-Burckle A. et al.; "Qualitative assessment of FMR1 (CGG)n triplet repeat status in normal,

intermediate, premutation, full mutation, and mosaic carriers in both sexes: implications for fragile X syndrome carrier and newborn screening”; *Genet. Med.*, 12:162–173, 2010.

43. Hawkley LC, Cacioppo JT., “Stress and the aging immune system.”, *Brain Behav Immun*; 18(2):114-9, 2004.

44. He Z., Bateman A., “Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis”, *J. Mol. Med.* , 81:600–612, 2003.

45. Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP, “The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease”, *Ann N Y Acad Sci*, 991:214-28, 2003.

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

47. Holm I.E., Englund E., Mackenzie I.R., et al., “A reassessment of the neuropathology of frontotemporal dementia linked to chromosome 3”; *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66:884-891, 2007.

48. Holm IE, Isaacs AM, Mackenzie IR, “Absence of FUS-immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene”, *Acta Neuropathol*; 118 (5): 719-20, 2009.

49. Hou C.E., Carlin D., Miller B.L.; “Non-Alzheimer’s disease dementias: anatomic, clinical, and molecular correlates”; *Can. J. Psychiatry*, 49:164-171, 2004.

50. Huey ED, Goveia EN, Paviol S, Pardini M, Krueger F, Zamboni G, et al., "Executive dysfunction in frontotemporal dementia and corticobasal syndrome" *Neurology*, 72:453-9, 2009.
51. Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P., et al., "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17", *Nature*, 393:702–705, 1998.
52. Ito H, Fujita K, Nakamura M et al., "Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease", *Acta Neuropathol (Berl)*, 121: 555–557, 2011.
53. Josephs KA, Holton JL, Rossor MN et al., "Neurofilament inclusion body disease: a new proteinopathy?", *Brain*, 126:2291–2303, 2003.
54. Jung Y, Duffy JR, Josephs KA., "Primary progressive aphasia and apraxia of speech", *Semin Neurol.*; 33(4):342-7, 2013.
55. Kalehua AN, Nagel JE, Whelchel LM, Gides JJ, Pyle RS, Smith RJ, Kusiak JW, Taub DD., "Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 are involved in both excitotoxin-induced neurodegeneration and regeneration", *Exp Cell Res.*;297(1):197-211, 2004.
56. Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R., "Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases", *Ann Neurol*; 53(3):292-304, 2003.
57. Kertesz A., Davidson W., Fox H., "Frontal behavioral inventory: diagnostic criteria for frontal lobe dementia", *Can. J. Neurol. Sci.*, Vol. 24, pp. 29–36, 1997.
58. Kipps CM, Mioshi E, Hodges JR, "Emotion, social functioning and activities of daily living in frontotemporal dementia", *Neurocase*; 15:182- 9, 2009.

59. Knibb J.A., Xuereb J.H., Patterson K., “Clinical and pathological characterization of progressive aphasia”, *Ann. Neurol.*, Vol. 59, pp.156 –165, 2006.
60. Knopman DS, Roberts RO, “Estimating the number of persons with frontotemporal lobar degeneration in the US population”, *J Mol Neurosci*; 45 (3): 330-5, 2011.
61. Kreutzberg GW., “Microglia: a sensor for pathological events in the CNS”, *Trends Neurosci*; 19(8):312-8, 1996.
62. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL et al., “Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis”, *Science*; 323: 1205–1208, 2009.
63. Le Ber I, Guedj E, Gabelle A, et al., “Demographic, neurological and behavioural characteristics and brain perfusion SPECT in frontal variant of frontotemporal dementia”, *Brain*; 129:3051–3065, 2006.
64. Lendon CL, Lynch T, Norton J, McKeel DW Jr, Busfield F, Craddock N, Chakraverty S, Gopalakrishnan G, Shears SD, Grimmett W, Wilhelmsen KC, Hansen L, Morris JC, Goate AM, “Hereditary dysphasic disinhibition dementia: a frontotemporal dementia linked to 17q21–22”, *Neurology* 50:1546–1555, 1998.
65. Leyton CE, Ballard KJ, Piguet O, Hodges JR., “Phonologic errors as a clinical marker of the logopenic variant of PPA”, *Neurology*; 82(18):1620-7, 2014.

