

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche

Dottorato in Neuroscienze XXIII ciclo



MUTAZIONI NEL GENE TAU ASSOCIATE AD
INSTABILITÀ CROMOSOMICA: UN NUOVO RUOLO
DELLA PROTEINA TAU.
STUDIO NEL TOPO TRANSGENICO.

Coordinatore: Chiar. mo Prof. Giovanni TREDICI

Tutore: Chiar. ma Prof. ssa Leda DALPRÀ

Tesi di Dottorato di:

Donatella CONCONI

Matricola 041468

Anno Accademico 2009-2010

ABBREVIAZIONI	5
<i>Riassunto</i>	6
<i>Introduzione</i>	9
1. IL GENE	10
1.1 POLIMORFISMI	10
1.2 ORGANIZZAZIONE ED ESPRESSIONE	11
1.3 SAITOHINA	12
2. LA PROTEINA	13
2.1 DOMINI PROTEICI	13
2.2 MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI	14
2.2.1 FOSFORILAZIONE	15
2.2.2 O-GLICOSILAZIONE	16
2.2.3 ALTRE MODIFICAZIONI	16
2.3 PROTEINE ASSOCIATE	16
2.4 LOCALIZZAZIONE CELLULARE	17
2.5 FUNZIONE BIOLOGICA	17
3. MECCANISMI PATOLOGICI	19
3.1 PATOLOGIA TAU	19
3.2 MECCANISMI	20
3.3 AGGREGAZIONE	23
3.4 MODIFICAZIONI DELLA TAU PATOLOGICA	27
3.4.1 UBIQUITINAZIONE	27
3.4.2 GLICAZIONE	27
3.4.3 POTENZIALE REDOX NEURONALE	28
3.4.4 GLICOSILAZIONE	29
3.4.5 TRANSGLUTAMINASI	29
3.4.6 PROTEOLISI	29
3.5 COFATTORI	30
3.5.1 APOLIPOPROTEINA E	30
3.5.2 GLICOSAMINOGLICANI	30
3.5.3 ALTRI POLIANIONI	31

3.5.4 ALLUMINIO	31
3.6 TOSSICITÀ	31
3.6.1 SEQUESTRO DELLE MAP	32
3.6.2 DINAMICA DEI MICROTUBULI	32
3.6.3 TRAFFICO INTRACELLULARE	33
3.6.4 INIBIZIONE DELLE PROTEASI	34
3.6.5 AGGREGAZIONE	35
3.6.6 FUNZIONI COGNITIVE	36
3.6.7 CONTROVERSIE SULLA TOSSICITÀ	36
3.7 EFFETTI NEUROPROTETTIVI	39
3.7.1 SOPRAVVIVENZA DEI NEURONI	39
3.7.2 DANNI OSSIDATIVI	39
3.7.3 APOPTOSI	40
4. TAUPATIE	42
4.1 ALZHEIMER	42
4.2 PARKINSONISMO CON DEMENZA	44
4.3 PARKINSONISMO POSTENCEFALITICO	44
4.4 MALATTIA DI GUAM	45
4.5 PARALISI SOPRANUCLEARE PROGRESSIVA	46
4.6 DEGENERAZIONE CORTICOBASALE	47
4.7 MALATTIA DI PICK	47
4.8 SINDROME DI DOWN	48
4.9 MALATTIA DI NIEMANN-PICK DI TIPO C	49
4.10 MANCANZA DI PATOLOGIA IN ALCUNI NEURONI	49
5. DEMENZA FRONTOTEMPORALE	50
5.1 ASPETTI GENERALI	50
5.2 ETÀ D'ESORDIO	51
5.3 MUTAZIONI	51
5.4 MECCANISMI MOLECOLARI	51
5.5 RILEVANZA DELLE MUTAZIONI IN TAUPATIE SPORADICHE	54
6. MODELLI ANIMALI	55

6.1 EUCARIOTI INFERIORI	55
6.2 MODELLI MURINI	56
<i>Scopo</i>	60
<i>Materiali e metodi</i>	62
1. ANIMALI	63
2. LINFOCITI DA SANGUE PERIFERICO	64
3. LINFOCITI SPLENICI	65
4. FIBROBLASTI	65
5. CELLULE STAMINALI NEURALI	66
5.1 ANALISI DIRETTA	66
5.2 ANALISI DELLE NEUROSFERE	66
6. ANALISI CITOGENETICA	67
7. ANALISI STATISTICA	67
8. SOLUZIONI	67
<i>Risultati</i>	68
1. RICERCA DELL'EFFETTO DI TAU MUTATA SULLA CROMATINA E SULLA SEGREGAZIONE CROMOSOMICA	69
1.1 LINFOCITI	69
1.2 LINFOCITI DA MILZA	69
1.3 FIBROBLASTI	78
1.4 CELLULE STAMINALI NEURALI	82
1.4.1 ANALISI DIRETTA	82
1.4.2 ANALISI NEUROSFERE	84
<i>Discussione</i>	91
<i>Bibliografia</i>	99
<i>Ringraziamenti</i>	131

MAPs: proteine associate ai microtubuli

MAPT: proteina tau associata ai microtubuli

NFT: grovigli neurofibrillari

PHF: filamenti a doppia elica

AD: Alzheimer

FTD: Demenza frontotemporale

Riassunto

Tau è una proteina associata ai microtubuli che ne promuove l'assemblaggio e la stabilizzazione. Condizioni patologiche (taupatie) provocano l'iperfosforilazione della proteina che si distacca dai microtubuli con conseguente distruzione del citoscheletro e formazione dei grovigli neurofibrillari.

Le taupatie di origine genetica sono causate da mutazioni dominanti nel gene MAPT (*Microtubule-Associated Protein Tau*); la più comune è la P301L, associata alla demenza frontotemporale. Modelli animali transgenici per questa mutazione sviluppano deficit motori e comportamentali dovuti alla deposizione, dipendente dall'età e dalla dose, dei grovigli neurofibrillari. Gli animali, inoltre, mostrano gliosi, neuropatia periferica e atrofia muscolare. Il fenotipo murino riproduce le caratteristiche della patologia umana e fornisce un ottimo modello per lo studio della proteina.

Lo scopo del progetto di ricerca è stato quello di valutare il ruolo di tau nella stabilità cromosomica, suggerito dalla sua interazione sia con i microtubuli che con la cromatina, in un modello animale di topo transgenico per la mutazione P301L. Sono stati analizzati linfociti splenici, fibroblasti e cellule derivate dalla zona sottoventricolare (SVZ) di topi transgenici per la proteina tau umana mutata (JNPL3) e wild-type (JN25) e di topi controllo della stessa famiglia, ma senza transgene.

L'analisi degli splenociti ha mostrato una differenza significativa nel numero di aneuploidie tra i topi JNPL3 ed i controlli, ma anche tra i topi JNPL3 ed i JN25, suggerendo che il livello di aneuploidia non sia determinato dal semplice inserimento di un transgene, ma correlato con la presenza specifica del transgene mutato. È stata, inoltre, osservata una differenza significativa tra gli animali JNPL3 omozigoti ed emizigoti, suggerendo che possa esserci un effetto di dosaggio genico.

L'analisi dei fibroblasti al primo passaggio di coltura ha mostrato una differenza statisticamente significativa nel numero di aneuploidie tra i controlli e gli omozigoti JNPL3. L'analisi dei fibroblasti JNPL3 a diversi passaggi di coltura ha mostrato un incremento di cellule aneuploidi con l'aumentare dei passaggi e la comparsa di riarrangiamenti strutturali. Questi risultati, tuttavia, potrebbero essere dovuti all'effetto della coltura *in vitro* e richiedono quindi di essere confrontati con i controlli.

Il vantaggio dello studio sul modello animale è la possibilità di valutare la stabilità cromosomica direttamente nel sistema nervoso centrale, target principale della

patologia. Per questo sono state prelevate ed analizzate dopo un tempo brevissimo di coltura (5 ore) le zone sottoventricolari, aree ricche di cellule staminali e precursori neurali, di topi omozigoti JNPL3 di 5-10 giorni. I risultati ottenuti indicano che, in condizioni fisiologiche, più della metà delle cellule neurali dei topi omozigoti JNPL3 è ipodiploide (53%). Questo dato può essere correlato con quelli presenti in letteratura su neuroprogenitori aneuploidi isolati da normali SVZ murine (Rehen et al., 2001, Kaushal et al., 2003), che mostrano una percentuale di aneuploidia (33%) che differisce in modo statisticamente significativo rispetto ai nostri dati.

L'analisi delle cellule staminali neurali isolate dalle SVZ e mantenute in coltura come neurosfere (NSC) ha permesso di valutare il livello di aneuploidie nel tempo. L'analisi citogenetica delle NSC ha mostrato un livello più alto di aberrazioni cromosomiche nei topi JNPL3 rispetto ai controlli, in particolare di aberrazioni strutturali. Sono inoltre presenti degenerazione cromatinica e difetti di condensazione dei cromosomi, non presenti nei controlli.

Questi dati suggeriscono un ruolo rilevante di tau nella stabilità cromosomica.

Introduzione

I neuroni sono cellule con morfologia molto complessa che si sviluppa in due tipi di estensioni citoplasmatiche, gli assoni e i dendriti. La determinante intracellulare principale per il mantenimento della morfologia cellulare è il citoscheletro, composto da tre componenti principali: i microtubuli, i microfilamenti e i filamenti intermedi. I microtubuli sono strutture molto dinamiche e, nelle cellule proliferanti (ad esempio i neuroblasti), l'equilibrio tra la loro polimerizzazione e depolimerizzazione mantiene la morfologia sferica, che viene persa durante il differenziamento con la loro stabilizzazione in direzioni specifiche (Mitchison et al., 1988). Il ruolo della dinamica dei microtubuli è molto più conosciuto nei processi di mitosi e di divisione cellulare, dove gioca un ruolo centrale nell'assemblaggio del fuso mitotico e nella segregazione cromosomica, ma è fondamentale anche nei neuroni post-mitotici per il ruolo critico nello stabilire la polarità cellulare, nella crescita assonale, nell'adesione e nella comunicazione cellulare.

La regolazione della dinamica e della stabilità dei microtubuli è mediata da numerose proteine regolatorie, tra cui le MAPs (*microtubule-associated proteins*). Sono state identificate due classi di MAPs nel cervello dei vertebrati: le MAPs ad alto peso molecolare e la proteina tau. Tau fu scoperta quasi contemporaneamente in Europa e negli Stati Uniti, come proteina che abbassava la concentrazione a cui la tubulina polimerizzava nei microtubuli cerebrali (Weingarten et al., 1975, Fellous et al., 1977).

1. IL GENE

1.1 POLIMORFISMI

Il gene che codifica per la proteina tau è MAPT (*Microtubule-Associated Protein Tau*). Il gene presenta un'inversione polimorfica che dà origine a due aplotipi principali: l'aplotipo H1, il più comune, che comprende la sequenza non invertita e l'aplotipo H2, che comprende la regione invertita e che include altri geni. Il lineage H2 è presente con una frequenza più alta in Sud Asia e Sud Europa (circa 30%), in Europa varia dal 5 al 28%, mentre è inferiore al 10% in Africa, Asia e America (Donnelly et al., 2010). L'aplotipo H1 risulta essere maggiormente rappresentato in modo significativo in persone affette da taupatie sporadiche come demenza frontotemporale (Verpillat et al., 2002), paralisi sopranucleare progressiva (Baker et al., 1999), degenerazione

corticobasale (Houlden et al., 2001) e Alzheimer (Myers et al., 2005). Una spiegazione di questa maggiore suscettibilità potrebbe risiedere nel fatto che il promotore H1 sembra essere più efficiente del promotore H2 e che, quindi, il livello più alto di proteina sia un fattore di rischio (Kwok et al., 2004).

1.2 ORGANIZZAZIONE ED ESPRESSIONE

Il gene MAPT (MIM#157140) è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q21) (Neve et al., 1986), si estende per circa 100 Kb e contiene 16 esoni. Sono presenti due isole CpG, una associata al promotore, l'altra all'esone 9 (Andreadis et al., 1992). Nella regione 5' è presente un esone non trascritto. A monte di questo esone ci sono diverse sequenze di DNA che contengono siti di legame consenso per fattori AP2 e SP1, responsabili dell'inizio della trascrizione in promotori privi della sequenza TATA (Buée et al., 2000).

Dei 16 esoni del trascritto primario, tre (4A, 6 e 8) non sono presenti nel mRNA cerebrale. L'esone -1 è parte del promotore, è trascritto, ma non tradotto, così come l'esone 14. Gli esoni 2, 3 e 10 vanno incontro a splicing alternativo dando origine a sei diverse isoforme (Fig.1). L'espressione delle diverse isoforme con diverso numero di esoni è tipica durante lo sviluppo cerebrale. Infatti, quelle che mancano dell'esone 10 sono state trovate negli stadi precoci dello sviluppo, o in specifici tipi cellulari, come cellule granulari o del giro dentato (Goedert et al., 1989a).

Le isoforme contenenti gli esoni 2, 3 e 10 alternativamente, sono specifiche del cervello adulto. L'esone 3 non appare mai senza l'esone 2. Nel sistema nervoso periferico è presente un'isoforma di tau ad alto peso molecolare (circa 100 kDa), detta *big tau*, che esprime l'esone 4A nella regione ammino-terminale (Goedert et al., 1992).

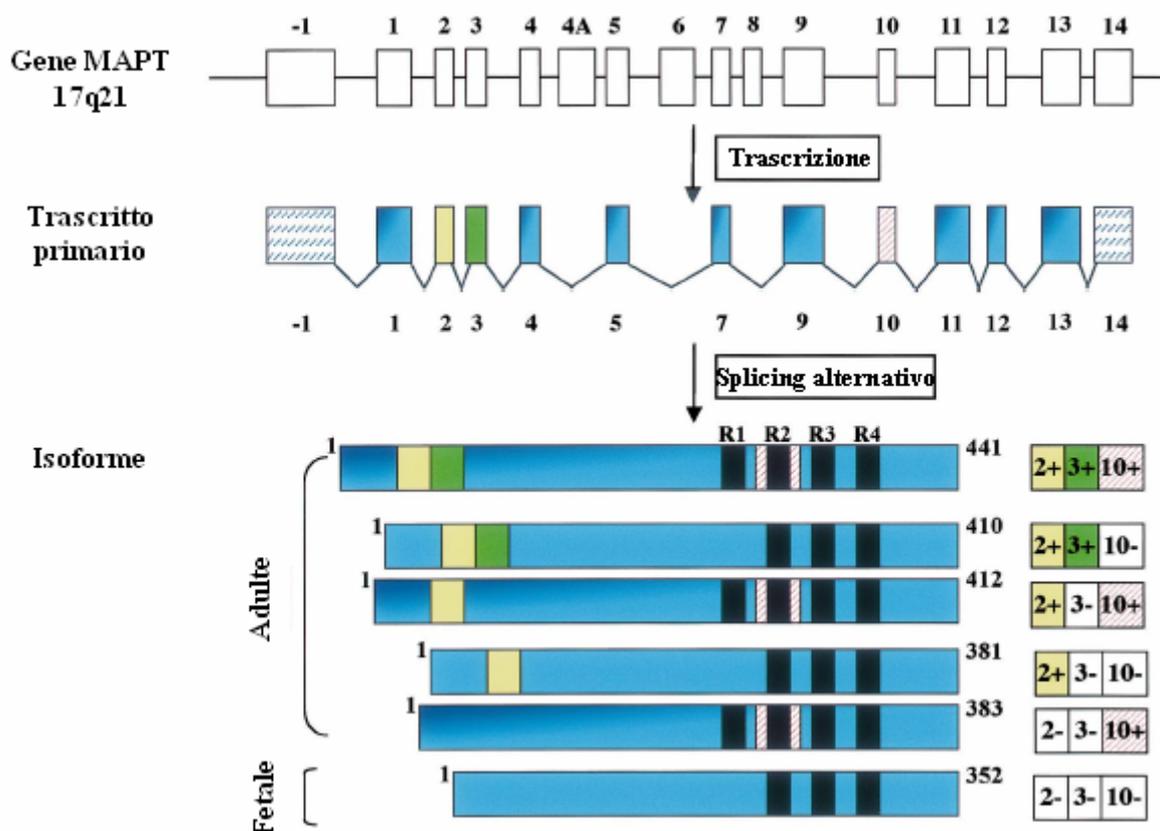


Fig.1: Rappresentazione schematica del gene, del trascritto primario e delle sei isoforme di tau (mod. da Buée et al., 2000).

1.3 SAITOHINA

Recentemente è stato identificato un gene interno a MAPT, chiamato saitoquina, in un introne a 2.5 Kb a valle dell'esone 9 (Conrad et al., 2002; Fig.2). Questo gene è privo di introni e codifica per una proteina di 128 amminoacidi che non sembra avere una chiara omologia con altre proteine e che, attualmente, non è ancora stata isolata e caratterizzata. Nonostante la localizzazione, sembra che saitoquina e tau non siano sotto la regolazione dello stesso promotore, poiché non mostrano la stessa espressione tissutale, ma potrebbero condividere alcuni elementi regolatori. La posizione a monte dell'esone 10 (soggetto a splicing alternativo) non ne influenza l'espressione nel sistema nervoso centrale e negli altri tessuti.

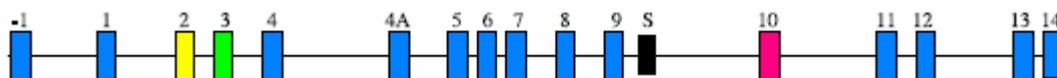


Fig.2: Localizzazione della saitoquina all'interno del gene MAPT (mod. da Avila et al., 2004).

Durante il sequenziamento del gene è stato identificato un polimorfismo di singolo nucleotide che sembra essere correlato con una maggiore incidenza di Alzheimer (Conrad et al., 2002), ma questo dato non è stato confermato (Verpillat et al., 2002).

2. LA PROTEINA

Nei neuroni del sistema nervoso centrale la proteina tau è costituita da una famiglia di sei isoforme che variano da 352 a 441 amminoacidi, con un peso molecolare che varia da 45 a 65 kDa. Le varianti differiscono per la presenza (o l'assenza) di due esoni localizzati nella regione N-terminale e per la presenza (o l'assenza) di un esone localizzato nella regione C-terminale (Goedert et al., 1989b; Fig.1). Tau promuove la polimerizzazione della tubulina *in vitro* ed è coinvolta nel trasporto assonale.

2.1 DOMINI PROTEICI

La proteina può essere suddivisa in due domini principali: il dominio di proiezione nella parte N-terminale, che comprende i due terzi della molecola e il dominio di legame ai microtubuli nella regione C-terminale (Fig.3).

La regione ammino-terminale può essere ulteriormente divisa in due regioni: la regione ricca di residui acidi, che comprende i due esoni addizionali e quella ricca di prolina. La regione acida differisce per la presenza o l'assenza di uno o due inserti, che danno origine alle isoforme 0N, 1N e 2N. Sono stati proposti numerosi ruoli per questo dominio, tra cui la stabilizzazione e l'organizzazione dello spazio tra i microtubuli assonali. Questo può essere osservato nel sistema nervoso periferico, dove gli assoni hanno un diametro più largo dovuto alla presenza dell'esone addizionale 4A. Inoltre, sembra che questo dominio possa permettere l'interazione con altri elementi citoscheletrici, come i neurofilamenti, e con la membrana plasmatica.

Il dominio di legame ai microtubuli contiene tre (3R) o quattro (4R) sequenze ripetute (dovute allo splicing dell'esone 10) di 31 o 32 residui, simili ma non

identiche. Queste regioni ripetute (R1-R4) sono codificate dagli esoni 9-12 e sono costituite da una sequenza altamente conservata di 18 amminoacidi, che contiene la regione di legame alla tubulina, e da una sequenza poco conservata di 13 o 14 amminoacidi (detta inter-regione). È stato dimostrato che le isoforme a quattro ripetizioni promuovono più efficacemente l'assemblaggio dei microtubuli rispetto a quelle a tre ripetizioni (Goedert et al., 1990). Sorprendentemente, la parte che promuove in modo più forte la polimerizzazione è l'inter-regione tra R1 e R2. Questa inter-regione è esclusiva delle isoforme 4R specifiche dell'adulto ed è responsabile della differenza di affinità di legame (circa 40 volte) tra le tau 3R e le 4R (Goode et al., 1994). Il rapporto tra le isoforme a 3 e a 4 ripetizioni nel cervello adulto normale è 1:1 (D'Souza et al., 2005).

Ci sono evidenze di un possibile ruolo del dominio di legame ai microtubuli nella modulazione dello stato di fosforilazione di tau. È stato dimostrato un legame diretto e competitivo per questa regione (residui 224-236 nell'isoforma più lunga) da parte dei microtubuli e della fosfatasi 2A (PP2A), suggerendo che la competizione per il legame a tau possa inibire l'attività di PP2A (Sontag et al., 1999).