66. Lindquist SG, Duno M, Batbayli M, Puschmann A, Braendgaard H, Mardosiene S, Svenstrup K, Pinborg LH, Vestergaard K, Hjermind LE, Stokholm J, Andersen BB, Johannsen P, Nielsen JE, "Corticobasal and ataxia syndromes widen the spectrum of C9ORF72 hexanucleotide expansion disease", *Clin Genet.*, 83(3):279-83, 2013.
67. Lynch T., Sano M., Marder K.S., et al., "Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex", *Neurology*, 44:1878-1884, 1994.
68. Mackenzie I.R., Neumann M., Bigio E.H., et al., "Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update", *Acta Neuropathol.*, Vol. 119, pp. 1–4, 2010.
69. Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, et al., "Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations", *Acta Neuropathol*; 117 (1): 15-8, 2009.
70. Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, Yeatman T, Warrington EK, Schott JM, Fox NC, Rossor MN, Hardy J, Collinge J, Revesz T, Mead S, Warren JD, "Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: Clinical, neuroanatomical and neuropathological features", *Brain*, 135: 736-750, 2012.
71. Meisler MH, Grant AE, Jones JM, Lenk GM, He F, Todd PK, Kamali M, Albin RL, Lieberman AP, Langenecker SA, McInnis MG, "C9ORF72 expansion in a family with bipolar disorder", *Bipolar Disord.*; 15(3):326-32, 2013.
72. Mendez MF, Shapira J, Woods RJ, Licht EA, Saul RE, "Psychotic symptoms in frontotemporal dementia: Prevalence and review", *Dement Geriatr Cogn Disord*, 25: 206-211, 2008.

73. Mesulam MM., "Primary progressive aphasia-a language-based dementia", *N Engl J Med.*; 349:1535-42, 2003.
74. Mesulam MM, Weintraub S., "Spectrum of primary progressive aphasia", *Baillieres Clin. Neurol.*, Vol. 1, pp. 583– 609, 1992.
75. Mesulam MM, "Primary progressive aphasia", *Ann Neurol*, 49(4):425-32, 2001.
76. Mignarri A, Battistini S, Tomai Pitinca ML, Monti L, Burrioni L, Ginanneschi F, Ricci C, Bavazzano A, Federico A, Restagno G, Dotti MT, "Double trouble? Progranulin mutation and C9ORF72 repeat expansion in a case of primary non-fluent aphasia", *J Neurol Sci.*, 341(1-2):176-8, 2014.
77. Mioshi E., MSc, C. M. Kipps, FRACP, K. Dawson, RGN, J. Mitchell, BSc, A. Graham, MD and J. R. Hodges, "Activities of daily living in frontotemporal dementia and Alzheimer disease", *Neurology*, vol. 68 no. 24 2077-2084, 2007.
78. Müller K, Andersen PM, Hübers A, Marroquin N, Volk AE, Danzer KM, Meitinger T, Ludolph AC, Strom TM, Weishaupt JH, "Two novel mutations in conserved codons indicate that CHCHD10 is a gene associated with motor neuron disease", *Brain*, 2014. [Epub ahead of print]
79. Munoz DG, Neumann M, Kusaka H et al., FUS pathology in basophilic inclusion body disease", *Acta Neuropathol (Berl)*; 118:617–627, 2009.
80. Murray ME, Graff-Radford NR, Ross OA, Petersen RC, Duara R, Dickson DW, "Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study", *Lancet Neurol*; 10(9):785-96, 2011.

81. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J, Benson DF, "Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria", *Neurology*; 51(6):1546-54, 1998.
82. Neumann M, Roeber S, Kretzschmar HA, Rademakers R, Baker M, Mackenzie IR., "Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease", *Acta Neuropathol (Berl)*; 118: 605–616, 2009.
83. Ogar J.M., Dronkers N.F., Brambati S.M. et al., "Progressive nonfluent aphasia and its characteristic motor speech deficits", *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, Vol. 21, pp.S23–S30, 2007.
84. Pasquier F., Lebert F., Lavenu I., et al., "The clinical picture of frontotemporal dementia: diagnosis and follow-up", *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, Vol 10, suppl. 1, pp. 10– 14, 1999.
85. Peelaer H., Klijnsma K.Y., de Koning I., et al., "Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration", *J. Neurol.*, Vol. 257, pp. 747–753, 2010.
86. Pickering-Brown S, Hutton M., "The genetics of frontotemporal dementia" *Handb Clin Neurol*; 89:383-92, 2008.
87. Piguet O, Hornberger M, Mioshi E, Hodges JR., "Behavioural-variant frontotemporal dementia: diagnosis, clinical staging, and management", *Lancet Neurol.*, 10:162-72, 2011.
88. Poorkaj P., Bird T.D., Wijsman E., et al., "Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia", *Ann. Neurol.*, 43:815–825, 1998.

89. Postiglione A., Milan G., Pappata S., et al., "Fronto-temporal dementia presenting as Geschwind's syndrome", *Neurocase*, Vol. 14, pp. 264–270, 2008.
90. Rabinovici G.D., Jagust W.J., Furst A.J., et al., "Abeta amyloid and glucose metabolism in three variants of primary progressive aphasia"; *Ann. Neurol.*, 64:388-401, 2008.
91. Rabinovici GD, Miller BL., "Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management", *CNS drugs*; 24:375-98, 2010.
92. Rademakers R., Cruts M., Dermaut B., et al., "Tau negative frontal lobe dementia at 17q21: significant finemapping of the candidate region to a 4.8 cM interval", *Mol. Psychiatry*; 7 , 1064–1074, 2002.
93. Rademakers, R., et al., "Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia", *Hum. Mol. Genet.*, 17, 3631–3642, 2008.
94. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al., "Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia", *Brain*; 134:2456-77, 2011.
95. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, et al., "The prevalence of frontotemporal dementia", *Neurology*; 58 (11): 1615-21, 2002.
96. Renton A.E., Majounie E., Waite A., et al., "A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD", *Neuron*, 72:257-268, 2011.
97. Robinson AC, Thompson JC, Weedon L, Rollinson S, Pickering-Brown S, Snowden JS, Davidson YS, Mann DM., "No interaction between tau and TDP-

43 pathologies in either Frontotemporal Lobar Degeneration or Motor Neurone Disease”, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2014.

98. Rosso SM, Kamphorst W, de Graaf B, Willemsen R, Ravid R, Niermeijer MF, Spillantini MG, Heutink P, van Swieten JC, “Familial frontotemporal dementia with ubiquitin-positive inclusions is linked to chromosome 17q21–22”, *Brain*, 124:1948–1957, 2001.

99. Rizzu P., Van Swieten J.C., Joosse M., Hasegawa M., Stevens M., Tibben A. et al.; “High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands”, *American Journal of Human*, Vol. 64, no. 2, pp. 414-421, 1999.

100. Sailasuta N, Harris K, Tran T, Ross B., “Minimally invasive biomarker confirms glial activation present in Alzheimer's disease: a preliminary study”, *Neuropsychiatr Dis Treat*; 7:495-9, 2011.

101. Scarpini E., Galimberti D., Guidi I., et al., “Progressive, isolated language disturbance: its significance in a 65-year-old-man. A case report with implications for treatment and review of literature”; *J. Neurol. Sci.*, 240:45-51, 2006.

102. Schwartz M, Kipnis J., “A common vaccine for fighting neurodegenerative disorders: recharging immunity for homeostasis”, *Trends Pharmacol Sci.*, (8):407-12, 2004.

103. Sergeant N, Watzel A, Delacourte A., “Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively “exon 10” isoforms”, *J Neurochem*; 72: 1243–9, 1999.

104. Sha SJ, Takada LT, Rankin KP, Yokoyama JS, Rutherford NJ, Fong JC, Khan BK, Karydas A, Baker MC, DeJesus-Hernandez M, Pribadi M, Coppola G, Geschwind DH, Rademakers R, Lee SE, Seeley WW, Miller BL, Boxer AL, “Frontotemporal dementia due to C9ORF72 mutations: Clinical and imaging features”, *Neurology*, 79:1002-1011, 2012.
105. Shinagawa S., Ikeda M., Nestor P.J., et al., “Characteristics of abnormal eating behaviours in frontotemporal lobar degeneration: a crosscultural survey”, *J. Neurol. Neurosurg.Psychiatry*, Vol. 80, pp. 1413–1414, 2009.
106. Short RA, Graff-Radford NR, Adamson J, Baker M, Hutton M., “Differences in tau and apolipoprotein E polymorphism frequencies in sporadic frontotemporal lobar degeneration syndromes”, *Arch Neurol.*; 59(4):611-5, 2005.
107. Sieben A., Langenhove T. et al., “The Genetics and neuropathology of frontotemporal lobar de generation”, *Acta Neuropathol*, 124;353-372, 2012.
108. Sjögren M, Folkesson S, Blennow K, Tarkowski E., “Increased intrathecal inflammatory activity in frontotemporal dementia: pathophysiological implications”, *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 75(8):1107-11, 2004.
109. Snowden J, Rollinson S, Thompson JC, Harris JM, Stopford CL, Richardson AM, Jones M, Gerhard A, Davidson YS, Robinson A, Gibbons L, Hu Q, DuPlessis D, Neary D, Mann DM, Pickering-Brown SM, “Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations”, *Brain*, 135:693-708, 2012.
110. Snowden JS, Bathgate D, Varma A, Blackshaw A, Gibbons ZC, Neary D., “Distinct behavioural profiles in frontotemporal dementia and semantic dementia”, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 70:323–332, 2001.