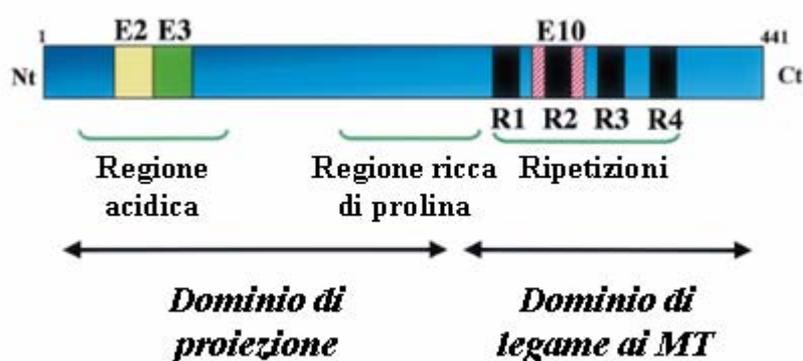


Fig.3: Rappresentazione schematica dei domini funzionali dell'isoforma tau più lunga (mod. da Buée et al., 2000).

2.2 MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI

Durante il normale sviluppo, tau va incontro a numerose modificazioni post-traduzionali, di cui la più studiata è la fosforilazione. Un aumento di tau modificata è stato trovato in un gran numero di patologie neurodegenerative. Tutte le

modificazioni, eccetto la glicazione, sono presenti a basso livello in condizioni fisiologiche (Wang et al., 2008).

2.2.1 FOSFORILAZIONE

Tau è una fosfoproteina con 80 putativi siti di fosforilazione in serina (45) e treonina (35) nell'isoforma più lunga (441 residui). Le chinasi che agiscono su questi siti sono state divise in due gruppi principali: chinasi prolina dirette (PDPK) e non-prolina dirette (NPDPK) (Morishima-Kawashima et al., 1995). Al primo gruppo appartengono la proteina tau chinasi I (GSK3), la proteina tau chinasi II (cdk5), una MAP chinasi (p38), JNK e altre stress chinasi, come cdc2; al secondo la proteina chinasi A (PKA), la proteina chinasi C (PKC), la CaM chinasi II e le MARK chinasi (Hernandez et al., 2007).

La fosforilazione da parte delle NPDPK avviene all'interno della regione di legame ai microtubuli e risulta in una diminuzione del legame (Biernat et al., 1993), mentre le PDPK sembrano influenzare l'auto-aggregazione di tau (Garcia de Ancos et al., 1993). Per GSK3 sono stati ipotizzati due tipi di meccanismi di fosforilazione: uno che richiede una fosforilazione precedente del substrato da parte di un'altra chinasi e che sembra essere quello utilizzato nella regione di legame ai microtubuli (Thr-231) e l'altro, diretto, che non sembra avere effetti sui microtubuli (Ser-396 o -404) (Avila et al., 2004). Oltre alle modificazioni su serina e treonina sono state riportate fosforilazioni sulle tirosine, negli stadi precoci di sviluppo, da parte di una proteina della famiglia src (Lee et al., 2004).

Le fosfatasi PP1, PP2A, PP2B (calcineurina) e PP2C sono presenti nel cervello ed implicate nella defosforilazione di tau. Possono essere associate direttamente o indirettamente ai microtubuli, infatti, è stato dimostrato che tau agisce da collegamento tra PP1 e la tubulina, mentre PP2A è direttamente legata ai microtubuli attraverso interazioni ioniche (Buée et al., 2000). Per alcuni residui modificati dalle PDPK, PP2A può richiedere l'azione della chaperonina Pin-1 (Lu et al., 1999).

La fosforilazione di tau è strettamente regolata durante lo sviluppo; è elevata nei neuroni fetali (che contengono solo tau 3R) e diminuisce con l'età a causa della comparsa delle isoforme adulte e della modificazione del rapporto tra chinasi e

fosfatasi, per attivazione delle fosfatasi (Buée et al., 2000). Inoltre, tau è presente in tutti i compartimenti cellulari, ma con diversi stati fosforilativi. La fosforilazione, insieme al tipo di isoforma, modula le proprietà di tau. A sua volta tau è responsabile delle caratteristiche fisiche dei microtubuli (rigidità, lunghezza, stabilità) e, attraverso la regolazione del loro assemblaggio, della modulazione dell'organizzazione funzionale dei neuroni, in particolare della morfologia assonale, della crescita e della polarità.

2.2.2 O-GLICOSILAZIONE

L'*O*-glicosilazione è caratterizzata dall'aggiunta di un residuo di *O*-linked *N*-acetilglucosamina (*O*-GlcNAc) a serine e treonine in prossimità di proline. La relazione tra glicosilazione e fosforilazione sembrerebbe giocare un ruolo nella localizzazione nucleare di tau. Inoltre, l'*O*-glicosilazione sembra mediarne l'interazione con la tubulina e potrebbe inoltre giocare un ruolo nella degradazione (Arnold et al., 1996).

2.2.3 ALTRE MODIFICAZIONI

Tau va incontro anche a glicazione (solo in condizioni patologiche), ubiquitinazione, troncamento, deamidazione e ossidazione. Il legame all'ubiquitina è fondamentale per la degradazione da parte del proteasoma in modo ATP-dipendente. Tau è degradata anche da diverse proteasi, la fosforilazione aumenta la resistenza alla proteolisi.

Troncamento (taglio al residuo 391), deamidazione e ossidazione sembrano giocare un ruolo nell'aggregazione di tau (Avila et al., 2004).

2.3 PROTEINE ASSOCIATE

Tau ha un elevato numero di proteine associate; tra queste la tubulina è la più conosciuta e la più ampiamente studiata. Il legame avviene in un sito nella regione carbossi-terminale della tubulina (Serrano et al., 1985), probabilmente attraverso un'interazione ionica. Oltre alla tubulina, tau può legare altre proteine, come spectrina, actina, PP1 e PP2, le chinasi coinvolte nelle modificazioni post-traduzionali (come cdk5), presenilina 1 (attraverso la regione che lega anche GSK3), α -sinucleina e ferritina (Avila et al., 2004). Alcuni di questi legami possono avvenire nella regione

ammino-terminale, dove esiste un motivo che può legare il dominio SH3, oppure nella regione di legame alla tubulina, dando vita ad un'ovvia competizione per il legame a tau.

2.4 LOCALIZZAZIONE CELLULARE

Tau è una proteina associata ai microtubuli, necessaria per la loro polimerizzazione e stabilizzazione, tuttavia sono state identificate altre localizzazioni non-microtubulari. Oltre alla localizzazione citoscheletrica, tau è stata trovata associata ai ribosomi e al compartimento somatodendritico dei neuroni e delle cellule gliali (Papasozomenos et al., 1991), o alla membrana plasmatica (Brandt et al., 1995), con un'interazione modulata dalla fosforilazione.

Inoltre, è stata dimostrata la presenza di tau nelle regioni fibrillari dei nucleoli interfascici e nelle NORs (nucleolar organizer regions) dei cromosomi acrocentrici in mitosi. Tau sembra colocalizzare con la nucleolina nella periferia interna dei nucleoli e con le sequenze di DNA α -satellite dei cromosomi.

Più recentemente tau è stata identificata nei nuclei di cellule neuronali e non. È stata osservata, inoltre, in cellule non neuronali, come fibroblasti, linfoblasti, cellule HeLa (Thurston et al., 1996) e cellule di epatoma umano (Cross et al., 2000). La purificazione della tau nucleare dalle cellule di epatoma e dai fibroblasti ha dimostrato che la proteina mantiene la capacità di promuovere la polimerizzazione della tubulina *in vitro* avendo, quindi, caratteristiche strutturali e funzionali comuni a quella cerebrale.

Durante lo sviluppo neuronale la fosforilazione di tau sembra influenzarne la distribuzione. La proteina fosforilata nella regione ricca di prolina è presente soprattutto nel compartimento somatodendritico, mentre la defosforilazione di questa regione rilocalizza la proteina al compartimento distale degli assoni (Mandell et al., 1996). Inoltre, la proteina fosforilata nel dominio carbossi-terminale è localizzata soprattutto nella regione distale degli assoni (Dotti et al., 1987).

2.5 FUNZIONE BIOLOGICA

La funzione biologica maggiore di tau è quella di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli (Weingarten et al., 1975) e mantenerne la stabilità, fondamentale per il

trasporto assonale. Inoltre, l'interazione di tau con diverse proteine strutturali e funzionali suggerisce che possa giocare un ruolo cruciale anche nella trasduzione del segnale nei neuroni. Più recentemente è stato dimostrato che tau partecipa anche alla regolazione del traffico cellulare (Li et al., 2007).

In particolare, la funzione del dominio di proiezione non è stata ancora completamente chiarita. È stato ipotizzato che questa regione di tau determini lo spazio tra i microtubuli negli assoni e nei dendriti dei neuroni (Chen et al., 1992). Sembra interagire con altre proteine del citoscheletro, come le proteine dei neurofilamenti (Hirokawa et al., 1988), che svolgono un importante ruolo nel mantenimento dell'architettura dei neuroni. Inoltre, grazie alla presenza dei residui acidi può legare cationi, come il ferro.

Tau può legare le proteine associate alla membrana plasmatica, specialmente quelle con i domini SH3, come fyn o altri membri della famiglia src. Questo legame porta ad una fosforilazione della tirosina (Tyr18) che, al contrario di quelle di serina e treonina, non influenza il legame ai microtubuli. Nelle cellule neuronali l'importanza della fosforilazione della tirosina per la funzione del cono di crescita è ormai nota (Goldberg et al., 1996); infatti, topi privi di fyn o src mostrano difetti nella crescita del neurite (Ignelzi et al., 1994). Questa fosforilazione di tau può, infine, supportare il suo possibile ruolo nella trasduzione del segnale neuronale.

Il dominio di legame ai microtubuli è responsabile della funzione biologica più classica di tau, legare e promuovere l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli. Questo ruolo è stato enfatizzato quando, grazie all'uso di oligonucleotidi antisenso, si è dimostrato un suo coinvolgimento nella crescita del neurite (Caceres et al., 1990). Inoltre, in cellule non neuronali l'espressione di tau induce la formazione di lunghe estroflessioni citoplasmatiche (Knops et al., 1991). Tau può legare i microtubuli in due modi: quando il legame si verifica su microtubuli precedentemente assemblati, lega la superficie esterna (Al-Bassam et al., 2002), mentre se tau è unita alla tubulina e poi assemblata, rimane incorporata nei microtubuli in crescita come struttura integrata (Kar et al., 2003).

Nonostante tau abbia ruoli molto importanti nei neuroni, ha omologia e funzioni simili alle altre MAPs, come MAP2 o MAP3, questo spiega perché topi knock-out per il gene possano sopravvivere.

Si conosce ancora poco sui possibili ruoli di tau nel nucleo, come ad esempio la regolazione dell'espressione genica. Recentemente è stato dimostrato che tau può legare il DNA a doppia e a singola elica (Hua et al., 2003), in modo aggregazione dipendente e fosforilazione indipendente (Hua et al., 2002). Questa interazione protegge il DNA dalla denaturazione *in vitro*. Osservazioni più recenti descrivono la capacità della proteina di indurre un cambiamento conformazionale nel DNA, con un rapporto di una molecola di tau per 700 paia di basi (Qu et al., 2004).

Infine, poiché è stata dimostrata la presenza di tau nelle regioni fibrillari dei nucleoli interfascici e nelle NORs, è stato proposto un suo possibile ruolo nell'organizzazione nucleolare e nell'eterocromatinizzazione di una porzione di geni del rRNA (Sjoberg et al., 2006).

3. MECCANISMI PATOLOGICI

3.1 PATOLOGIA TAU

Alterazioni nella quantità o nella struttura della proteina tau possono influenzare il suo ruolo come stabilizzatore dei microtubuli e negli altri processi in cui è implicata. Cambiamenti nell'organizzazione dei microtubuli possono a loro volta influenzare la localizzazione e l'organizzazione di altre strutture subcellulari, come i mitocondri (Nangaku et al., 1994) e i lisosomi (Collot et al., 1984) con effetti patologici. È noto che la fosforilazione di tau porti ad una diminuzione della sua interazione con i microtubuli, infatti, la tau iperfosforilata è la componente essenziale di diversi aggregati aberranti trovati nei neuroni (e talvolta nella glia) di pazienti con patologie neurologiche chiamate taupatie.

La taupatia più conosciuta è l'Alzheimer (AD), caratterizzata dalla presenza di due strutture patologiche principali nel cervello dei pazienti: le placche senili (composte dal peptide β -amiloide) e i grovigli neurofibrillari (neurofibrillary tangles, NFT). Gli NFT sono composti da filamenti a doppia elica (paired helical filaments, PHF) di tau iperfosforilata (Ihara et al., 1986). La formazione di placche senili e NFT è legata all'invecchiamento anche tra i soggetti sani (Alzheimer, 1907). Tuttavia, la frequenza degli NFT correla con la demenza meglio di quella delle placche senili (Arriagada et

al., 1992). Pertanto, non è sorprendente che le patologie che portano all'accumulo di tau iperfosforilata siano associate a demenza.

È importante sottolineare che le diverse taupatie coinvolgono diversi tipi di neuroni. Ad esempio, nella paralisi sopranucleare progressiva (PSP), sono interessati i neuroni del tronco encefalico e i gangli della base (Hauw et al., 1990) nell'AD, sono colpiti i neuroni ippocampali e corticali e nella demenza frontotemporale è affetta la corteccia frontotemporale.

3.2 MECCANISMI

Nelle taupatie la proteina tau è fosforilata in modo aberrante con un meccanismo che sembra essere diverso nelle diverse forme patologiche. Tuttavia, non è ancora chiaro se la fosforilazione di tau possa tradursi in un guadagno di specifiche funzioni sconosciute o se porti solo ad un'alterazione delle funzioni rispetto alla tau non modificata.

Alcune mutazioni del gene MAPT possono essere patogenetiche, poiché alterano lo splicing della proteina oppure diminuiscono l'affinità di legame ai microtubuli. Di conseguenza, la tau non legata si accumula e viene fosforilata. Questo fenomeno è aggravato in quanto PP2A mostra una ridotta affinità per le forme di tau mutata (Goedert et al., 2000).

La formazione dei PHF dalle molecole di tau può seguire tappe diverse che potrebbero coinvolgere la fosforilazione di tau (anche se non sembra essere essenziale), un cambiamento conformazionale nella proteina ed, infine, la polimerizzazione. Se davvero la fosforilazione facilitasse l'aggregazione di tau in PHF, sarebbe patologicamente fondamentale l'azione delle chinasi su tau.

Tra queste chinasi il ruolo principale è stato assegnato a GSK3, la cui fosforilazione facilita l'aggregazione di tau in polimeri filamentosi in un modello transgenico di *Drosophila* (Jackson et al., 2002). Anche il peptide β -amiloide sembra coinvolto nell'aumento della fosforilazione di tau da parte di GSK3 (Yankner et al., 1996), probabilmente attraverso l'aumento dell'attività enzimatica chinasica, che risulta essere tossico solo per i neuroni in cui è presente tau (Rapoport et al., 2002). Il peptide A β potrebbe avere un'azione antagonista sul recettore dell'insulina (Xie et al., 2002) che porterebbe all'inattivazione della chinasi PKB e, di conseguenza,

all'attivazione di GSK3 e all'iperfosforilazione di tau. Infatti, studi sull'Alzheimer familiare (FAD) hanno dimostrato che gli aggregati di β -amiloide inducono la fosforilazione di tau (Busciglio et al., 1995) e che la GSK-3 è essenziale per la neurotossicità indotta da β -amiloide (Takashima et al., 1993). Inoltre, è stato riportato che A β media l'iperfosforilazione anche attraverso la diminuzione della regolazione di PP2A (Zhou et al., 2006).

È possibile che la fosforilazione di tau attraverso GSK3 in siti specifici possa richiedere la fosforilazione preventiva di altre chinasi (ad esempio cdk5) in siti adiacenti a quelli da modificare (Singh et al., 1995). Così sono state studiate sia altre chinasi (Singh et al., 1995), sia la possibile regolazione da parte delle fosfatasi (Gong et al., 1993). Per quanto riguarda la regolazione delle fosfatasi di tau, si deve tener presente che la funzione di PP2A dipende dalla sua carbossi-metilazione (Vafai et al., 2002).

La fosforilazione di tau è anche modulata dall'isoforma ApoE ϵ 4, un fattore di rischio associato allo sviluppo dell'Alzheimer ad esordio tardivo (Schmechel et al., 1993). ApoE attraverso i recettori della retina stimola la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI-3 chinasi) che agisce sulla chinasi B/GSK-3 β (Ohkubo et al., 2003).

Un ruolo importante per l'insorgenza di AD è quello della presenilina 1 e 2 (PS-1, -2). PS-1 attiva PI3K, inibendo l'attività di GSK-3 e l'iperfosforilazione di tau (Baki et al., 2004). Di conseguenza, ci potrebbero essere alcune mutazioni in PS-1 che portano ad una mancata attivazione di PI3K (perdita di funzione) con conseguente fosforilazione di tau. In breve, sembrano esserci due pathways attraverso cui la presenilina induce AD. Nel primo caso, un guadagno di funzione, porta alla comparsa di β -amiloide e, successivamente, alla fosforilazione di tau da parte di GSK-3, nel secondo caso, una perdita di funzione, che porta allo stesso risultato: la fosforilazione di tau da parte di GSK-3 (Hernandez et al., 2007).

È stato riportato che PS-1 è anche in grado di controllare la perdita di calcio dal reticolo endoplasmatico (Tu et al., 2006) e che mutazioni possono portare ad un aumento del calcio citoplasmatico che può attivare le chinasi di tau, come la proteina chinasi C o la calmodulina chinasi.

Inoltre, l'attivazione dei recettori NMDA, porta all'attivazione della proteasi calpaina, che degrada tau in un peptide di 17 kDa e in un peptide N-terminale che potrebbe essere tossico per le cellule (Li et al., 2004).

Anche la stress chinasi, p38, viene attivata in AD (Hensley et al., 1999) e in altre taupatie (Ferrer et al., 2001). Questa chinasi può fosforilare tau su alcuni residui che sono modificati in AD (Anderton et al., 2001) implicando il ruolo dello stress ossidativo in questa patologia (Smith et al., 1996).

Una conseguenza di questo stress è la perossidazione lipidica. In questo modo, la modificazione dell'acido arachidonico porta a composti come il 4-idrossinonenale (HNE) (Sayre et al., 1997) o l'acroleina (Uchida et al., 1998). Entrambi i composti sono presenti nel cervello di pazienti AD e colocalizzano con gli NFT (Sayre et al., 1997). Inoltre, HNE inibisce la defosforilazione di tau in colture di neuroni ippocampali (Mattson et al., 1997) e la sua aggiunta alla tau fosforilata, permette la formazione *in vitro* di filamenti (Perez et al., 2000) e anche la comparsa di filamenti in colture di neuroblastoma umano (Perez et al., 2002).

Recentemente, è stato dimostrato che l'acroleina favorisce la fosforilazione di tau da parte della stress chinasi p38 (Gomez-Ramos et al., 2003). Questo risultato suggerisce che lo stress ossidativo potrebbe facilitare la fosforilazione di tau attraverso l'attivazione di p38. Questo processo potrebbe svolgersi nelle taupatie dove lo stress ossidativo ha un ruolo importante (Odetti et al., 2000).

Infine, in un'altra taupatia, la demenza frontotemporale (FTD), l'iperfosforilazione di tau si potrebbe verificare attraverso l'inibizione della sua defosforilazione. In questo modo, è stato mostrato che il legame della fosfatasi principale, PP2A, sulla tau fosforilata avviene attraverso la regione di legame alla tubulina e che mutazioni in quella regione (presenti in pazienti FTD) diminuiscono l'interazione tra PP2A e tau (Goedert et al. 2000).

Infine, cambiamenti nei pathway che coinvolgono il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF2), Wnt (Jope et al., 2004) o insulina (Planel et al., 2004), potrebbero risultare in una fosforilazione anomala di tau.