111. Snowden JS, Neary D, Mann DM., "Frontotemporal dementia", *Br J Psychiatry*, 180: 140-3, 2002.
112. Spillantini M.G., Murrell J.R., Goedert M., et al., "Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:7737–7741, 1998.
113. Stevens M, van Duijn CM, Kamphorst W, de Knijff P, Heutink P, van Gool WA, Scheltens P, Ravid R, Oostra BA, Niermeijer MF, van Swieten JC., "Familial aggregation in frontotemporal dementia", *Neurology*.; 50(6):1541-5, 1998.
114. Suzuki M, Lee HC, Kayasuga Y, et al., "Roles of progranulin in sexual differentiation of the developing brain and adult neurogenesis", *J Reprod Dev*; 55 (4): 351-5, 2009.
115. Suzumura A, Sawada M, Mokuno K, Kato K, Marunouchi T, Yamamoto H., "Effects of microglia-derived cytokines on astrocyte proliferation", *Restor Neurol Neurosci.*, 5(5):347-52, 1993.
116. Taipa R, Pinho J, Melo-Pires M., "Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias", *Front Neurol.*; 3:68, 2012.
117. Tokami H, Ago T, Sugimori H, Kuroda J, Awano H, Suzuki K, Kiyohara Y, Kamouchi M, Kitazono T, "RANTES has a potential to play a neuroprotective role in an autocrine/paracrine manner after ischemic stroke", *Brain Res.*, 1517:122-32, 2013.
118. Tracey KJ, Cerami A., "Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target", *Annu Rev Med.*; 45:491-503, 1994.

119. Tsuchiya K, Matsunaga T, Aoki M et al., "Familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column degeneration and basophilic inclusion bodies: a clinical, genetic and pathological study", *Clin Neuropathol*, 20: 53–59, 2001.
120. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T et al., "Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6", *Science*; 323: 1208–1211, 2009.
121. Van Deerlin VM, Sleiman PM, Martinez-Lage M., "Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions", *Nat Genet*. 42(3):234-9, 2010.
122. Van der Zee J, Rademakers R, Engelborghs S, Gijselinck I, Bogaerts V, Vandenberghe R, Santens P, Caekebeke J, De Pooter T, Peeters K, Lübke U, Van den Broeck M, Martin JJ, Cruts M, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Dermaut B, "A Belgian ancestral haplotype harbours a highly prevalent mutation for 17q21-linked tau-negative FTL", *Brain*, 129:841–852, 2006.
123. Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Ghidoni R, Cortini F, Scalabrini D, Gallone S, Rainero I, Mandelli A, Restelli I, Binetti G, Cappa S, Mariani C, Giordana MT, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D, "The NOS3 G894T (Glu298Asp) polymorphism is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration", *Eur J Neurol.*, 16(1):37-42, 2009.
124. Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Gallone S, Cortini F, Serpente M, Cantoni C, Fumagalli G, Ridolfi E, Cappa S, Binetti G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D., "BAG1 is a protective factor for sporadic frontotemporal lobar degeneration but not for Alzheimer's disease", *J Alzheimers Dis*; 23(4):701-7, 2011.

125. Vieira RT, Caixeta L, Machado S, Silva AC, Nardi AE, Arias-Carrión O, Carta MG, “Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature”, *Clin Pract Epidemiol Ment Health*, 9:88-95, 2013.
126. Warner J.P, Barron L.H., Goudie D., Kelly K., Dow D., Fitzpatrick D.R., Brock D.J.H., “A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR”, *Med. Genet.*, 33:1022-1026, 1996.
127. Wohlfart G, Swank RL., “Pathology of amyotrophic lateral sclerosis. Fiber analysis of the ventral roots and pyramidal tracts of the spinal cord”, *Arch Neurol Psychiatry*; 46: 783–799, 1941.
128. Wood EM, Falcone D, Suh E, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Lee EB, Xie SX, Van Deerlin VM, Grossman M, “Development and validation of pedigree classification criteria for frontotemporal lobar degeneration”, *JAMA Neurol.*, 70(11):1411-7, 2013.
129. Yancopoulou D., Spillantini M.G., “Tau protein in familial and sporadic diseases”, *Neuromolecular Med.*, 4:37-48, 2003.
130. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S et al., “Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study”, *Acta Neuropathol (Berl)*, 115: 561–575, 2008.
131. Zamboni G., MD, E. D. Huey, MD, F. Krueger, PhD, P. F. Nichelli, MD and J. Grafman, “Apathy and disinhibition in frontotemporal dementia: insights into their neural correlates”, *Neurology*, 71:736-42, 2008.

PRODOTTI SCIENTIFICI

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

1. Transmembrane Protein 106B Gene (TMEM106B) Variability and Influence on Progranulin Plasma Levels in Patients with Alzheimer's Disease.

Serpente M, Fenoglio C, Clerici F, Bonsi R, Arosio B, Cioffi SM, Rotondo E, Franceschi M, Boneschi FM, Mari D, Mariani C, Scarpini E, Galimberti D.

J Alzheimers Dis. 2014 Aug 11. [Epub ahead of print]

2. Innate immune system and inflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to treatment.

Serpente M*, Bonsi R*, Scarpini E, Galimberti D.

Neuroimmunomodulation. 2014;21(2-3):79-87. doi: 10.1159/000356529. Epub 2014 Feb 14.

3. Incomplete penetrance of the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions: frequency in a cohort of geriatric non-demented subjects.

Galimberti D, Arosio B, Fenoglio C, Serpente M, Cioffi SM, Bonsi R, Rossi P, Abbate C, Mari D, Scarpini E.

J Alzheimers Dis. 2014;39(1):19-22. doi: 10.3233/JAD-131172.

4. Autosomal dominant frontotemporal lobar degeneration due to the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: late-onset psychotic clinical presentation.

Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, Villa C, Bonsi R, Arighi A, Fumagalli GG, Del Bo R, Bruni AC, Anfossi M, Clodomiro A, Cupidi C, Nacmias B, Sorbi S, Piaceri I, Bagnoli S, Bessi V, Marcone A, Cerami C, Cappa SF, Filippi M, Agosta F, Magnani G, Comi G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Rubino E, Ferrero P, Rogaeva E, Xi Z, Confaloni A, Piscopo P, Bruno G, Talarico G, Cagnin A, Clerici F, Dell'Osso B, Comi GP, Altamura AC, Mariani C, Scarpini E.

Biol Psychiatry. 2013 Sep 1;74(5):384-91. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.01.031. Epub 2013 Mar 7.

5. Early onset behavioral variant frontotemporal dementia due to the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: psychiatric clinical presentations.

Arighi A, Fumagalli GG, Jacini F, Fenoglio C, Ghezzi L, Pietroboni AM, De Riz M, Serpente M, Ridolfi E, Bonsi R, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D.

J Alzheimers Dis. 2012;31(2):447-52. doi: 10.3233/JAD-2012-120523.

RINGRAZIAMENTI

Parte della ricerca svolta in questo studio è stata possibile grazie ai fondi del Ministero della Salute (ricerca corrente e finalizzata). La realizzazione di questa tesi di dottorato inoltre è stata possibile grazie al sostegno di molte persone. Desidero quindi ringraziare:

La Dott.ssa Daniela Galimberti, per avermi seguito durante lo svolgimento del Dottorato di Ricerca, con consigli e confronti, che mi hanno aiutato ad intraprendere le scelte più appropriate.

Il Prof. Elio Scarpini, che in veste di relatore della tesi di Dottorato si è dimostrato estremamente disponibile e pronto al dialogo.

La Dott.ssa Chiara Fenoglio, per la continua disponibilità, prontezza nei chiarimenti e suggerimenti.

Sara, Maria, Chiara, Elisa 1 e 2, Cinzia, Serena per avermi accompagnata e sostenuta in questo percorso, senza di voi non ce l'avrei mai fatta!!