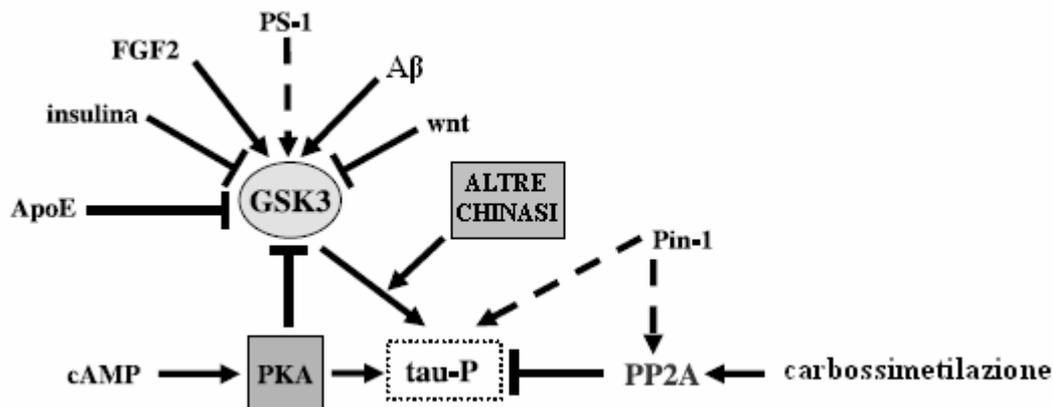


Fig.4: Fattori che possono influenzare la fosforilazione della proteina tau (mod. da Avila et al., 2004).

Così, tau potrebbe essere modificata attraverso la fosforilazione nelle diverse taupatie da chinasi diverse e, probabilmente, come conseguenza di questa fosforilazione, tau potrebbe cambiare la sua conformazione (Takeda et al., 2000) ed aumentare la sua capacità di assemblare in polimeri aberranti.

Questo cambiamento conformazionale può essere funzionalmente revertito in presenza di ossido di trimetilammina (TMAO) (Tseng et al., 1999) e dalla chaperonina Pin-1 (Lu et al., 1999), che facilita l'azione di PP2A nella proteina defosforilata (Zhou et al., 2000). Questo cambiamento conformazionale può facilitare l'aggregazione di tau e recentemente, è stato suggerito possa portare ad un aumento di α -eliche nella struttura secondaria di tau, poiché il contenuto di α -eliche è maggiore nella tau isolata da PHF (Jicha et al., 1999).

Tuttavia, è stato suggerito che la formazione di filamenti sia anche parzialmente dipendente dalla presenza di determinate strutture β -sheet di tau (Von Bergen et al., 2000). Sembra che un cambiamento conformazionale avvenga quando tau polimerizza in PHF (Abraha et al., 2000) e che possa coinvolgere il legame tra la regione ammino-terminale e la regione di legame ai microtubuli (Carmel et al., 1996).

3.3 AGGREGAZIONE

Già nel 1986 è stato descritto che la tau purificata potesse formare polimeri fibrillari che somigliano ai PHF trovati nel cervello dei pazienti AD e che alcune modificazioni, come la deamidazione, potessero facilitare questa polimerizzazione

(Montejo de Garcini et al., 1986). Curiosamente, molti anni più tardi è stato dimostrato che la deamidazione si verifica nella tau ottenuta dai PHF (Watanabe et al., 1999). L'assemblaggio di tau è stato ulteriormente studiato *in vitro* (Crowther et al., 1992), dimostrando che è necessaria un'elevata concentrazione di proteina per la polimerizzazione, suggerendo che altri composti potrebbero essere necessari per facilitare l'aggregazione.

I glicosaminoglicani solfato (GAG), che sono presenti insieme a tau negli NFT sono stati alcune delle prime molecole testate. Si è constatato che i GAG facilitano la polimerizzazione di tau *in vitro*, in modo indipendente dal suo stato di fosforilazione (Goedert et al., 1996). I GAG sono polianioni e altri polianioni, come ad esempio la regione ricca di acido glutammico nella regione carbossi-terminale della tubulina, possono facilitare l'aggregazione (Perez et al., 1996).

È stato suggerito che anche l'ossidazione possa svolgere un ruolo nell'aggregazione di tau. L'ossidazione della cisteina a produrre ponti disolfuro favorisce l'auto-aggregazione di tau in molecole di 3R, in cui una singola cisteina è presente, ma non in molecole di 4R, dove la presenza di due cisteine può consentire la formazione di ponti disolfuro intramolecolari (Barghorn et al., 2002). Studi *in vitro* hanno dimostrato che la tau può essere assemblata tramite processi di ossidazione (reazione di Fenton) in presenza di ferro (Troncoso et al., 1993).

Le micelle anioniche e le vescicole inducono la formazione di fibrille tau *in vitro* (Chirita et al., 2003). Inoltre, è stato suggerito che tau potrebbe svolgere un ruolo nell'attivazione della fosfolipasi C per generare l'acido arachidonico attraverso l'idrolisi di fosfoacetilcolina (Hwang et al., 1996). L'acido arachidonico può essere frammentato e dare prodotti tossici come HNE. Recentemente, è stato dimostrato che HNE facilita l'aggregazione di tau, ma solo se tau è iperfosforilata (Perez et al., 2000) e che tale modifica è in parte dovuta alla fosforilazione da parte di GSK3. È stato proposto che la carnosina possa attenuare l'effetto di HNE (Aldini et al., 2002) e, in questo contesto, antiossidanti come la 5-N butil idrossilammina possano essere utilizzati come neuroprotettori (Atamna et al., 2001). Infine, anche alcuni chinoni potrebbero indurre la polimerizzazione di tau in forma fibrillare e l' α -sinucleina facilitare l'assemblaggio (Giasson et al., 2003).

L'analisi della regione minima coinvolta nell'auto-aggregazione indica che sono necessari i residui compresi nella terza sequenza ripetuta di legame alla tubulina (Perez et al., 1996). Inoltre, un esapeptide che comprende i residui 306-311 di tau è stato proposto essere la minima regione coinvolta nella polimerizzazione (von Bergen et al., 2000).

Sebbene il numero degli mRNA delle isoforme di tau, comprese quelle con l'esone 10, sembra essere aumentato in modo significativo nelle zone colpite da AD (Glatz et al., 2006), l'aggregazione non dipende dalle isoforme (Lee et al., 2001). Piuttosto, un particolare profilo di fosforilazione può regolare l'aggregazione di tau in PHF. Perciò, il ruolo della fosforilazione nell'auto-aggregazione è una questione fondamentale per lo studio dell'Alzheimer e delle altre taupatie.

Il punto da chiarire riguarda, quindi, il legame tra la fosforilazione di tau e la sua aggregazione. Se la fosforilazione si verifica prima della formazione dei PHF e in una regione che verrà mascherata dopo l'aggregazione, il sito non sarà più accessibile alle fosfatasi. L'anticorpo 12E8 riconosce una fosfoserina (S262) che si trova in uno dei motivi di legame alla tubulina presenti in tau. Il legame di questo anticorpo a tau è aumentato negli estratti di AD; tuttavia, questo non reagisce con i PHF. Questo suggerisce che la fosforilazione di tau si verifichi prima della sua aggregazione, ipotesi che non è, però, supportata da altri studi (Gordon-Krajcer et al., 2000). Esistono comunque prove consistenti del fatto che la fosforilazione di tau promuova la sua auto-aggregazione (Alonso et al., 2001).

È stato suggerito che la fosforilazione di tau in alcuni siti specifici possa essere un prerequisito per la sua auto-aggregazione (Baner et al., 1989). Alcuni di questi siti si trovano nel dominio di legame ai microtubuli, nel sito di formazione dei PHF. GSK-3 β è uno dei migliori candidati per la creazione di tau iperfosforilata, caratteristica dei PHF (Eldar-Finkelman et al., 2002). Tuttavia, esperimenti *in vitro* per testare l'effetto della fosforilazione sull'auto-aggregazione di tau hanno mostrato diversi risultati, che presumibilmente riflettono le differenze nelle condizioni sperimentali. In alcuni esperimenti la tau fosforilata mostra una diminuita propensione all'aggregazione (Schneider et al., 1999), mentre in altre condizioni la propensione aumenta (Perez et al., 2000). Questa discrepanza tra i risultati può essere dovuta a differenze nella concentrazione di proteina o nello stato di fosforilazione.

Infatti, la fosforilazione di alcune regioni può probabilmente inibire l'aggregazione, mentre la fosforilazione di altre può indurre la polimerizzazione. Ad esempio, composti come HNE e alcuni chinoni (Santa-Maria et al., 2004) catalizzano la formazione di aggregati fibrillari di peptidi di tau fosforilata, ma non riescono ad avere un effetto visibile se i peptidi sono in una forma non-fosforilata.

Un'altra questione fondamentale riguarda la struttura molecolare di tau nelle particelle PHF. La morfologia dei PHF, soprattutto la proporzione delle eliche, è stata ampiamente studiata. Così è stato proposto che la morfologia possa dipendere dalla proporzione di isoforme di tau contenenti tre o quattro motivi di legame alla tubulina (Goedert et al., 1996), o dall'associazione con GAG (Arrasate et al., 1997), o dalla presenza di residui specifici nella molecola (DeTure et al., 2002). L'unione di diverse tecniche (diffrazione ai raggi X, microscopia elettronica, TEM, ecc) per l'analisi della struttura dei PHF, ha suggerito che sia compatibile con un'elica composta da due filamenti paralleli. L'idea attuale è che l'aggregazione proteica patologica debba comportare la formazione di strutture β -sheet che danno luogo alle tipiche fibrille amiloidi.

La formazione degli NFT dai PHF sembra essere facilitata dalla glicazione (Ledesma et al., 1995). I grovigli neurofibrillari sembrano essere una struttura molto stabile. Infatti, diversi trattamenti revertono la tau solubile iperfosforilata, ma non gli NFT già formati. Questo è stato osservato dopo la somministrazione di inibitori GSK-3 (Engel et al., 2006) e in un modello animale transgenico condizionale che overesprimeva una tau mutata (Santacruz et al., 2005).

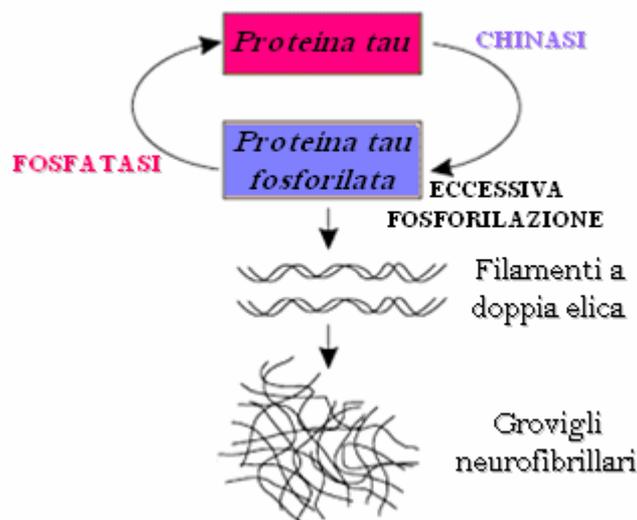


Fig.5: Fasi dell'aggregazione patologica di tau.

3.4 MODIFICAZIONI DELLA TAU PATOLOGICA

3.4.1 UBIQUITINAZIONE

L'ubiquitina è una stress proteina implicata nella degradazione ATP-dipendente delle proteine a breve emivita e nella rimozione di proteine anomale o danneggiate (Hershko et al., 1998). La presenza di una forma coniugata di ubiquitina nei PHF è stata suggerita dal legame di questi ultimi con anticorpi specifici (Mori et al., 1987). È stato dimostrato che le proteine target dell'ubiquitina nei PHF sono le proteine tau, e che i siti di coniugazione sono localizzati sulla regione di legame ai microtubuli (Lys254, 257, 311,317). L'analisi delle proteine tau da un cervello AD mediante Western blot, rivela la presenza di PHF-tau, dei prodotti proteolitici e dei polimeri tau, costituiti in gran parte della porzione C-terminale e dall'ubiquitina. È molto probabile che l'isoforma più lunga di tau anormalmente fosforilata si accumuli come PHF (PHF-tau), che sono poi gradualmente proteolizzati nella parte N-terminale e successivamente ubiquitinati nel dominio C-terminale (Morishima-Kawashima et al., 1993).

3.4.2 GLICAZIONE

La glicazione è una reazione tra la parte amminica di una catena laterale di un amminoacido e la parte carbossilica del glucosio o di altri zuccheri riducenti. Questa

modificazione post-traduzionale, nota anche come glicosilazione non enzimatica, porta alla formazione di prodotti eterogenei chiamati prodotti avanzati di glicazione (AGE). L'insolubilità dei PHF può essere correlata alla glicazione, dal momento che una reazione di cross-linking che porta alla formazione di aggregati insolubili di proteine è spesso descritta come conseguenza di una glicazione (Ko et al., 1999). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che gli AGE possono essere individuati, tramite immunostochimica, nelle placche senili di AD e negli NFT di AD o PSP (Sasaki et al., 1998).

Tredici residui di lisina, l'amminoacido più adatto, sono stati identificati come potenziali siti di glicazione nell'isoforma umana più lunga (Ledesma et al., 1995). Tra le lisine modificate, quelle situate nella sequenza che comprende i residui 318-336 (isoforma più lunga) sono risultate glicate. Poiché quelle lisine sono presenti nei motivi di legame alla tubulina la loro modificazione potrebbe determinare una diminuzione dell'interazione di tau con la tubulina. Infine, i radicali liberi dell'ossigeno generati dagli AGE-tau potrebbero attivare la trascrizione via NF- κ B, aumentando la β PP e rilasciando peptidi amiloidi di 4 kDa simili ad A β . Pertanto, la tau glicata potrebbe indurre uno stress ossidativo che può contribuire alla patogenesi di AD (Yan et al., 1995).

3.4.3 POTENZIALE REDOX NEURONALE

È stato dimostrato che il primo passo fondamentale per la formazione dei PHF è la formazione di dimeri antiparalleli uniti da ponti disolfuro (Wille et al., 1992). Nel caso di costrutti tau 4R, le ripetizioni 2 e 3 possono essere collegate tramite un ponte disolfuro intramolecolare che coinvolge i residui Cys291 e Cys322 rispettivamente. Quindi, questi costrutti formano monomeri compatti, ma non possono aggregare in PHF sintetici. Questo spiegherebbe la scarsità di aggregati delle isoforme tau 4R (Schweers et al., 1995).

In conclusione, i legami disolfuro intermolecolari che coinvolgono i residui Cys322 di tau sono probabilmente importanti per la polimerizzazione in PHF, ma non possono spiegare tutto il processo. Inoltre, questi dati implicano che il potenziale redox ossidativo del neurone sia di fondamentale importanza per l'aggregazione dei PHF, in modo indipendente o in aggiunta alle reazioni patologiche di fosforilazione.

3.4.4 GLICOSILAZIONE

È stato riportato che la proteina tau iperfosforilata nel cervello AD è N-glicosilata e che i glicani mantengono l'elicità dei PHF, ma non sembrano avere alcun apparente effetto diretto sulla capacità di tau di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli (Wang et al., 1996). Al contrario, la proteina tau è normalmente O-glicosilata (Arnold et al., 1996). Tuttavia, la O-GlcNAc è stata trovata maggiormente regolata in AD. Tutti questi dati suggeriscono che la glicosilazione possa essere implicata nella formazione e nella stabilizzazione dei PHF in AD.

3.4.5 TRANSGLUTAMINASI

La transglutaminasi tissutale (TGase) è un enzima calcio-attivato, che catalizza la formazione di legami tra i residui di glutammina e le ammine primarie, incluse nei residui di lisina legati al peptide, o le poliammine. La transglutaminasi lega proteine substrato specifiche in complessi ad alto peso molecolare insolubili e resistenti alle proteasi (Chen et al., 1999). Grazie a questa capacità è stato suggerito un suo possibile coinvolgimento nell'aggregazione di tau in PHF. Infatti, tau umana ricombinante trattata con le transglutaminasi forma strutture filamentose *in vitro* che sono immunoreattive per anticorpi anti-TGase e anti-tau (Appelt et al., 1997).

Allo stesso modo, PHF isolati dagli NFT di cervello AD sono immunoreattivi per anticorpi anti transglutaminasi. Questi risultati indicano che la transglutaminasi tissutale possa avere un ruolo nella formazione della patologia tau associata ad AD (Miller et al., 1995).

3.4.6 PROTEOLISI

È stato suggerito che il troncamento delle proteine tau possa precedere il loro assemblaggio in PHF, piuttosto che riflettere un taglio proteolitico di tau assemblata nei grovigli extracellulari (Novak et al., 1994). Tuttavia, numerosi studi hanno valutato la proteolisi di tau da parte della calpaina, una proteasi calcio-dipendente, e hanno dimostrato una maggiore resistenza delle proteine PHF-tau, rispetto alle proteine tau normali. Infatti, le proteine tau normali isolate da cervelli umani fetali o adulti sono ugualmente e rapidamente proteolizzate dalla calpaina *in vitro*, e la

formazione di frammenti tau N-terminali indica che i siti calpaina-sensibili possano essere situati nella parte C-terminale.

Al contrario, i PHF sono estremamente resistenti alla degradazione, ed aumentando la concentrazione della calpaina è stata ottenuta solo una proteolisi parziale che ha dato origine ad un frammento maggiore di PHF-tau C-terminale. Questi dati suggeriscono che i potenziali siti di digestione della calpaina siano sepolti nel core dei filamenti diventando inaccessibili alle proteasi, portando alla resistenza dei PHF alla proteolisi e, successivamente, all'accumulo dei PHF in AD (Yang et al., 1995).

Infine, dati recenti indicano che la conformazione delle proteine tau nei PHF, piuttosto che l'iperfosforilazione (Litersky et al., 1992), sia il principale fattore responsabile della resistenza dei filamenti anomali alla proteolisi mediata dalla calpaina (Yang et al., 1997). In questo contesto, la transglutaminasi tissutale potrebbe giocare un ruolo cruciale nell'aggregazione delle proteine tau (Tucholski et al., 1999).

3.5 COFATTORI

3.5.1 APOLIPOPROTEINA E

L'apolipoproteina E (ApoE), una proteina eterogenea con tre isoforme principali negli esseri umani (E2, E3 e E4 corrispondenti ai tre alleli $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$), svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo dei lipidi. È stato dimostrato che ApoE è un fattore di rischio per AD, in quanto la frequenza dell'allele $\epsilon 4$ è aumentata nei pazienti AD rispetto alla popolazione normale. In seguito a questa constatazione, è stato dimostrato che ApoE è legata alle placche senili e agli NFT (Buée et al., 1996) e che può contribuire alla formazione di queste lesioni (Poirier et al., 1995). ApoE potrebbe giocare un ruolo secondario nella formazione degli NFT o accumularsi nei neuroni in risposta ai processi riparativi indotti dai danni neuronali associati alla loro presenza (Benzing et al., 1995).

3.5.2 GLICOSAMINOGLICANI

I glicosaminoglicani (GAG) sono la frazione di carboidrati dei proteoglicani. Si tratta di polisaccaridi contenenti acido ascorbico ed esosamine, che possono essere ulteriormente modificati mediante solfatazione ed acetilazione. Ci sono quattro classi

principali di GAGs: condroitin solfato, dermatan solfato, cheratan solfato ed eparan solfato. L'eparan solfato è il GAG più complesso, contenente acido glucuronico legato ad N-acetilglucosammina.

In AD, proteoglicani/GAG si trovano nei depositi di amiloide e negli NFT (Snow et al., 1987). Vi è una forte interazione tra il peptide amiloide A β e i GAG (Buée et al., 1993). Più recentemente, è stato dimostrato un forte legame dei GAG al dominio di legame ai microtubuli delle proteine tau, suggerendo che possano aumentare l'aggregazione di tau ed ostacolare l'assemblaggio ai microtubuli (Goedert et al., 1996). Infine, i GAG potrebbero essere responsabile dell'elicità dei PHF (Arrasate et al., 1997).

3.5.3 ALTRI POLIANIONI

I glicolipidi sono stati segnalati per la loro associazione ai PHF (Goux et al., 1996). I fosfolipidi inducono cambiamenti conformazionali in tau che possono facilitarne la fosforilazione anomala. Inoltre, è stato dimostrato che lipidi specifici, tra cui l'acido arachidonico, possono potenziare la formazione di filamenti *in vitro* (Wilson et al., 1997). Allo stesso modo, l'assemblaggio dei PHF utilizzando proteine tau ricombinanti è fortemente aumentato dagli acidi ribonucleici (Kampers et al., 1996). Va notato che RNA sono stati trovati negli NFT (Ginsberg et al., 1997).

3.5.4 ALLUMINIO

Molti metalli sono stati coinvolti in patologie neurodegenerative. Tra questi, l'alluminio è stato direttamente coinvolto nell'aggregazione di tau e nella neurodegenerazione (Shin, 1997). L'alluminio è stato segnalato anche negli NFT, non solo in AD (Perl et al., 1980), ma anche in altre patologie neurodegenerative (Garruto et al., 1991). Esso facilita anche l'aggregazione di tau in un modo fosfato-indipendente, senza coinvolgere la formazione di fibrille (Scott et al., 1993).

3.6 TOSSICITÀ

Fino ad ora, non è ancora stato pienamente chiarito come l'iperfosforilazione di tau porti alla neurodegenerazione. Numerosi studi hanno dimostrato che la tau iperfosforilata sequestra le normali MAPs, interferisce nella dinamica dei microtubuli,

blocca il traffico intracellulare neuronale, promuove il rientro nel ciclo cellulare, inibisce le proteasi e facilita l'aggregazione. Tutti questi dati insieme possono contribuire alla tossicità della tau iperfosforilata.

3.6.1 SEQUESTRO DELLE MAP

La tau iperfosforilata sequestra la normale tau e le altre proteine associate ai microtubuli (MAP), come MAP1 e MAP2 causandone il disassemblaggio (Alonso et al., 1996). Inoltre, la maggior parte delle mutazioni missenso riduce l'abilità di tau nel promuovere l'assemblaggio dei microtubuli con conseguente destabilizzazione ed effetti deleteri sui processi cellulari, come ad esempio il trasporto assonale rapido (Hasegawa et al., 1998).

Le mutazioni introniche alterano lo splicing dell'esone 10 cambiando il rapporto tra le isoforme a tre e quattro ripetizioni. La tau 4R è nota per interagire maggiormente con i microtubuli rispetto a quella 3R (Goedert et al., 1990). L'aumentata espressione di tau 4R wild-type in neuroni di topi transgenici provoca una grave assonopatia dovuta ad un eccessivo legame delle tau 4R ai microtubuli (Spittaels et al., 1999). Il risultante blocco bidirezionale del trasporto assonale a sua volta provoca assonopatia con grave degenerazione e difetti motori.

Un recente lavoro mostra che a concentrazioni fisiologiche, le diverse isoforme di tau hanno effetti molto diversi sul trasporto lungo i microtubuli (Vershinin et al., 2007). Così, tutti i difetti di tau potrebbero alterare il trasporto assonale di fattori vitali necessari per il mantenimento delle funzioni neuronali.

3.6.2 DINAMICA DEI MICROTUBULI

Una corretta regolamentazione delle dinamiche dei microtubuli (assemblaggio e disassemblaggio) è essenziale per la morfologia, le funzioni e la vitalità delle cellule normali. Se la dinamica dei microtubuli nei neuroni va oltre il range di normalità, le funzioni vengono danneggiate e si verifica la morte delle cellule (Feinstein et al., 2005).

In qualità di principale regolatore della dinamica dei microtubuli, l'attività biologica principale di tau è la promozione del loro assemblaggio e il mantenimento della loro stabilità. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la tau ricombinante anormalmente

iperfosforilata o isolata dal cervello di pazienti AD non è più capace di promuovere l'assemblaggio o il legame ai microtubuli (Alonso et al., 1994) e che la defosforilazione dissocia tau dai PHF e ne ristabilisce l'attività biologica (Wang et al., 1995).

La tau iperfosforilata è incline a formare aggregati, che possono bloccare il traffico intracellulare delle proteine neurotrofiche e di altre proteine funzionali, dando come risultato la perdita o il declino del trasporto assonale o dendritico nei neuroni (Salehi et al., 2003). L'iperfosforilazione di tau indotta da inibitori della fosfatasi porta all'aggregazione e alla compromissione delle attività biologiche (Tanaka et al., 1998). La pseudofosforilazione di tau (PHPTau), in cui i residui di serina/treonina vengono sostituiti con glutammato, mima gli aspetti strutturali e funzionali della tau iperfosforilata esibendo, ad esempio, una ridotta interazione con i microtubuli e fallendo nella loro stabilizzazione (Fath et al., 2002).

In un modello transgenico di *Drosophila* in cui è espressa tau umana mutante, l'accumulo di tau iperfosforilata e la progressiva neurodegenerazione avvengono senza la formazione di filamenti (Wittmann et al., 2001), suggerendo la tossicità, *in vivo*, della tau iperfosforilata solubile.

3.6.3 TRAFFICO INTRACELLULARE

La PHF-tau distrugge i compartimenti intracellulari che sono essenziali per il normale metabolismo. L'aumentata espressione di tau causa modifiche nella morfologia, ritarda la crescita cellulare e altera drasticamente la distribuzione dei vari organelli trasportati dalle proteine motore, dipendenti dai microtubuli. In questi studi, i mitocondri non vengono trasportati nei compartimenti cellulari periferici e formano un cluster vicino al centro di organizzazione dei microtubuli. Analogamente, il reticolo endoplasmatico non si estende alla periferia della cellula e diminuisce la densità (Ebner et al., 1998).

Quando tau e le proteine dei neurofilamenti sono iperfosforilate, il trasporto assonale delle cellule appare visibilmente danneggiato, i processi di crescita cellulare sono inibiti ed è visibile il tipico profilo delle cellule degenerative (Yang et al., 2007). Inoltre, topi transgenici che hanno un'aumentata espressione dell'isoforma proteica 4R umana sviluppano degenerazione assonale in neuroni specifici del cervello e del

midollo spinale e mostrano notevoli dilatazioni assonali dovute all'accumulo di neurofilamenti, mitocondri ed altre strutture vescicolari (Spittaels et al., 1999).

Questi studi sostengono l'idea che la tau iperfosforilata blocchi il traffico intracellulare dei neuroni.

3.6.4 INIBIZIONE DELLE PROTEASI

Il ricambio proteico intracellulare è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e della divisione, nella regolamentazione dei fattori di trascrizione e nella garanzia del controllo della qualità cellulare. L'ubiquitina-proteasoma e l'autofagia-lisosomi sono i due principali pathways per l'eliminazione delle proteine danneggiate, non correttamente ripiegate e aggregate. In base a questo, tau dovrebbe essere nel gruppo delle proteine degradate dall'ubiquitina-proteasoma. Tuttavia, proteine tau poliubiquinate sono state trovate accumulate nei grovigli di cervello AD (Cripps et al., 2006).

Il motivo sarebbe un deficit del sistema proteolitico, che così contribuirebbe all'aggregazione di tau (Goldbaum et al., 2003; Williams et al., 2006). Nel cervello AD, l'attività del proteasoma è diminuita, e questa diminuzione significativa è maggiormente localizzata nelle regioni con gravi alterazioni degenerative, come ad esempio l'ippocampo e il giro paraippocampale (Braak e Braak, 1991; Keller et al. 2000). L'attività del proteasoma nel cervello AD è fortemente correlata con la quantità di co-precipitato PHF-tau, e l'incubazione del proteasoma con PHF-tau isolate dal cervello o assemblate *in vitro* porta ad un'inibizione dell'attività, suggerendo che la sua disfunzione possa risultare dal legame inibitorio con la PHF-tau (Keck et al., 2003).

Uno studio *in vitro* ha dimostrato che la tau ricombinante purificata non ripiegata potrebbe essere degradata dal proteasoma 20S, il core catalitico del proteasoma 26S (David et al., 2002). Recenti studi hanno dimostrato che la tau ricombinante fosforilata da GSK-3 β potrebbe essere proteolizzata come la normale tau ricombinante non fosforilata (Zhang et al., 2006). Inoltre, una moderata fosforilazione di tau stimola l'attività del proteasoma, tuttavia, un'estesa fosforilazione attraverso l'inibizione di PP2A o l'attivazione di PKA inibisce l'attività del proteasoma (Ren et al., 2006).

Questi studi suggeriscono che la tau iperfosforilata inibisca l'attività del proteasoma, che a sua volta può aggravare l'aggregazione di tau. Tale circolo vizioso può condurre a disturbi della funzione neuronale e alla morte dei neuroni. Tuttavia, il nesso di causalità tra la ridotta attività del proteasoma e l'iperfosforilazione di tau deve essere ancora chiaramente stabilito.

3.6.5 AGGREGAZIONE

La tau anormalmente iperfosforilata è presente nel citosol durante le prime fasi della degenerazione neurofibrillare e l'iperfosforilazione può causare alterazioni nella conformazione che precedono l'aggregazione (Baner et al., 1989). La fosforilazione *in vitro* di tutte le sei isoforme ricombinanti di tau del cervello umano adulto promuove la loro auto-aggregazione nei grovigli di PHF, e la loro defosforilazione inibisce l'auto-aggregazione (Alonso et al., 2001).

La fosforilazione nella Ser262 accelera il processo di aggregazione di tau (Zhou et al., 2006). In *Drosophila*, l'espressione di tau umana non induce la formazione dei grovigli neurofibrillari, ma l'espressione di tau umana e dell'omologo di GSK-3 o di Cdk5 aumenta la fosforilazione di tau e la formazione di inclusioni neurofibrillari, che intensificano la neurodegenerazione. La riduzione parziale della fosforilazione di tau riduce l'aggregazione (Jackson et al., 2002).

Quando topi transgenici che esprimono maggiormente la tau umana mutata (P301L) sono trattati con un inibitore di GSK-3 (LiCl), il livello di tau fosforilata è ridotto, con una riduzione notevole dell'aggregazione (Perez et al., 2003). La defosforilazione della tau iperfosforilata solubile in AD da parte di PP2A inibisce la sua polimerizzazione in PHF, mentre la rifosforilazione di tau promuove l'auto-assemblaggio in grovigli di PHF, simili a quelli osservati nei cervelli AD. La fosforilazione di tau ricombinante cerebrale umana ha dato risultati simili, tranne che per la formazione di filamenti dritti, invece che di PHF (Wang et al., 2007).

Tutte queste osservazioni suggeriscono che l'iperfosforilazione anormale di tau preceda il suo accumulo e che la defosforilazione invece ne impedisca l'accumulo. Questo suggerisce che l'attivazione di PP2A o l'inibizione di una delle due chinasi GSK-3 β e Cdk5 o di una delle due chinasi più PKA o CaMKII potrebbe essere necessaria per inibire la degenerazione neurofibrillare.

Diversi gruppi hanno dimostrato di recente che la fosforilazione di tau possa promuovere il rientro dei neuroni nel ciclo cellulare e che, quindi, possa portare alla neurodegenerazione (Andorfer et al., 2005).

3.6.6 FUNZIONI COGNITIVE

Nei pazienti AD, il declino cognitivo è correlato con il grado di patologia neurofibrillare legata a tau. Tuttavia, se e come l'iperfosforilazione anomala di tau o la formazione di filamenti colpisca l'apprendimento e la memoria non è ancora stato completamente chiarito.

Modelli animali FTD replicano la patologia umana con progressivo deterioramento neuronale e accumulo di grovigli neurofibrillari. Quando topi transgenici P301L sono stati studiati per parametri di apprendimento e memoria in giovane età, prima che l'iperfosforilazione e la taupatia fossero evidenti, è stato osservato un inatteso aumento del potenziamento a lungo termine nel giro dentato, parallelamente ad un miglioramento delle prestazioni cognitive (Boekhoorn et al., 2006). Questo suggerisce che la proteina tau possa giocare un importante ruolo positivo nei normali processi neuronali di memoria ipocampale, e viceversa, che non le mutazioni tau di per sé, ma la conseguente iperfosforilazione sia critica per il declino cognitivo nelle taupatie.

In un altro modello di topo che esprime la tau 4R umana mutata nei siti G272V e P301S, la fosforilazione di tau anormale aumenta con l'età ed è correlata con la comparsa di grovigli neurofibrillari. Questi topi mostrano anche una compromissione cognitivo-comportamentale (Schindowski et al., 2006). Inoltre, la soppressione dell'espressione di una tau mutata sembra migliorare la memoria in topi transgenici (Santacruz et al., 2005).

Tutti questi studi suggeriscono una correlazione positiva dell'iperfosforilazione di tau con una cognizione compromessa. Tuttavia, saranno necessarie ulteriori indagini per chiarire se l'iperfosforilazione di tau sia responsabile dei danni di apprendimento e delle funzioni della memoria degli animali.

3.6.7 CONTROVERSIE SULLA TOSSICITÀ

Ci sono molte controversie sulla tossicità della tau polimerizzata. Alcuni studi recenti mostrano che l'aggregazione di tau è tossica per le cellule (Khlistunova et al., 2006).

Studi *in vitro* dimostrano che nella polimerizzazione tau perde la capacità biologica nel promuovere l'assemblaggio e il legame ai microtubuli, mentre la defosforilazione della tau iperfosforilata e dei PHF ne ripristina le attività biologiche (Alonso et al., 1997). Questi dati suggeriscono effetti diametralmente opposti della tau polimerizzata, rappresentando una perdita di funzione dovuta all'iperfosforilazione.

D'altro canto, alcuni lavori mostrano come la polimerizzazione di tau non abbia effetti sulla tossicità cellulare. È stato riportato che la diminuzione della densità dei microtubuli nei neuroni piramidali nel cervello AD non è correlata ai PHF (Cash et al., 2003). In *C. elegans* e *Drosophila* l'espressione di tau umana wild-type e mutata in cellule nervose porta all'iperfosforilazione di tau, a una ridotta sopravvivenza, a danni assonali e alla perdita di cellule nervose, in assenza di filamenti tau (Wittmann et al., 2001). Il trattamento cronico di topi transgenici con molecole inibitorie di ERK2 porta ad una significativa riduzione nel livello di tau iperfosforilata e previene i severi danni motori, senza però riduzione nel numero dei grovigli neurofibrillari (Le Corre et al., 2006). La dissociazione tra perdita neuronale e accumulo di patologia neurofibrillare mostra come la formazione dei grovigli non sia necessariamente legata alla morte neuronale.

Recentemente è stato osservato che la formazione di aggregati tau abolisce la tossicità della tau solubile fosforilata (Alonso et al., 2006). È stato proposto che la fosforilazione anormale di tau causi neurodegenerazione attraverso un aumento di attività tossica piuttosto che una perdita di funzione, che può essere compensata dalle altre MAPs. Questa visione è supportata da uno studio che mostra come topi knockout per tau si sviluppino normalmente producendo livelli più alti di MAP1 per compensare la perdita di tau (Harada et al., 1994). Sembra, quindi, che la formazione di PHF e grovigli da tau iperfosforilata solubile sia un meccanismo di difesa attraverso cui i neuroni cercano di ridurre l'attività tossica di tau.

La neurotossicità nelle taupatie potrebbe, inoltre, essere regione-dipendente. È stato riportato che topi doppi transgenici per tau P301L e per GSK3, che hanno una sopravvivenza maggiore rispetto ai soli P301L, abbiano una riduzione di taupatia nel tronco encefalico, avendo invece una contemporanea drammatica taupatia nel prosencefalo (Muyliaert et al., 2006).

La citotossicità mediata da tau in AD potrebbe essere dovuta alla sua iperfosforilazione o alla formazione di aggregati aberranti. Nel primo caso è stato osservato che l'espressione di una tau pseudoiperfosforilata promuove una tossicità associata all'induzione di apoptosi (Fath et al., 2002). Questo risultato è in accordo con le osservazioni in topi transgenici per GSK3 (Hernandez et al., 2002).

In AD, è presente una correlazione inversa tra il numero di grovigli extracellulari e il numero dei neuroni sopravvissuti, il che suggerisce che i neuroni che sviluppano grovigli neurofibrillari possano degenerare (Goedert, 1999). D'altro canto la comparsa di NFT extracellulari si verifica in quelle regioni che contengono neuroni con NFT intracellulare. Questo suggerisce che le inclusioni intracellulari precedano la morte delle cellule e che gli NFT extracellulari siano il risultato della lisi cellulare, forse a causa del legame di tau alle componenti della matrice extracellulare, come i GAG (Perez et al., 1996). Perciò la presenza di aggregati tau potrebbe essere supposta come tossica e potrebbe risultare dal fatto che gli aggregati tau siano strutture appiccicose che possono legarsi e quindi privare la cellula di proteine necessarie per il normale metabolismo.

Inoltre, è stato scoperto che gli aggregati tau possono entrare nelle cellule di origine neuronale e che gli aggregati esogeni inducono l'aggregazione della tau intracellulare (Frost et al., 2009). Non è però noto se gli aggregati entrino nelle cellule per endocitosi o per altri meccanismi.

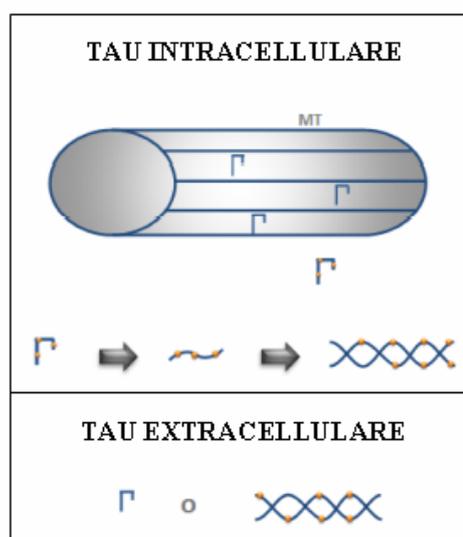


Fig.6: Stati conformazionali della tau intracellulare ed extracellulare (mod. da Avila, 2010).

3.7 EFFETTI NEUROPROTETTIVI

Gli effetti negativi di tau sono stati ampiamente dedotti dal fatto che la tau iperfosforilata e i grovigli coincidano con la degenerazione cellulare in diverse taupatie. Tuttavia, queste correlazioni e i dati *in vitro* non sono sufficienti per concludere che la tau iperfosforilata o i grovigli siano il presagio o la causa diretta della perdita di cellule in queste patologie degenerative. Inoltre, alcuni studi recenti indicano che un'iperfosforilazione transitoria o acuta possa essere protettiva per i neuroni.

3.7.1 SOPRAVVIVENZA DEI NEURONI

Attraverso un'analisi quantitativa della perdita neuronale e della formazione dei grovigli neurofibrillari come funzione della durata della malattia, è stato scoperto che i neuroni CA1 dell'ippocampo possono sopravvivere con i grovigli neurofibrillari per circa 20 anni (Morsch et al., 1999). Anche recenti studi su topi transgenici hanno dimostrato che la formazione di filamenti tau sembrerebbe neuroprotettiva (Andorfer et al., 2005).

Questo concetto è stato ulteriormente supportato da recenti analisi istologiche di neuroni in modelli murini transgenici che esprimono forme mutate e non di tau umana (Allen et al., 2002). In entrambi i casi, la presenza di filamenti di tau non correla direttamente con la morte dei singoli neuroni. Da questi studi, sembra che la presenza dei grovigli neurofibrillari non sia obbligatoria per la morte dei neuroni CA1 dell'ippocampo nei pazienti AD.

3.7.2 DANNI OSSIDATIVI

Il danno ossidativo è la causa più comune di morte cellulare, ed è uno dei primi eventi in pazienti con AD. È stato riportato che il danno ossidativo diminuisce con la progressione della malattia e la formazione dei grovigli neurofibrillari (Nunomura et al., 2001), ed è stato proposto che la presenza di grovigli neurofibrillari in AD protegga i componenti cellulari cruciali dagli attacchi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Smith et al., 2002).

Questi risultati indicano che la formazione di grovigli neurofibrillari potrebbe rappresentare una risposta compensatoria volta a ridurre il danno associato alle ROS.

Infatti, la fosforilazione di tau è maggiormente regolata durante lo stress ossidativo (Gomez-Ramos et al., 2003) e tau è modificata dai prodotti dello stress ossidativo, tra cui il 4-idrossi-2-nonenale (HNE) (Takeda et al., 2000a, b).

L'aggregazione di tau è agevolata anche da addotti ossidativi (Perez et al., 2000), anche se altri studi hanno dimostrato che alcuni ossidanti portano alla riduzione della fosforilazione di tau (Davis et al., 1997). Pertanto, risulta che, a seconda degli specifici ossidanti, si possa indurre sia un aumento o che una diminuzione della fosforilazione di tau.

Un ruolo protettivo dell'iperfosforilazione è sperimentalmente confermato dal fatto che i neuroni embrionali che sopravvivono dopo il trattamento con ossidanti hanno più immunoreattività per la tau fosforilata rispetto a quelli che muoiono (Ekinici e Shea, 2000). L'induzione di antiossidanti cellulari e l'espressione di tau sono opposte (Takeda et al., 2000a, b), suggerendo che il danno ossidativo ridotto nei neuroni che mostrano l'accumulo di tau (Nunomura et al., 1999) potrebbe essere una conseguenza diretta di una funzione antiossidante della tau fosforilata (Smith et al., 2002).

Il coinvolgimento di tau nella vitalità cellulare è stato osservato in neuroni dei granuli cerebellari (Amadoro et al., 2004). Pertanto, la regolazione della fosforilazione di tau nel cervello dei mammiferi adulti sembra rappresentare un processo naturale che è associato a meccanismi neuroprotettivi (Zhou et al., 2001). Tuttavia, la prova diretta di tau nella modulazione della vitalità cellulare non è ancora stata fornita.

3.7.3 APOPTOSI

Una perdita neuronale cronica sia strutturale che funzionale è la caratteristica cardine delle patologie neurodegenerative (Braak et al., 1994). È stato proposto che l'apoptosi possa svolgere un ruolo importante per la perdita dei neuroni in AD. Questa proposta è largamente basata sulle osservazioni della frammentazione del DNA apoptotico e dell'espressione di proteine del signaling apoptotico (come ad esempio le caspasi 3, 6, 8 e 9, Bax, Fas e Fas-L) nella neocorteccia e nell'ippocampo di tessuto cerebrale post-mortem di pazienti AD (Lassmann et al., 1995).

Tuttavia, l'apoptosi è un processo acuto che si verifica di solito entro ore, mentre la maggior parte dei neuroni che contengono grovigli nei cervelli AD va incontro a

degenerazione cronica che si sviluppa nel corso degli anni (Coleman e Yao, 2003). Inoltre, l'apoptosi osservata nei cervelli post-mortem potrebbe derivare da artefatti. Pertanto, è stato proposto che l'apoptosi classica non possa essere la via principale di perdita neuronale nel cervello AD e nelle altre taupatie (Perry et al. 1998).

L'ambiente cerebrale durante la degenerazione è ricco di stimoli proapoptotici, come stress ossidativo, ossidanti idrossinonenale e β -amiloide (Raina et al., 2003). Poichè gran parte dei neuroni degenerati nel cervello AD contiene grovigli neurofibrillari, principalmente composti da tau iperfosforilata, è stato postulato che la tau iperfosforilata giochi un ruolo che permette ai neuroni di sfuggire dalla morte apoptotica acuta.

La fuga dall'apoptosi avviene probabilmente inibendo la fosforilazione concorrenziale della β -catenina (una proteina che rappresenta la sopravvivenza della cellula) da parte di GSK- 3β e quindi facilitando la funzione della β -catenina (Li et al., 2007). GSK- 3β è una delle chinasi tau più coinvolte. La β -catenina, una fosfoproteina coinvolta nel signaling Wnt, è anche fosforilata da GSK- 3β . L'associazione della neurodegenerazione con la diminuzione del signaling Wnt è stata riportata (Lucas et al., 2001). Il coinvolgimento di tau nella sopravvivenza cellulare è stato osservato anche in neuroni dei granuli cerebellari (Amadoro et al., 2004).

Con lo stesso meccanismo, l'iperfosforilazione di tau potrebbe anche salvare altre cellule regolando altre proteine e conferendo resistenza all'apoptosi. Questo potrebbe spiegare perché la maggior parte dei neuroni che hanno grovigli sopravvive agli insulti proapoptotici e sceglie di morire per degenerazione cronica.

Il vantaggio principale dei neuroni nello sfuggire all'apoptosi è la prevenzione di una rapida perdita neuronale, perché i neuroni nel cervello, soprattutto nel cervello invecchiato, raramente sono reintegrati. È probabile che l'evoluzione abbia promosso la sopravvivenza neuronale a tutti i costi per mantenere una perfetta struttura del cervello e che, quindi, il cervello abbia sviluppato alcuni meccanismi per evitare una catastrofica perdita di neuroni.

Tuttavia, l'apoptosi è in realtà un meccanismo di auto-controllo del corpo per eliminare le cellule difettose. La tempestiva rimozione dei neuroni danneggiati può essere utile al cervello, perché questo può prevenire la trasmissione interneuronale

dei segnali anomali, e permettere la maturazione e/o la migrazione delle cellule progenitrici per ripristinare la perdita.

Riassumendo quindi, i neuroni con tau iperfosforilata sequestrano la tau normale, possono interferire con la dinamica dei microtubuli, bloccano il traffico intracellulare, facilitano l'aggregazione ed inibiscono la proteasi, stimolando così la formazione di PHF/grovigli che causano neurodegenerazione. Inoltre, il fatto che non vadano incontro ad apoptosi, li rende meno resistenti agli insulti ambientali e metabolici e permette ai grovigli di evolvere.

4. TAUPATIE

Le taupatie sono un gruppo di patologie causate dalla fosforilazione anormale di tau, o da anormali livelli della proteina o da mutazioni nel gene MAPT.

4.1 ALZHEIMER

La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa progressiva che conduce alla demenza e colpisce circa il 10% della popolazione con più di 65 anni di età (Rocca et al., 1991). La perdita di memoria è il primo sintomo di deficit cognitivo, seguito da afasia, agnosia, aprassia e disturbi comportamentali. I due principali tipi di lesioni cerebrali osservate nei pazienti con AD sono le placche senili (SP) e i grovigli neurofibrillari (NFT).

Le placche senili sono il risultato dell'accumulo extracellulare di un peptide (A β) in depositi di amiloide. A β deriva da un precursore, la proteina precursore dell'amiloide (APP). Nei casi di AD familiare, sono state trovate mutazioni sul gene APP, suggerendo che possa svolgere un ruolo centrale nell'eziopatogenesi (Hardy et al., 1992). Le SP sono distribuite in modo diffuso e diverso in tutta la corteccia cerebrale e nelle strutture sottocorticali.

Gli NFT corrispondono all'aggregazione delle fibrille anormali di PHF (Kidd, 1963), in certe popolazioni vulnerabili di neuroni. A livello microscopico, gli NFT sono preferenzialmente osservati nelle cellule piramidali dell'ippocampo e nella corteccia entorinale, mentre la corteccia sensoriali primaria e motoria sono relativamente risparmiate (Braak et al., 1991). Anche molte zone corticali e sottocorticali, come il

nucleo basale di Meynert, l'amigdala, il locus coeruleus e la dorsale del rafe, sono influenzate dalla formazione di NFT (Braak et al., 1985).

La dimostrazione della presenza di SP e di NFT in specifiche regioni della corteccia cerebrale è necessaria per stabilire la diagnosi definitiva di AD (Hyman et al., 1997). Tuttavia, i grovigli neurofibrillari con una densità inferiore sono presenti anche nella corteccia entorinale e nell'ippocampo di cervelli normali anziani.

La caratterizzazione biochimica dei PHF presenti in AD mediante immunoblotting ha rivelato la presenza di una tripletta di proteine (tau₅₅, 64 e 69). È presente anche una componente di 72-74 kDa in quantità molto limitate che corrisponde all'isoforma più lunga (2+ 3+ 10+) (Brion et al., 1991). È stato dimostrato che tau₅₅ risulta dalla fosforilazione dell'isoforma fetale (2- 3- 10-), tau₆₄ dalla fosforilazione delle varianti tau con un esone cassetta (2+ 3- 10- o 2- 3- 10+) e tau₆₉ dalla fosforilazione delle varianti tau con due esoni cassetta (2+ 3+ 10- o 2+ 3- 10+).

Tuttavia, è probabile che sia la dimensione delle isoforme che la fosforilazione siano responsabili delle variazioni nella loro mobilità elettroforetica. Per esempio, la fosforilazione dell'isoforma più lunga può portare alla formazione di varianti tau con peso molecolare compreso tra 68 e 72 kDa a seconda del grado di fosforilazione (Mulot et al., 1994).

Lo studio di cervelli post-mortem ha dimostrato una forte correlazione tra la rilevazione immunoistochimica di NFT e la presenza della terzina tau, indicando che si tratta di un indicatore affidabile del processo di degenerazione. Queste analisi hanno mostrato che la rilevazione della terzina tau patologica è presente in tutte le aree studiate, ad eccezione di regioni come la corteccia motoria primaria e quella visiva (aree di Brodmann 4 e 17, rispettivamente). La rilevazione è particolarmente forte nella corteccia associativa rispetto alla corteccia sensoriale primaria, con i livelli più alti nelle aree temporali neocorticali e limbiche (Holzer et al., 1994).

In uno studio di 130 casi con stato cognitivo che varia dal normale invecchiamento a grave AD, le PHF-tau sono state quantificate mediante immunoblotting in diverse aree corticali, e questi dati sono stati correlati ai dati clinici e neuropatologici (Delacourte et al., 1998). Durante le prime fasi di AD con un declino moderato delle funzioni cognitive, il pathway di degenerazione neurofibrillare è molto specifico, si diffonde dalla formazione ippocampale alla corteccia anteriore, inferiore e temporale

mediale. Poi, la malattia progredisce nelle aree associative della corteccia temporale (superiore), parietale e frontale. Infine, sono interessate le aree motorie primarie o sensoriali, come la corteccia motoria primaria o la corteccia visiva primaria.

Questo studio mostra come la degenerazione neurofibrillare debba coinvolgere quasi tutta la corteccia temporale per provocare evidenti manifestazioni cliniche (Delacourte et al., 1998).

4.2 PARKINSONISMO CON DEMENZA

Le caratteristiche cliniche principali della malattia di Parkinson sono il tremore a riposo, il volto senza espressione, la rigidità e la lentezza nell'avvio e nell'esecuzione dei movimenti volontari. Neuropatologicamente, il morbo di Parkinson è caratterizzato da perdita neuronale, soprattutto nella substantia nigra e nel locus coeruleus, e dalla presenza di inclusioni intracellulari chiamate corpi di Lewy e neuriti di Lewy (Forno, 1996), composti principalmente da α -sinucleina (Spillantini et al., 1997).

Il Parkinson non è considerata una taupatia reale. Tuttavia, in un sottogruppo di pazienti che non manifestano corpi di Lewy corticali, è stata descritta la patologia tau con la presenza della tripletta simile a quella descritta in AD, presente in quantità particolarmente elevate nella corteccia prefrontale, entorinale e temporale di tutti i pazienti Parkinson con demenza. Pertanto, rispetto ad AD varia la distribuzione delle proteine, con un coinvolgimento molto più forte delle aree prefrontali (Vermersch et al., 1993). Nei casi senza demenza, la patologia tau è limitata alla formazione ippocampale ed è stata descritta in individui anziani (Vermersch et al., 1992).

4.3 PARKINSONISMO POSTENCEFALITICO

Molti pazienti che sono sopravvissuti alla pandemia di influenza negli anni 1916-1926 hanno in seguito sviluppato parkinsonismo postencefalitico (PEP) (Buée-Scherrer et al., 1997). I sintomi extrapiramidali sono le caratteristiche cliniche principali e i pazienti solitamente non presentano cambiamenti cognitivi e non sono né afasici né aprassici. L'analisi immunostochimica ha dimostrato che sono presenti NFT a densità variabile nell'ippocampo e nella corteccia entorinale, in aree neocorticali e subcorticali. La densità più elevata si osserva nell'ippocampo e nel putamen,

indicando che alcune regioni sono preferenzialmente colpite dal processo degenerativo. Inoltre, e in contrasto con casi di AD, gli NFT sono più numerosi negli strati sopragranulari che in quelli infragranulari (Hof et al., 1992).

Studi biochimici hanno dimostrato che i casi PEP mostrano la tripletta tau_{55, 64 e 69} in regioni cerebrali corticali e sottocorticali, in contrasto con i casi AD in cui questa tripletta è prevalentemente limitata alla formazione ippocampale e alla neocorteccia associativa (Buée-Scherrer et al., 1997). Inoltre, la tripletta tau si trova in aree cerebrali di solito risparmiate in AD, compresa la corteccia motoria primaria e i gangli della base. La distribuzione regionale della tripletta tau si differenzia tra i casi di PEP, suggerendo alcune eterogeneità nel processo neurodegenerativo.

4.4 MALATTIA DI GUAM

La sclerosi laterale amiotrofica/parkinsonismo-demenza complex di Guam (ALS/PDC) è una malattia neurodegenerativa cronica altamente prevalente nella popolazione indigena Chamorro di Guam nel Pacifico occidentale (Hirano et al., 1961). Clinicamente, la sclerosi laterale amiotrofica Guamaniana è indistinguibile dalla SLA sporadica, la demenza è caratterizzata da un insidioso progressivo declino mentale e da segni extrapiramidali, inclusa bradicinesia, rigidità e, meno spesso, tremore (Hirano et al., 1966). Entrambi gli aspetti della malattia sono spesso associati, ma possono presentarsi separatamente. L'eziopatogenesi di questo disturbo non è ancora stata chiarita, anche se fattori ambientali o neurotossine potrebbe essere coinvolti (Garruto, 1991).

Il cervello dei pazienti presenta una grave atrofia corticale e perdita neuronale. Il segno distintivo è la diffusa formazione di NFT neuropatologici, soprattutto nell'isocorteccia temporale e frontale, nella formazione ippocampale e in diverse strutture sottocorticali (Hirano et al., 1961). Anche se gli NFT sono numerosi sia in AD e che in ALS/PDC, queste due condizioni si distinguono dalla loro distribuzione differenziale. Gli studi di immunostochimica hanno anche rivelato che proteine tau patologiche sono presenti negli NFT dei pazienti ALS/PDC e sono visualizzate come tripletta tau_{55, 64, 69} (Buée-Scherrer et al., 1995). L'ultrastruttura degli NFT è costituita da filamenti dritti e PHF (Rewcastle, 1991), ed è stato dimostrato che i PHF sono sostanzialmente simili a quelli osservati in AD (Hirano et al., 1968).

ALS/PDC di Guam e PEP sono stati collegati a fattori esterni come virus e tossine che possono portare a neuropatologie simili, caratterizzate dallo stesso profilo elettroforetico di tau.

4.5 PARALISI SOPRANUCLEARE PROGRESSIVA

La paralisi sopranucleare progressiva (PSP), anche conosciuta come disordine di Steele-Richardson-Olszewski, è un disordine parkinsoniano atipico ad esordio tardivo (Steele et al., 1964). Questa malattia neurodegenerativa è caratterizzata da paralisi sopranucleare dello sguardo verticale, moderata o grave instabilità posturale e distonia nucale e troncolare. La demenza è una caratteristica comune alle ultime fasi della malattia (Litvan, 1997).

Neuropatologicamente, PSP è caratterizzata da perdita neuronale, gliosi e formazione di NFT. I grovigli neurofibrillari sono stati descritti nei gangli basali, nel tronco encefalico e nel cervelletto (Steele et al., 1964), la corteccia motoria primaria è più severamente affetta delle aree neocorticali associative, rispetto ad AD. Inoltre, sono stati descritti grovigli neurofibrillari gliali (Hauw et al., 1990). Un'altra differenza rispetto ad AD deriva dalla presenza di filamenti dritti e non di PHF.

Il profilo elettroforetico delle proteine tau patologiche in PSP è sostanzialmente diverso da quello di AD e si trova come doppietta caratteristica (tau64 e tau69) (Flament et al., 1991). Si trova anche una banda minore di 74 kDa. Infatti, le isoforme tau iperfosforilate con la sequenza codificata dall'esone 10 sono molto più abbondanti e si aggregano in filamenti, mentre le isoforme tau senza esone 10 non vengono rilevate (Mailliot et al., 1998). Tuttavia, la maggior parte dei siti di fosforilazione trovati in PHF-tau sono presenti anche in proteine tau patologiche di pazienti PSP (Schmidt et al., 1996).

La mappatura biochimica eseguita su diverse aree corticali e subcorticali del cervello ha mostrato che la doppietta tau64 e 69 è rilevata prima nelle regioni subcorticali, dove si trovano gli NFT, e che le aree neocorticali sono colpite in seguito (Vermersch et al., 1994). È interessante notare che la presenza di NFT in aree corticali è sempre correlata alla demenza.

Alcuni polimorfismi tau specifici possono essere un fattore di rischio per PSP: questi polimorfismi si basano su un diverso numero di ripetizioni del dinucleotide (TG)

presente nell'introne tra gli esoni 9 e 10, gli individui con 11 ripetizioni del dinucleotide (allele A0) sembrano avere un rischio maggiore di sviluppare PSP (Hoenicka et al., 1999).

4.6 DEGENERAZIONE CORTICOBASALE

La degenerazione corticobasale (CBD) è una malattia neurodegenerativa sporadica rara e a lenta progressione. È clinicamente caratterizzata da disturbi cognitivi, come afasia, aprassia e da disfunzione motoria extrapiramidale, come rigidità, distonia degli arti, tremore e acinesia (Rebeiz et al., 1968). Una demenza moderata emerge, a volte in ritardo, nel corso della malattia (Rinne et al., 1994). L'esame neuropatologico rivela un'atrofia frontoparietale (Wakabayashi et al., 1994) e alterazioni gliali e neuronali. La patologia gliale è tipicamente rappresentata sia da placche astrocitarie che da numerose inclusioni tau-positive nella sostanza bianca, mentre i neuroni, con assoni dilatati e numerose varicosità, sono presenti sia nella corteccia che nelle aree subcorticali.

Il profilo elettroforetico delle proteine tau patologiche in CBD è composto da una doppietta tau₆₄, 69. È stato riportato che le isoforme tau con la sequenza codificata dall'esone 10 sono state evidenziate in CBD, mentre le isoforme senza esone 10 non sono state rilevate. Questi dati suggeriscono che le isoforme che aggregano in filamenti in CBD siano principalmente quelle con quattro domini di legame ai microtubuli (Mailliot et al., 1998).

4.7 MALATTIA DI PICK

La malattia di Pick (PiD) è una rara forma di malattia neurodegenerativa caratterizzata da un processo di demenza progressiva. All'inizio del decorso clinico, i pazienti mostrano segni di disinibizione frontale inclusi disturbi dell'umore e impoverimento progressivo della lingua che porta al mutismo (Constantinidis et al., 1974). Neuropatologicamente, la malattia di Pick è caratterizzata da un'importante atrofia lobare frontotemporale, gliosi, grave perdita di neuroni e presenza di inclusioni neuronali chiamate corpi di Pick nelle strutture corticali e sottocorticali (Brion et al., 1991).

I corpi di Pick sono inclusioni citoplasmatiche di tau, con una densità superiore nell'ippocampo rispetto alla neocorteccia (Buée-Scherrer et al., 1996). Nell'ippocampo, i corpi di Pick sono numerosi nelle cellule dei granuli del giro dentato, nel campo CA1, nel subiculum e nella corteccia entorinale, mentre nella neocorteccia si trovano principalmente nei livelli II e VI del segmento anteriore del lobo temporale e frontale. Alcuni NFT possono essere trovati anche nell'ippocampo e di solito sono considerati parte dell'invecchiamento.

L'analisi biochimica ha rivelato la presenza di una doppietta tau_{55, 64} nell'isocorteccia, nelle aree limbiche e nei nuclei sottocorticali (Buée-Scherrer et al., 1996). Inoltre, viene osservata una banda molto debole corrispondente a 69 kDa. La doppietta è caratteristica della malattia di Pick, perché è diversa dalla tripletta tau di Alzheimer e dalla doppietta in CBD e PSP. Il peso molecolare della doppietta indica che sia assente l'espressione dell'esone 10. Questo esone non è espresso nei neuroni dei granuli del giro dentato dell'ippocampo (Delacourte et al., 1996), suggerendo che la degenerazione di popolazioni neuronali selettive nelle diverse taupatie rifletta l'espressione delle diverse isoforme.

4.8 SINDROME DI DOWN

Causata dalla trisomia del cromosoma 21, la sindrome di Down (DS), provoca disfunzioni somatiche che si verificano durante lo sviluppo. In particolare, un deficit di crescita e di maturazione del cervello che porta ad un grado variabile di deterioramento cognitivo che di solito conduce alla demenza dopo 50 anni di età (Hof et al., 1999). Neuropatologicamente, è descritta una grave perdita neuronale nella formazione dell'ippocampo e nella neocorteccia, nonché nelle strutture sottocorticali. La formazione di NFT e depositi di amiloide avviene prima della perdita neuronale. Un'alta densità di depositi di amiloide si osserva dopo i 15 anni, seguita dalla deposizione di massa di placche senili nel successivo decennio di vita. La degenerazione neurofibrillari con accumulo di tau appare più tardi (Hof et al., 1995). La formazione ippocampale, tra cui la corteccia entorinale, contiene il maggior numero di NFT. La distribuzione laminare di NFT e SP è simile a quella di AD (Hof et al., 1995). Si è dimostrata la presenza della tripletta tipica di proteina tau

patologica nell'isocorteccia di pazienti DS sopra i 35 anni, indicando che le disfunzioni biochimiche legate a tau sono molto simili a quelle trovate in AD.

4.9 MALATTIA DI NIEMANN-PICK DI TIPO C

La malattia Niemann-Pick di tipo C (NPC) è una malattia autosomica recessiva ad accumulo lisosomiale, caratterizzata da un difetto del trasporto del colesterolo, con accumulo di colesterolo e altri glicolipidi all'interno delle cellule. La malattia è causata da mutazioni nei gene NPC1 (95%) e NPC2 (5%). L'esordio può essere nella prima infanzia, nell'adolescenza o, talvolta, in età adulta. Le manifestazioni comuni sono atassia cerebellare, disartria, cataplessia, oftalmoplegia verticale sopranucleare, patologia convulsiva, e, spesso, demenza progressiva a partire dai 3-15 anni di età (forme infantili tardive e giovanili, 60-70% dei casi) o successivamente (forma adulta, 10% dei casi con disturbi psichiatrici più frequenti).

Neuropatologicamente, i cervelli di pazienti NPC mostrano distensione neuronale nella corteccia ed assoni gonfi nel tronco encefalico. Nei casi con decorso cronico progressivo, NFT con PHF sono presenti in molte parti del cervello, tra cui l'ippocampo, la corteccia e diverse strutture sottocorticali (Love et al., 1995). La PHF-tau nel cervello NPC ricco di grovigli è indistinguibile dalla PHF-tau del cervello AD (Auer et al., 1995).

4.10 MANCANZA DI PATOLOGIA IN ALCUNI NEURONI

In AD, i neuroni del cervelletto sono resistenti alla degenerazione (Hyman et al., 1994) e non presentano aggregati. Ciò può essere dovuto al basso contenuto di tau in questi neuroni (Bu et al., 2002), sebbene nelle malattie come la Niemann-Pick di tipo C, la tau cerebellare sembri essere iperfosforilata (Bu et al., 2002).

In neuroni del sistema nervoso periferico sono stati trovati aggregati tau non aberranti. Questo può riflettere la presenza dell'esone extra 4A nella proteina tau che ne impedisce l'auto-assemblaggio (Perez et al., 2001).

5. DEMENZA FRONTOTEMPORALE

5.1 ASPETTI GENERALI

La demenza frontotemporale (FTD) ha una prevalenza di 5-15 casi su 100000 nel gruppo di età tra i 45 e 65 anni (Ratnavalli et al., 2002). Clinicamente è caratterizzata da severi cambiamenti comportamentali e difficoltà di linguaggio con disfunzioni cognitive che appaiono successivamente (Neary et al., 1998). Molti casi sono sporadici, ma il 20-30% sono familiari (Poorkaj et al., 2001).

La caratteristica patologica maggiore è l'atrofia della corteccia frontotemporale, con perdita neuronale, gliosi e spongiosi degli strati superficiali. Il coinvolgimento delle strutture del lobo mediale temporale, come ad esempio, la corteccia entorinale, l'ippocampo e l'amigdala è molto variabile, mentre è comune la degenerazione della substantia nigra e dei gangli basali.

I casi di FTD sono patologicamente eterogenei e possono essere divisi in tre sottogruppi principali in base al tipo di inclusioni proteiche nel cervello: FTD con inclusioni tau-positive, FTD con inclusioni ubiquitina-positive, tau-negative e FTD senza istopatologia distintiva (Mackenzie et al., 2006). Il termine malattia di Pick è riservato ai casi di FTD con inclusioni intraneuronali argirofiliche, chiamate corpi di Pick, composti da tau anormale. I corpi di Pick sono presenti nel 10-30% dei casi di FTD sporadici (Hodges et al., 2004).

Circa il 30% dei casi di FTD familiare è causato da mutazioni in MAPT e caratterizzato da patologia tau (Poorkaj et al., 2001). Una porzione sostanziale (20-40%) delle FTD ereditarie non ha mutazioni in MAPT (Kertesz et al., 2000), alcune famiglie caratterizzate dalla presenza di inclusioni ubiquitina-positive, tau-negative mostrano un linkage sul cromosoma 17q21, con mutazioni nel gene della progranulina (Baker et al., 2006). Sono state identificate anche mutazioni nel gene della proteina contenente valosina (VCP) sul cromosoma 9p13.3 e nel gene CHMP2B sul cromosoma 3p11.2 (Skibinski et al., 2005). Casi familiari di FTD con inclusioni ubiquitina-positive contengono TDP-43 (TAR che legano il DNA protein-43) (Arai et al., 2006).

5.2 ETÀ D' ESORDIO

La presentazione clinica è correlata al tipo ed alla localizzazione delle mutazioni in MAPT. Inoltre, esiste un'alta variabilità inter ed intra-familiare per alcune mutazioni. L'età di insorgenza per la P301L e altre mutazioni è tra i 45 e i 65 anni, anche se esistono casi di insorgenza più tardiva (65-70 anni) o, per alcune mutazioni introniche, più precoce (circa 40 anni) (Spillantini et al., 1997).

I sintomi clinici si possono sviluppare anche prima, tra i 20 e 30 anni, in pazienti con mutazioni P301S, L315R, G335V e G335S (Bugiani et al., 1999, Sperfeld et al., 1999), o tra i 30 e i 44 anni nei pazienti con mutazioni L266V e N279K (Hogg et al., 2003). In casi con mutazioni R5H e I260V si è verificata un'insorgenza tardiva dopo i 70 anni (Grover et al., 2003).

La durata media della malattia è tra 8 e 10 anni con l'eccezione della mutazione R406W caratterizzata da un lento tasso di progressione della malattia che dura fino a 25 anni (van Swieten et al., 1999). I pazienti con un'età di insorgenza precoce spesso mostrano una progressione più aggressiva della malattia, che porta alla morte entro 5 anni (Bugiani et al., 1999).

5.3 MUTAZIONI

La demenza frontotemporale ereditaria (FTDP-17) è una patologia autosomica dominante che comprende diversi disordini familiari descritti precedentemente come entità a sé stanti, come la malattia di Pick ereditaria, la gliosi sottocorticale familiare e la demenza autosomica dominante con NFT diffusi. Nel 1998 sono state identificate mutazioni esoniche ed introniche in MAPT, dimostrando che difetti genetici sono responsabili della neurodegenerazione (Hutton et al., 1998). Sono state descritte poche mutazioni di MAPT nel mondo, alcune presenti in singole famiglie, la più comune è la P301L con più di 20 famiglie affette tra Stati Uniti, Francia, Olanda, Giappone e Italia.

5.4 MECCANISMI MOLECOLARI

Sono state identificate 71 mutazioni nel gene MAPT (database <http://www.molgen.ua.ac.be/>), di cui 44 con effetto patogenetico chiaro, 1 con effetto non chiaro e 16 non patogenetiche. Le 44 mutazioni patogenetiche possono essere

raggruppate in base alla posizione nel gene, che a sua volta, definisce i loro effetti sul mRNA e sulla proteina, così come la patologia risultante.

La maggior parte delle mutazioni cade nella regione codificante e include mutazioni missenso, delezioni e mutazioni silenti. Le mutazioni introniche localizzate vicino al sito donatore di splicing nell'introne successivo all'esone 10 sono comuni.

Gran parte delle mutazioni della regione codificante sono localizzate nella regione di legame ai microtubuli (esone 9-12) o vicino ad essa (esone 13), ma sono presenti anche due mutazioni nell'esone 1. Le mutazioni che cadono nell'esone 10 colpiscono solo le isoforme a quattro ripetizioni, mentre le altre tutte le sei isoforme.

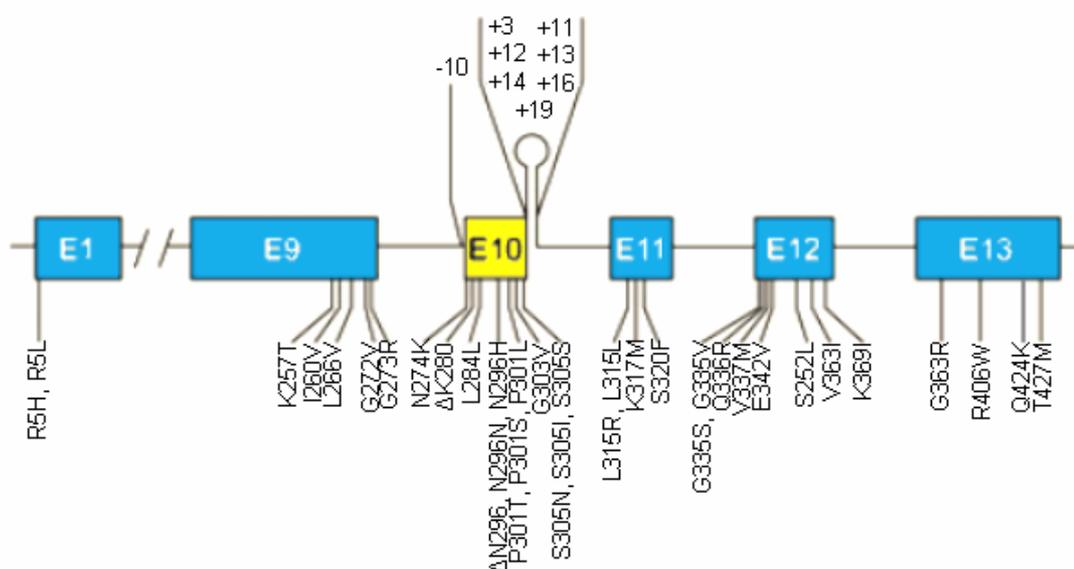


Fig.7: Localizzazione delle 44 mutazioni patogenetiche (mod. da Goedert et al. 2006).

Le mutazioni possono essere classificate sulla base del loro effetto patogenetico, tuttavia questa divisione non è assoluta, poiché alcune mutazioni hanno effetti multipli. Il primo gruppo è quello che comprende le mutazioni che influenzano l'interazione con i microtubuli. Sono mutazioni missenso localizzate nella regione di legame ai microtubuli che possono causare una riduzione dell'affinità di tau come, ad esempio, la P301L e la P301S nell'esone 10, oppure un aumento dell'abilità di tau nel promuovere l'assemblaggio dei microtubuli come la Q336R nell'esone 12 (Pickering-Brown et al., 2004).

Una riduzione del legame ai microtubuli è causata anche da una mutazione presente nell'esone 1 (Hayashi et al., 2002), esterno alla regione di legame. Questo effetto può essere mediato da un cambiamento conformazionale nel dominio di proiezione

ammino-terminale, che porta ad alterazioni nel traffico e/o nella compartimentalizzazione di tau, interessando l'interazione con i microtubuli. Altre modificazioni funzionali possono essere causate dall'introduzione o dalla rimozione di potenziali siti di fosforilazione, come nel caso delle mutazioni K257T, P301S e S320F (Hasegawa et al., 1998).

Il secondo gruppo comprende le mutazioni (ad esempio K257T) con un'azione profibrillogena. K257T, infatti, stimola l'assemblaggio eparina-indotto della tau 3R *in vitro*, ma non ha effetti sulle forme 4R. Questo è in accordo con le osservazioni fatte in pazienti con questa mutazione, i cui filamenti sono costituiti principalmente da tau 3R (Rizzini et al., 2000).

Il terzo gruppo comprende tutte le mutazioni introniche e alcune di quelle della regione codificante, che influenzano lo splicing dell'esone 10 e alterano il rapporto delle isoforme. La maggior parte delle mutazioni introniche aumentano lo splicing dell'esone 10, aumentando l'espressione delle isoforme a 4R. La mutazione +19, invece, riduce lo splicing dell'esone 10 e porta ad un aumento delle forme a 3R (Stanford et al., 2003).

Anche alcune mutazioni esoniche alterano il rapporto tra le isoforme: in particolare le mutazioni missenso N279K, G303V e S305N, e le mutazioni silenti L284L, N296N e S305S, aumentano lo splicing dell'esone 10 con una forza diversa dipendente della loro posizione (Goedert et al., 1999, Miyamoto et al., 2001). Questa alterazione delle isoforme può avvenire interrompendo la struttura secondaria del mRNA, che forma un loop stabile tra l'esone 10 e l'introne a valle; tutte le mutazioni introniche analizzate ad oggi, la mutazione missenso S305N e la silente S305S influenzano la stabilità e la struttura di questo loop.

Un meccanismo alternativo prevede la distruzione delle sequenze regolatorie dello splicing portando ad un'eccessiva produzione di isoforme 4R (mutazioni N279K, L284L, N296N e S305N) (D'Souza et al., 2002). Il fatto che molte mutazioni agiscano sull'aumento dell'espressione delle isoforme a 4 ripetizioni provocando la formazione di depositi di tau, ribadisce l'importanza del normale bilanciamento tra le isoforme per una corretta funzione neuronale (Goedert, 2004).

L'effetto patogenetico dovuto all'aumento delle isoforme 4R potrebbe essere dovuto alla saturazione dei siti di legame ai microtubuli, che porta ad un aumento delle tau

4R non associate, che sono più inclini alla fosforilazione e all'auto-aggregazione. Un'altra possibilità è che la maggiore associazione con i microtubuli possa creare una concentrazione locale più alta di tau 4R e, di conseguenza, un microambiente migliore per l'aggregazione. Nei casi in cui le mutazioni spostino il rapporto a favore delle isoforme 3R, il minor legame ai microtubuli porterebbe ad un aumento della concentrazione citosolica di tau che favorisce l'auto-aggregazione.

Molte mutazioni missenso localizzate nell'esone 10 esercitano i loro effetti sia a livello della proteina che dell'RNA. Le mutazioni $\Delta K280$, $\Delta N296$ e $N296H$ riducono notevolmente la capacità di tau di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli *in vitro*, ma hanno effetti diretti anche sullo splicing dell'esone 10. $\Delta K280$ rappresenta un'eccezione, in quanto riduce lo splicing dell'esone 10 portando ad un aumento della tau 3R (D'Souza et al., 1999).

La mutazione $E342V$ (esone 12) riduce la capacità di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli *in vitro*, ma sembra anche portare ad un aumento preferenziale delle forme a 4R senza inserti N-terminali (Lippa et al., 2000). Sembra quindi agire con un meccanismo senza precedenti, influenzando non solo lo splicing dell'esone 10, ma anche quello dell'esone 2 e 3, promuovendo l'aggregazione di tau in filamenti.

5.5 RILEVANZA DELLE MUTAZIONI IN TAUPATIE SPORADICHE

La disfunzione di tau è molto probabilmente di importanza centrale per la patogenesi di patologie sporadiche caratterizzate dalla presenza di filamenti tau, come AD, PSP, CBD e PiD. Questo è sottolineato anche dal fatto che le suddette patologie sono fenocopie parziali o complete dei casi di FTD (Lee et al., 2001). È stato dimostrato che nove mutazioni missenso in MAPT danno luogo ad un fenotipo clinico e neuropatologico che ricorda la malattia di Pick (Spillantini et al., 1998, Lippa et al., 2000, Rosso et al., 2002).

PSP e CBD sembrano essere fenocopie di alcune mutazioni tau. Così individui con mutazioni $R5L$, $N279K$, $DN296$, $S305S$ e con la mutazione intronica +16 presentano quadri clinici simili alla PSP (Stanford et al., 2000, Morris et al., 2003), mentre alcuni individui con mutazioni $N296N$ e $P301S$ hanno una patologia simile alla CBD (Spillantini et al., 2000, Bugiani et al., 1999).

Anche gli aplotipi tau sembrano avere una correlazione con altre taupatie sporadiche. L'omozigotà per l'allele H1 sembra predisporre a PSP e CBD (Baker et al., 1999, Houlden et al., 2001). Inoltre, alcuni gruppi hanno descritto una significativa ma debole associazione tra l'aplotipo H1 e il Parkinson idiopatico, una patologia non caratterizzata da una patologia tau significativa (Pastor et al., 2000, Healy et al., 2004). Tuttavia, le conseguenze risultanti dalla presenza di uno o dell'altro aplotipo non sono state ancora completamente chiarite.

6. MODELLI ANIMALI

6.1 EUCARIOTI INFERIORI

La generazione di modelli di taupatie in organismi superiori è problematica per la difficoltà della manipolazione del genoma, così sono stati utilizzati eucarioti inferiori, come *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Zebrafish e lampreda, per analizzare i meccanismi d'azione di tau che contribuiscono alla neurodegenerazione. Alcuni dei vantaggi di questi organismi sono i costi di mantenimento meno elevati, la massima produzione possibile e la semplicità dello screening per le mutazioni.

L'espressione di una tau umana wild-type (WT) o con la mutazione R406W in *Drosophila* produce una progressiva neurodegenerazione e morte prematura in entrambi i modelli, sebbene la tossicità prodotta dalla tau mutata sia più alta di quella prodotta dalla tau WT e l'età di insorgenza sia precedente (Wittmann et al., 2001). È interessante notare il fatto che, in questi modelli, la neurodegenerazione si verifica senza la formazione dei grovigli neurofibrillari. L'aumentata espressione della tau umana wild-type e dell'omologo della chinasi GSK3 β (Shaggy/zeste white 3) produce, invece, patologia neurofibrillare, sottolineando l'importanza di GSK-3 in questo processo (Avila et al., 2004).

La lampreda, un vertebrato inferiore, è stato utilizzato per studiare il metabolismo della proteina tau umana in neuroni specifici attraverso la microiniezione di plasmidi. Grazie a questo modello, è stato dimostrato che il dominio carbossi-terminale di tau è necessario per il suo trasporto agli assoni o ai dendriti (Hall et al., 1997). In questo sistema, i filamenti tau sono associati alla perdita dei microtubuli dei dendriti e delle sinapsi, indipendentemente dell'isoforma di tau espressa (Hall et al., 2001).

C. elegans è un organismo con caratteristiche uniche che ne fanno un ottimo modello per la ricerca: è un complesso animale multicellulare che contiene nell'adulto un numero costante di 959 cellule somatiche, con un sistema nervoso di 302 neuroni che formano approssimativamente 7000 sinapsi. Inoltre, non solo il numero di cellule è costante, ma anche la loro posizione. L'espressione della tau mutata P301L e V337M in *C. elegans* porta ad anomalie comportamentali, sinaptiche e patologiche e causa un fenotipo più precoce e più severo rispetto a quello dato dall'aumento di espressione della tau umana wild-type (Gotz et al., 2010). Uno studio sulla fosforilazione di tau ha mostrato che questa non sembra correlata alla severità del fenotipo, inoltre, i sintomi neurologici sembrano comparire prima che la tau insolubile si accumuli (Kraemer et al., 2003). Questo potrebbe indicare che la tossicità non dipenda dalla formazione degli aggregati.

6.2 MODELLI MURINI

Sono stati utilizzati diversi approcci per creare modelli murini transgenici che riproducessero la patologia umana: l'espressione di tau umana wild-type o mutata, l'aumentata regolazione di una chinasi o la diminuita regolazione di una fosfatasi (Tabella 1).

Il primo modello di topo transgenico per tau esprimeva l'isoforma umana wild-type più lunga (2N4R) sotto il controllo del promotore umano neurone-specifico Thy1 (Götz et al., 1995). Si osservava la formazione di pre-filamenti, l'iperfosforilazione di tau, ma non lesioni neuropatologiche. La sostituzione del promotore umano con quello murino (Thy1.2) ha portato alla comparsa di degenerazione assonale, ma non di grovigli neurofibrillari (Probst et al., 2000).

Un grosso aumento dell'espressione del transgene si è ottenuto grazie all'utilizzo del promotore murino PrP, che ha permesso un incremento dell'espressione della proteina tau di circa 10 volte con la formazione di inclusioni simili agli NFT nei neuroni corticali e nel tronco encefalico, correlate a degenerazione e riduzione del trasporto assonale, gliosi e debolezza (Ishihara et al., 1999).

Successivamente è stato creato un modello (JNPL3) che esprimeva la proteina tau mutata P301L e che, per la prima volta, riproduceva la formazione e l'aggregazione dei grovigli neurofibrillari a livello del tronco encefalico, del diencefalo, ma

soprattutto del midollo spinale, con una perdita di circa il 50% dei neuroni e conseguente disfunzione motoria (Lewis et al., 2000). Gli animali mostravano, inoltre, gliosi, degenerazione assonale e deficit comportamentali. Questo è tuttora, il modello più utilizzato per lo studio dei meccanismi associati alla patologia tau.

In uno studio molto interessante è stato utilizzato questo modello con un vettore inducibile, che dava la possibilità di sopprimere l'espressione del transgene P301L con l'aggiunta di doxiciclina. La soppressione del transgene ha portato ad un ripristino delle funzioni mnemoniche e ad una stabilizzazione del numero di neuroni, nonostante il continuo accumulo dei grovigli neurofibrillari (Santacruz et al., 2005). Questo suggerisce che sia la tau solubile ad essere neurotossica e non gli NFT, che da soli non sono sufficienti a causare il declino cognitivo e la morte neuronale.

La perdita neuronale è maggiore in topi che esprimono la mutazione P301S rispetto alla P301L, in accordo con l'insorgenza precoce della patologia nei pazienti con questa mutazione (Allen et al., 2002). Filamenti sono stati trovati anche in topi transgenici che esprimono le mutazioni R406W (Tatebayashi et al., 2002) e V337M (Tanemura et al., 2001).

Uno studio recente ha fatto emergere un interessante e nuovo aspetto di tau: la sua trasmissione, secrezione e diffusione (Clavaguera et al., 2009). Infatti, l'estratto cerebrale derivato da topi P301S ed iniettato in topi ALZ17 (che esprimono la tau WT e che, di conseguenza, non sviluppano NFT) induce la formazione di NFT che non rimangono confinati al solo sito di iniezione. Sembra quindi che ci sia un'induzione della patologia, di cui sarebbe responsabile la tau insolubile. La teoria è supportata da uno studio simile che mostra come gli aggregati tau possano trasmettere lo stato fibrillare/non correttamente ripiegato dall'esterno all'interno delle cellule, in modo simile ai prioni (Frost et al., 2009).

I pazienti con FTD manifestano la presenza di inclusioni tau sia negli oligodendrociti che negli astrociti. Per questo alcuni studi hanno cercato di riprodurre questa caratteristica *in vivo* attraverso l'espressione di tau umana P301L e WT sotto il controllo dei promotori della 2',3'-ciclic nucleotide 3'-fosfodiesterasi (Higuchi et al., 2005) e della proteina acida fibrillare della glia (GFAP; Forman et al., 2005) rispettivamente. Entrambe le linee presentano disfunzioni neuronali e degenerazione assonale, mostrando che la patologia gliale colpisce anche i neuroni.

Un altro approccio per generare modelli animali di taupatie è quello di esprimere maggiormente le chinasi responsabili dell'iperfosforilazione di tau. Le prime linee di animali transgenici per GSK-3 β avevano un bassissimo livello di espressione della proteina umana e, di conseguenza, di fosforilazione di tau. L'espressione della forma mutata (S9A) che rende GSK-3 β sempre attiva (non viene inibita dalla fosforilazione) sotto il promotore Thy ha portato ad un aumento della fosforilazione solo nei topi più vecchi (Spittaels et al., 1998). L'utilizzo di un sistema condizionale sotto il controllo del promotore della CaM chinasi II ha portato ad un aumento della fosforilazione e a difetti di apprendimento spaziale (Lucas et al., 2001). Questi risultati fanno supporre che il solo aumento di GSK-3 β non sia sufficiente per indurre neurodegenerazione.

Al contrario, la creazione di un modello transgenico che esprimeva la fosfatasi PP2A mutata nella subunità catalitica C α , quindi inattiva, ha portato ad un fenotipo pre-NFT con un aumento della fosforilazione della tau endogena murina (Kins et al., 2001). Questo dimostra il ruolo cruciale di PP2A nella fosforilazione di tau.

Tutti gli animali citati sono riportati in tabella:

Linea	Promotore	Gene	Fenotipo	Autore
ALZ7	hThy1	WT htau40	T	Götz, 1995
ALZ17	mThy1.2	WT htau40	T, M	Probst, 2000
Tg lines 7 and 43	mPrP	WT htau44	T, M, (NFT)	Ishihara, 1999
JNPL3	mPrP	P301L htau43	T, NFT, M, †	Lewis, 2000
pR5	mThy1.2	P301L htau40	T, NFT, MEM	Götz, 2001
Tg214	PDGF	V337M htau40 (myc/FLAG-tagged)	T, NFT, MEM	Tanemura, 2001
R406W Tg	CaMKII	R406W (myc/FLAG-tagged)	T, NFT, MEM	Tatebayashi, 2002
rTg4510 (inducibile)	CaMKII-driven rTA+tetOp	P301L htau43	T, NFT, NL, MEM	Santacruz, 2005
Tau-P301L	mThy1.2	P301L htau40	T, NFT, (M), †	Terwel, 2005
Tau-4R/2N	mThy1.2	WT htau40	T, M	Spittaels, 1999
T-279	MAPT	N279K htau40	T, M, (NFT), NL	Dawson, 2007
(Line 12) PL Tg	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	P301L htau34 (or WT htau34)	T, GFT, M	Higuchi, 2005
GFAP/tau Tg	GFAP	WT htau34	T, GFT	Forman, 2005
P301S tau	mThy1.2	P301S htau43	T, NFT, M, NL	Allen, 2002
PS19	mPrP	P301S htau34	T, NFT, M, NL, †	Yoshiyama, 2007
Tet/GSK-3 β (inducibile)	CaMKII-driven rTA+tetOp	GSK-3 β	T, MEM	Lucas, 2001
GSK-3 β (S9A)	mThy1.2	GSK-3 β (S9A)	T	Spittaels, 2000
Dom1	mThy1.2	PP2A C α L199P (dn)	T	Kins, 2001

Tabella 1: Principali modelli murini transgenici. Legenda: †, morte prematura; dn, mutazione dominante negativa; GFT, formazione di filamenti nella glia; h, isoforma umana; M, fenotipo motorio; MEM, decadimento della memoria; NFT, formazione dei grovigli neurofibrillari; NL, perdita neuronale; T, formazione di tau.

Scopo

Lo scopo principale di questo lavoro è stato quello di studiare il ruolo della proteina tau nella stabilità cromosomica, suggerito dalla sua interazione sia con i microtubuli che con la cromatina, attraverso l'analisi citogenetica di cellule di topi transgenici che esprimono la proteina tau umana mutata e wild-type e di topi controllo. L'analisi è stata condotta su linfociti splenici e fibroblasti, come fonte di cellule non neurali, e su cellule derivate dalla zona sottoventricolare del sistema nervoso centrale.

In letteratura è stato riportato che cellule somatiche di pazienti affetti da demenza frontotemporale causata dalla mutazione P301L mostrano aberrazioni cromosomiche numeriche e strutturali, oltre ad anomalie cromatiniche e difetti del fuso mitotico (Rossi et al., 2008). Queste rotture cromosomiche potrebbero essere dovute alla fragilità della struttura cromatinica. La mutazione P301L rende tau un substrato più favorevole per l'iperfosforilazione che può diminuire il legame della proteina ai microtubuli e produrre un fuso instabile che potrebbe spiegare l'errata segregazione cromosomica.

L'utilizzo di un modello animale ha dato la possibilità di confrontare i risultati con quelli ottenuti nell'uomo per migliorare la conoscenza della funzione della proteina e per studiarne il comportamento anche nel sistema nervoso centrale, sede principale della patologia.

Materiali e metodi

Questo progetto di ricerca è stato svolto in collaborazione con l'Istituto Neurologico "Carlo Besta", in particolare con il Laboratorio di Neuropatologia diretto dal Prof. F. Tagliavini. Gli animali omozigoti JNPL3 sono stati acquistati dalla ditta Taconic, mentre gli emizigoti JNPL3 ed in controlli sono stati ottenuti da incroci successivi. Gli emizigoti JN25 sono stati gentilmente forniti dal laboratorio americano della Prof. J. Lewis (Mayo Clinic Jacksonville). Per tutti gli animali è stata verificata la presenza del transgene tramite sequenziamento dalla Dott.ssa G. Rossi. Tutti gli animali sono stati mantenuti ed assistiti nello stabulario dell'Istituto Besta ed i prelievi delle milze, delle zone sottoventricolari e delle biopsie cutanee sono stati eseguiti dai veterinari, in particolare dalle Dott.sse M. Mangieri, C. Vimercati e M. Ruggerone. Le colture di neurosfere sono state preparate dalla Dott.ssa L. Cova del Laboratorio di Neuroscienze dell'Istituto Auxologico Italiano.

La sottoscritta si è occupata dell'analisi citogenetica di tutte le cellule, del loro mantenimento in coltura e dell'analisi statistica dei dati ottenuti.

1. ANIMALI

Sono stati utilizzati topi transgenici per la proteina tau mutata P301L (JNPL3) sia omozigoti che emizigoti, topi transgenici per la proteina tau wild-type (JN25) e topi controllo.

Gli omozigoti JNPL3, che derivano dal ceppo B6D2F1, sono stati ottenuti tramite microiniezione del gene MAPT mutato P301L. Gli emizigoti si sono ottenuti dall'incrocio fra gli omozigoti e il ceppo B6D2F1. I controlli sono stati prodotti come progenie dei topi emizigoti.

I topi sono stati organizzati in gruppi di 2-4 animali in gabbie a ventilazione individuale, con cicli di 12 ore di luce/buio in condizioni di temperatura ed umidità costanti. Sono stati monitorati quotidianamente da un veterinario per valutarne il benessere e lo stato di salute e sono stati sacrificati secondo metodi approvati per ridurre al minimo la sofferenza.

Di seguito sono riportati tutti gli animali utilizzati per il prelievo delle milze e, tra questi, quelli a cui è stato eseguito il prelievo biotico cutaneo (in rosso).

ETÀ (mesi)	OMOZIGOTI JNPL3	EMIZIGOTI JNPL3	CONTROLLI	EMIZIGOTI JN25
21		2		
18		7		
17			2	
16	2	1	2	
15	2	4	4	
14				1
13		1		
12	7 (1)	2	4	
11	4 (1)			
10	2			
9	1			
8	2 (1)		1	
7	2	2		
6	1 (1)	3	2	3
4			2 (1)	5
2	1			2
1	2			
TOT.	26	22	17	11

Per l'analisi diretta delle zone sottoventricolari sono stati utilizzati 31 topi omozigoti transgenici JNPL3 di 5-10 giorni.

Le neurosfere sono state ottenute da zone sottoventricolari isolate da topi controllo, emizigoti JNPL3 ed omozigoti JNPL3 di 7 giorni, e da topi emizigoti JNPL3 di 28 giorni.

2. LINFOCITI DA SANGUE PERIFERICO

Sono state effettuate diverse prove per l'ottenimento di metafasi da sangue periferico. Nel primo caso i linfociti sono stati separati tramite centrifugazione in provetta Vacutainer e seminati in terreno RPMI 1640 (Euroclone) con il 20% di siero fetale bovino (International PBI) e l'aggiunta di lipopolisaccaride (LPS) (Sigma) e fitoemoagglutina (PHA) (Sigma) come mitogeni. Sono state allestite diverse prove variando sia il tempo di coltura (da 48 a 72 ore) che il tempo di Colcemid (Roche) (da 2 a 6 ore). In nessun caso si sono ottenute metafasi.

Successivamente si è utilizzata la concanavalina A (CON-A) (Sigma) come mitogeno variando sia il tempo di coltura che di Colcemid, ma anche in questo caso non si sono ottenute metafasi. Infine, i linfociti sono stati separati tramite gradiente Ficoll,

seminati in terreno completo con l'aggiunta di concanavalina A ed allestiti come i precedenti, ma senza ottenere metafasi.

3. LINFOCITI SPLENICI

Le milze sono state rimosse in modo asettico dai veterinari ed immediatamente piastrate in RPMI 1640 dove sono state omogenate con stantuffo e filtrate per ottenere una sospensione di cellule singole. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 1400 rpm per 7 minuti per due volte e le cellule messe in coltura in RPMI 1640 con 10% di FCS, amminoacidi non essenziali, sodio piruvato, 2mM di L-glutammina, 50 μ M di β -mercaptetanololo e 5 μ g/ml di concanavalina-A per 42 ore a 37°C.

Sono state eseguite diverse prove variando il tempo di coltura (da 42 o 72 ore), il tempo di Colcemid (da 45 minuti a over night) e la sua concentrazione (da 0.1 a 0.67 μ g/ml). L'allestimento usando KCl 0.075 M (Carlo Erba) per 20 minuti a 37°C e soluzione fissativa per 30 minuti in ghiaccio, è stato mantenuto costante in tutte le prove. Le metafasi migliori sono state ottenute con l'aggiunta di Colcemid ad una concentrazione di 0.5 μ g/ml per 45 minuti dopo 42 ore di coltura, e questo protocollo è stato adottato per tutti i successivi allestimenti. Le cellule sono state strisciate su vetrino.

4. FIBROBLASTI

Le biopsie cutanee sono state prelevate in modo asettico dai veterinari, disgregate meccanicamente con l'utilizzo di forbici sterili e piastrate in RPMI 1640 addizionato con il 20% di FCS. La tripsina (Euroclone) è stata utilizzata per i passaggi di coltura. Sono stati valutati diversi protocolli per l'allestimento, le metafasi migliori sono state ottenute con l'aggiunta di Colcemid ad una concentrazione di 0.6 μ g/ml per 4 ore ed il trattamento in soluzione ipotonica cloruro di potassio:sodio citrato (Carlo Erba) 1:1 per 30 minuti a 37°C seguito da soluzione fissativa per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state strisciate su vetrino.

5. CELLULE STAMINALI NEURALI

5.1 ANALISI DIRETTA

Le zone sottoventricolari di topi di 5-10 giorni sono state prelevate in modo asettico dai veterinari e messe intatte in coltura in Opti-Mem (Invitrogen) con 10 ng/ml di FGF-2 (Tebu Bio) e 0.1 µg/ml di Colcemid per 5 ore.

La messa a punto di un protocollo che permettesse di ottenere metafasi valutabili e di buona qualità ha richiesto diverse prove, eseguite variando soprattutto i parametri della soluzione ipotonica. Sono stati utilizzati sodio citrato e cloruro di potassio sia singolarmente che in miscela, con tempi (da 10 a 30 minuti) e temperature diverse (T ambiente o 37°C). Le metafasi migliori si sono ottenute con il trattamento con sodio citrato per 20 minuti a 37°C che è stato mantenuto per tutti gli allestimenti successivi. Al passaggio in soluzione ipotonica è seguito un passaggio in soluzione fissativa metanolo:acido acetico 3:1, ed infine, in soluzione dissociante (acido acetico acquoso 60%).

Le cellule sono state strisciate su vetrini riscaldati su agglutinoscopio, coprendo l'intera superficie con l'utilizzo di una pasteur ad ansa.

5.2 ANALISI DELLE NEUROSFERE

Le neurosfere isolate da topi di 7 e 28 giorni sono state mantenute in coltura in NeuroCult NSC Basal Medium (Stem Cell Technologies) con supplementi e hrEGF (Tebu Bio). Per i passaggi in coltura è stato utilizzato l'enzima Accutase. Le neurosfere sono state centrifugate, risospese con Accutase (Stem Cell Technologies) per 2 minuti a 37°C e rimesse in coltura come cellule singole.

Sono stati utilizzati tempi di Colcemid variabili valutando le differenze di crescita dei diversi tipi di neurosfere. Ad esempio, per le neurosfere controllo ed emizigoti il tempo è stato in media di 6 ore, mentre per le omozigoti, viste le notevoli difficoltà di crescita, si è arrivati fino a 48 ore. Il passaggio in KCl 0.075 M e soluzione fissativa è stato mantenuto costante per tutti i preparati. Le cellule sono state strisciate su vetrino.

6. ANALISI CITOGENETICA

Tutti i vetrini sono stati colorati con mostarda di Quinacrina ottenendo il bandeggio QFQ ed osservate al microscopio a fluorescenza (Leica). Il cariotipo è stato analizzato con l'utilizzo del software Cromowin[®] (Tesi Imaging) e descritto secondo le linee guida redatte dalla Commissione Internazionale per la nomenclatura genetica del topo (Green et al. 1971; rivisitato da Eppig 2005).

7. ANALISI STATISTICA

La significatività statistica nella differenza delle aneuploidie è stata determinata utilizzando il test *t* di Student per gli splenociti, ed il test del chi-quadro per i fibroblasti e per le cellule staminali neurali.

8. SOLUZIONI

✕ FCS: viene addizionato con penicillina (2×10^5 UI/mL) e streptomicina (2×10^5 UI/mL)

✕ RPMI+20%FCS: al terreno RPMI 1640 vengono addizionati 25 mL di FCS ed 1 mL di L-glutammina 200 mM

✕ CLORURO DI POTASSIO: 0.56 g di KCl in 100 mL di acqua sterile

✕ SODIO CITRATO: 1 g di sodio citrato tribasico biidrato in 100 mL di acqua sterile

✕ SOLUZIONE FISSATIVA: soluzione di alcool metilico:acido acetico 3:1

✕ SOLUZIONE DISSOCIANTE: soluzione di acido acetico:acqua sterile 3:2

✕ MOSTARDA DI QUINACRINA: 5 mg di soluzione madre di quinacrina idrocloruro in 100 mL di acqua sterile

✕ TAMPONE McILVAINE: 3.8 g di acido citrico monoidrato e 29.15 g di fosfato bisodico diidrato in 1 litro di acqua sterile

Risultati

Per indagare il potenziale ruolo della proteina tau nella segregazione cromosomica abbiamo analizzato, attraverso tecniche di citogenetica classica, linfociti splenici, fibroblasti e cellule staminali neurali di topi controllo e transgenici.

1. RICERCA DELL'EFFETTO DI TAU MUTATA SULLA CROMATINA E SULLA SEGREGAZIONE CROMOSOMICA

Per poter valutare la presenza di possibili alterazioni numeriche o strutturali indotte dalla tau mutata nelle cellule somatiche si è scelto il sangue come fonte di linfociti. Sono state eseguite diverse prove, sulla base di quanto riscontrato in letteratura, per cercare di ottenere delle metafasi.

1.1 LINFOCITI

Il sangue intero, ottenuto attraverso il taglio della giugulare, è stato separato tramite provetta Vacutainer ed i linfociti sono stati seminati con l'aggiunta di lipopolisaccaride (LPS) e fitoemoagglutinina (PHA) come mitogeni (Akeson et al., 2001, Kanda et al., 2004). Sono state effettuate diverse prove di allestimento, variando il tempo di coltura, la concentrazione e il tempo di trattamento con la colchicina (Colcemid). In nessuno di questi casi si sono ottenute metafasi.

Successivamente, è stata scelta la concanavalina A (CON-A) come mitogeno, ed è stato modificato nuovamente il tempo di coltura e di trattamento con Colcemid. Nemmeno in questo caso sono state ottenute metafasi. Nell'ultima prova il sangue è stato separato tramite gradiente Ficoll, seminato in terreno completo con l'aggiunta di CON-A ed allestito come i precedenti. Non si sono ottenute metafasi.

Poiché non è stato possibile mettere a punto un protocollo che permettesse di ottenere metafasi da linfociti di sangue periferico murino, si è deciso di abbandonare questa metodica.

1.2 LINFOCITI DA MILZA (SPLENOCITI)

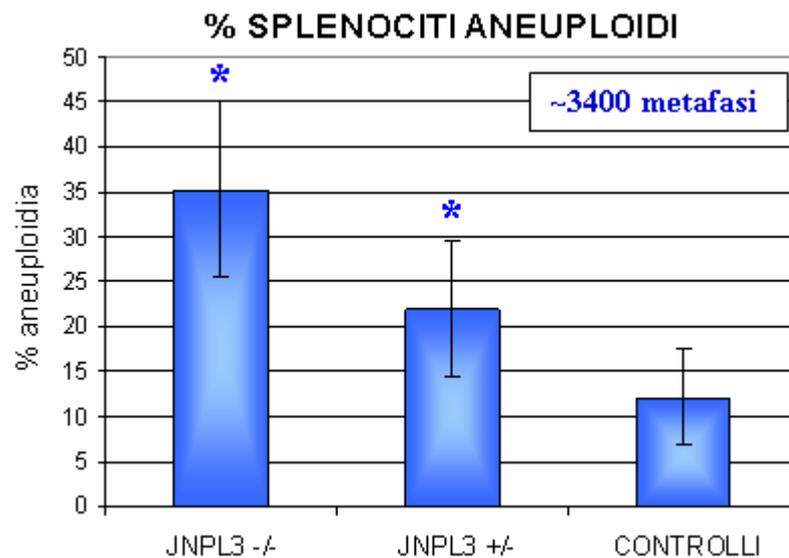
Poiché l'analisi dei linfociti da sangue non ha dato risultati soddisfacenti, si è pensato di utilizzare la milza interamente prelevata, come fonte di linfociti. Un vantaggio di questa tecnica è la possibilità di avere un gran numero di linfociti a disposizione per ogni singolo prelievo, così da poter allestire più di una coltura per animale. Questo ha

permesso di poter ottimizzare in tempi brevi la metodica standard di allestimento, utilizzata poi per tutti i campioni.

Inoltre, gli splenociti possono essere indotti nella divisione cellulare dall'aggiunta di concanavalina A (Kanda et al., 2004), che ha permesso di ottenere un gran numero di metafasi analizzabili in tempi brevi di coltura.

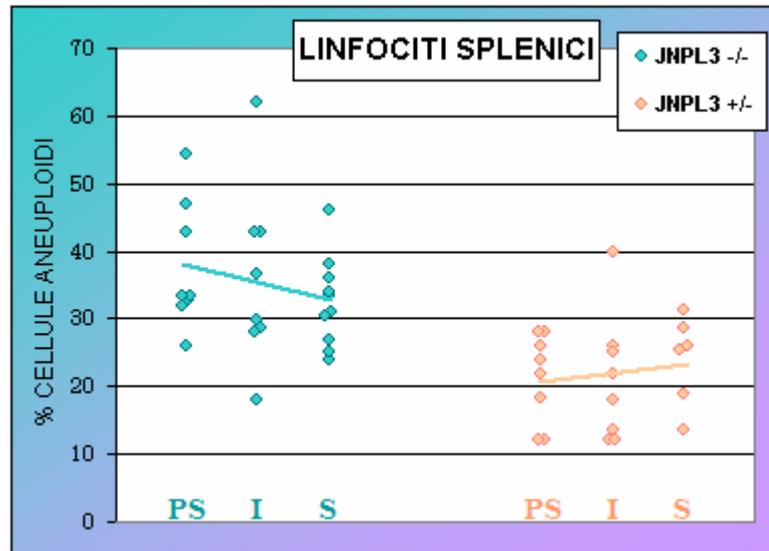
Le cellule sono state arrestate in metafase in seguito al trattamento con Colcemid, colorate con bandeggio QFQ ed il cariotipo descritto secondo le linee guida per la nomenclatura genetica del topo (Green et al. 1971; rivisitato da Eppig 2005).

Per questa analisi sono stati utilizzati inizialmente tre gruppi di animali: topi omozigoti per il transgene con la mutazione tau P301L (JNPL3 -/-), emizigoti P301L (JNPL3 +/-) e topi della stessa famiglia, ma senza transgene, come controlli. Sono stati sacrificati 26 topi omozigoti transgenici a diversi stadi di malattia (8 pre-sintomatici, 8 intermedi e 10 sintomatici a termine), 22 emizigoti transgenici (8 pre-sintomatici, 8 intermedi e 6 sintomatici a termine) e 17 topi controllo, con un totale di 3407 metafasi analizzate.



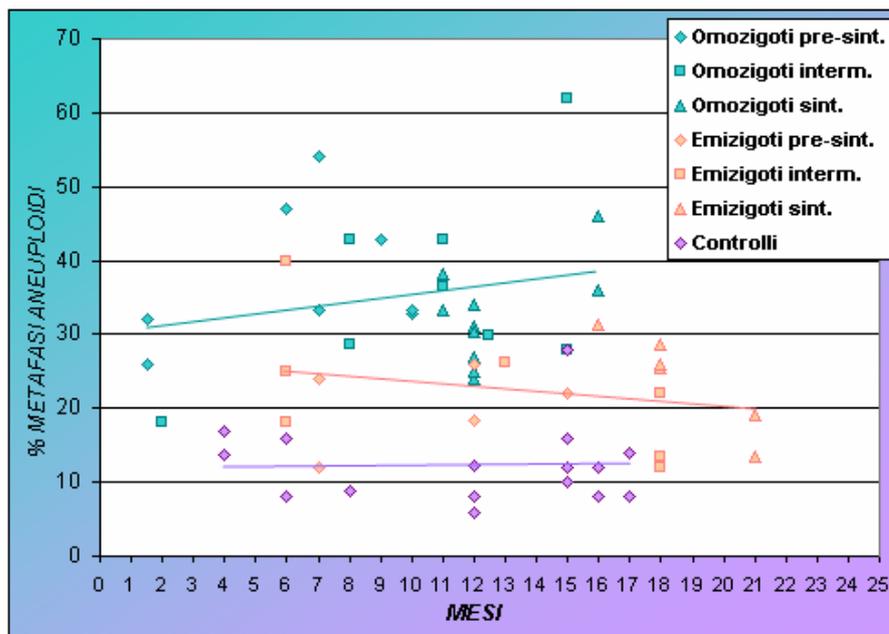
La percentuale di cellule con aneuploidia è risultata in media del 35.2% per gli omozigoti contro il 21.95% degli emizigoti e il 12.1% dei controlli, con una differenza statisticamente significativa tra i diversi gruppi ($p=0$, t di Student). Il numero di cellule aneuploidi sembra, quindi, essere correlato non solo con la presenza, ma anche con la dose del transgene.

Per poter valutare il possibile ruolo della progressione della patologia e dell'aumento della gravità dei sintomi rispetto al livello delle aneuploidie, abbiamo deciso di suddividere i risultati degli animali transgenici in tre gruppi principali in base alla sintomatologia: pre-sintomatici (PS), sintomatici intermedi (I) e sintomatici a termine (S).

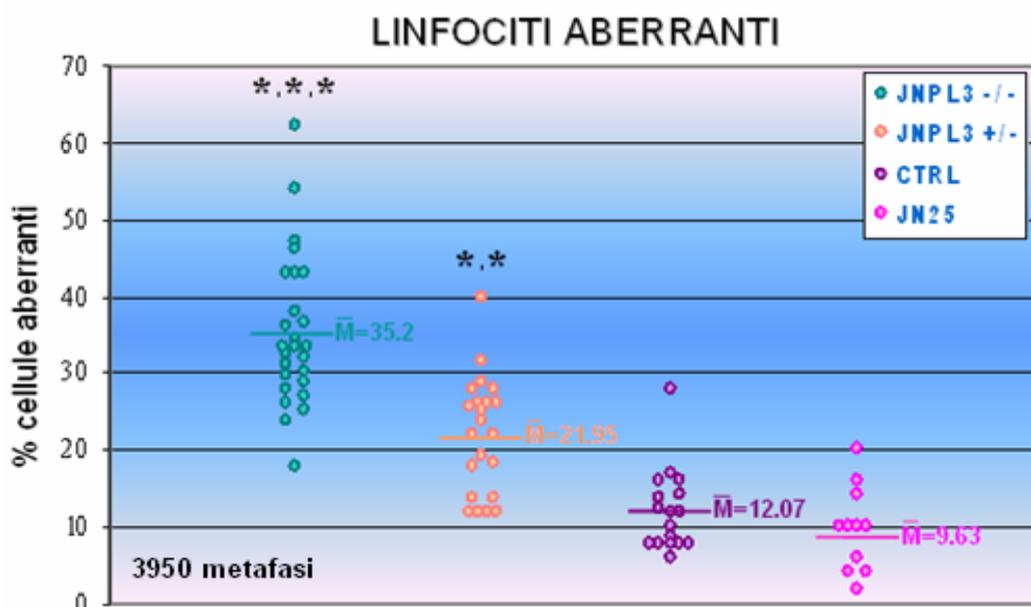


Gli omozigoti passano da una media di cellule aneuploidi del 37.67% nei pre-sintomatici al 32.49% nei sintomatici a termine, al contrario negli emizigoti vi è un aumento dal 21.28% al 24%. Tra i diversi stadi di malattia all'interno dei gruppi non è presente una differenza significativa, ma sembra esserci una tendenza alla diminuzione delle aneuploidie con l'aumento della gravità dei sintomi negli omozigoti ed una tendenza contraria negli emizigoti.

Analizzando invece l'andamento delle aneuploidie in rapporto all'età degli animali, indipendentemente dalla sintomatologia, si osserva una tendenza opposta rispetto a quella vista precedentemente sia per gli omozigoti che per gli emizigoti.



Per stabilire se le differenze nel livello di aneuploidie riscontrate nei tre gruppi di topi siano dovute al solo inserimento del transgene o all'effettivo ruolo della mutazione di tau, sono stati aggiunti all'analisi topi transgenici emizigoti per la proteina tau wild-type (JN25). Sono state analizzate 550 metafasi da 11 topi, ottenendo una percentuale di cellule aneuploidi del 9.63%, paragonabile a quella dei controlli.

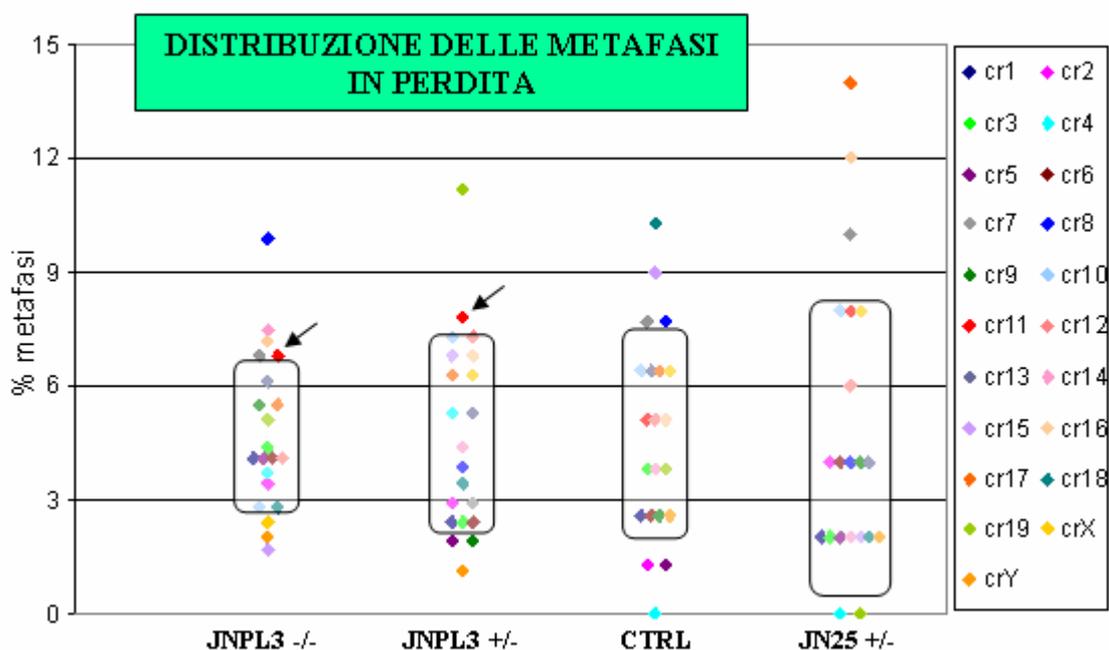


Sia gli omozigoti che gli emizigoti transgenici per la proteina mutata mostrano una differenza significativa ($p=0$, t di Student) nel numero di linfociti aberranti rispetto agli emizigoti per la proteina wild-type. Non c'è invece differenza tra i controlli e i topi JN25.

Il passo successivo è stato quello di valutare se le perdite/guadagni presenti in queste cellule fossero clonali o casuali. Sono state ricostruite dal 32 al 70% delle metafasi (32% negli omozigoti JNPL3, 52% negli emizigoti JNPL3, 62% nei controlli e 70% nei JN25), compatibilmente con la buona qualità del bandeggio, fondamentale per il riconoscimento dei cromosomi murini, tutti acrocentrici.

Nelle tabelle sono riportate le percentuali (sul totale delle metafasi ricostruite) di perdita e guadagno per ogni cromosoma in ogni gruppo di animali. Considerando 4.76 come valore medio di perdita random per ogni cromosoma (100% di perdite/20 cromosomi) e 4.54 il valore medio di guadagno random per cromosoma (100% di perdite/21 cromosomi+marcatori), in rosso e in verde sono indicati i valori che si discostano positivamente e negativamente dalla media più o meno la deviazione standard, rispettivamente.

PERDITE	JNPL3 -/-	JNPL3 +/-	CONTROLLI	JN25
CROMOSOMI				
1	4.1	2.4	2.6	2
2	3.4	2.9	1.3	4
3	4.4	2.4	3.8	2
4	3.7	5.3	0	0
5	4.1	1.9	1.3	2
6	4.1	2.4	2.6	4
7	6.8	2.9	7.7	10
8	9.9	3.9	7.7	4
9	5.5	1.9	2.6	4
10	2.8	7.3	6.4	8
11	6.8	7.8	5.1	8
12	4.1	7.3	5.1	6
13	6.1	5.3	6.4	4
14	7.5	4.4	3.8	2
15	1.7	6.8	9	2
16	7.2	6.8	5.1	12
17	5.5	6.3	6.4	14
18	2.8	3.4	10.3	2
19	5.1	11.2	3.8	0
X	2.4	6.3	6.4	8
Y	2	1.1	2.6	2
media±ds/cr	4.76±2	4.76±2.58	4.76±2.69	4.76±3.87



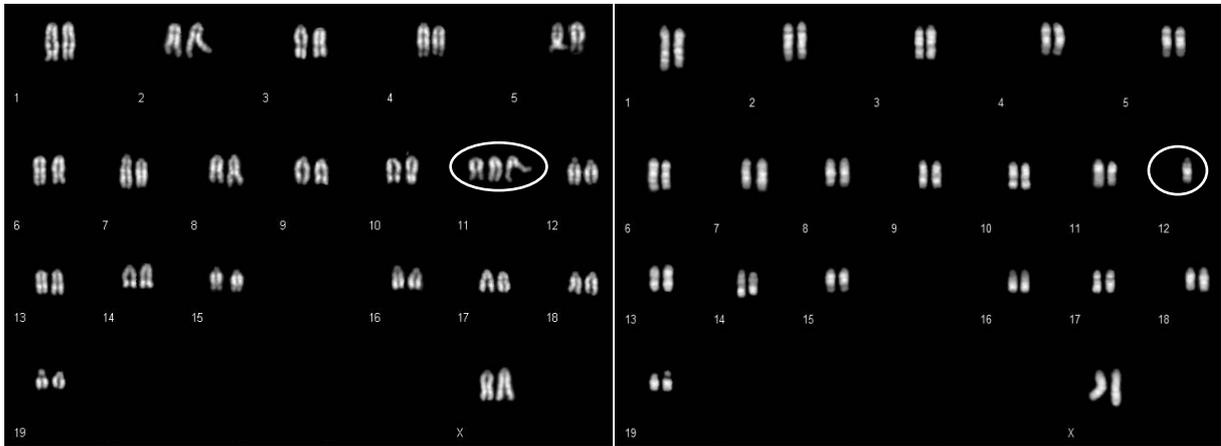
È possibile notare la presenza di perdite di cromosomi preferenziali in ogni gruppo, poche comuni a più gruppi. Risulta esserci una perdita leggermente più elevata del cromosoma 7 in tre dei quattro gruppi e quella del cromosoma 8 comune a omozigoti e controlli. È interessante notare l'aumento nella perdita del cromosoma 11 nei topi JNPL3, sia omozigoti che emizigoti, non presente nei controlli. Va sottolineato che sul cromosoma 11 mappa il gene per la tau murina.

Sembra inoltre esserci una diminuzione della perdita del cromosoma Y comune ai due gruppi di animali transgenici per la tau mutata rispetto ai controlli, nonostante il numero di animali maschi sia simile in tutti i gruppi.

GUADAGNI	JNPL3 -/-	JNPL3 +/-	CONTROLLI	JN25
CROMOSOMI				
1	0	0	0	0
2	2.6	0	0	0
3	2.6	6.2	0	0
4	0	0	0	0
5	2.6	6.2	6.7	0
6	2.6	0	6.7	0
7	5.1	6.2	0	0
8	5.1	0	0	0
9	2.6	6.2	0	0
10	2.6	12.6	6.7	0
11	0	6.2	6.7	0
12	2.6	0	0	0
13	2.6	0	0	0
14	0	12.6	13.3	14.3
15	30.7	6.2	19.9	14.3
16	5.1	12.6	13.3	0
17	5.1	0	13.3	0
18	2.6	12.6	0	28.5
19	12.8	0	0	0
X	5.1	6.2	6.7	14.3
Y	0	0	6.7	14.3
mar	7.6	6.2	0	14.3
media±ds/cr	4.54±6.92	4.54±3.15	4.54±4.67	4.54±5.79

I guadagni sono presenti in numero inferiore rispetto alle perdite, rappresentando il 12.3% delle aneuploidie. Si nota un'elevata percentuale di metafasi con il guadagno del cromosoma 15 nei controlli, nei JN25, ma soprattutto nei JNPL3 omozigoti. È

invece comune ai due gruppi di emizigoti una maggiore tendenza al guadagno del cromosoma 18. Non ci sono elementi comuni tra i due gruppi di animali transgenici per la tau mutata. Da notare, infine, la presenza di marcatori soprannumerari in tutti i gruppi di transgenici, ma non nei controlli.



Esempi di metafasi aneuploidi: una metafase con trisomia del cromosoma 11 (sinistra) e una con perdita del cromosoma 12 (destra).

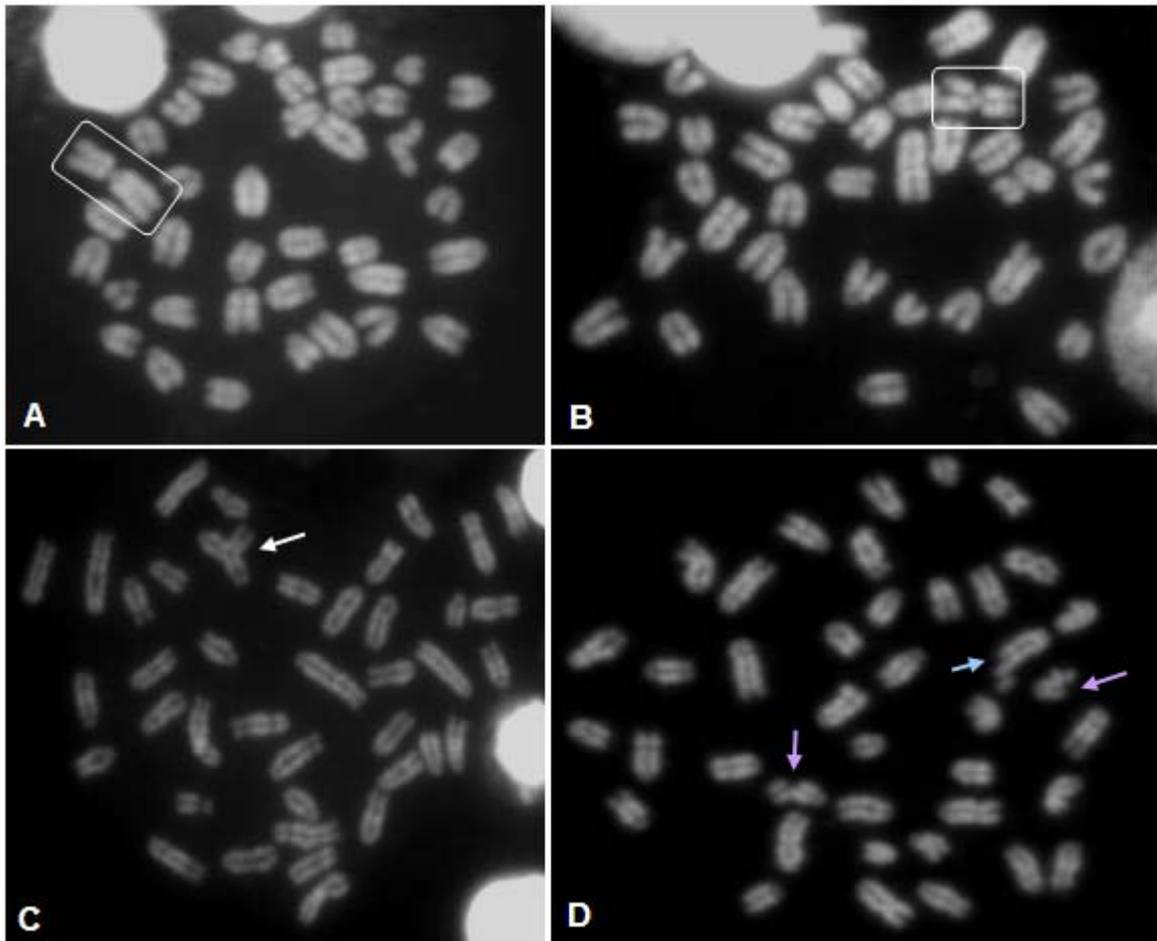
Sono inoltre presenti alcune anomalie strutturali riassunte in tabella. I valori indicano la percentuale calcolata sul totale delle metafasi di ogni campione.

ANIMALI	CTB	CSB	CTG	CSG	DEL	MAR	DER	REA	PCS
Omozigoti JNPL3	3.7	1	0.9	0.06	0.1	0.2	0.3	0	0.2
Emizigoti JNPL3	3.6	1.2	0.6	0.6	0	0.2	0.9	0.1	0
Controlli	3.4	0.6	0.3	0.2	0.1	0	0.1	0	0.1
Emizigoti JN25	2.7	1.3	1.1	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0

LEGENDA: CTB, rottura di un cromatidio; CSB, rottura di entrambi i cromatidi; CTG, gap di un cromatidio; CSG, gap di entrambi i cromatidi; DEL, delezione; MAR, marcatore soprannumerario; DER, cromosoma derivativo da traslocazione; REA, riarrangiamento; PCS, separazione prematura dei cromatidi.

Non sembrano essere presenti differenze significative nelle percentuali delle anomalie strutturali, si può però notare che i controlli non presentano mai marcatori soprannumerari che, invece, sono presenti con la stessa frequenza nei tre gruppi di transgenici. Gli emizigoti JNPL3 sembrano avere una maggiore percentuale di

derivativi rispetto agli altri tre gruppi. Infine, i controlli sembrano avere una minore tendenza alla rottura di entrambi i cromatidi (CSB) rispetto ai transgenici.



Esempi di metafasi con aberrazioni strutturali: una metafase con der(1;6)(A) e una con der(15;15)(B). Esempio di riarrangiamento coinvolgente il cromosoma 4 (C) e metafase con CSB (freccie viola) e CTB (freccia azzurra)(D).

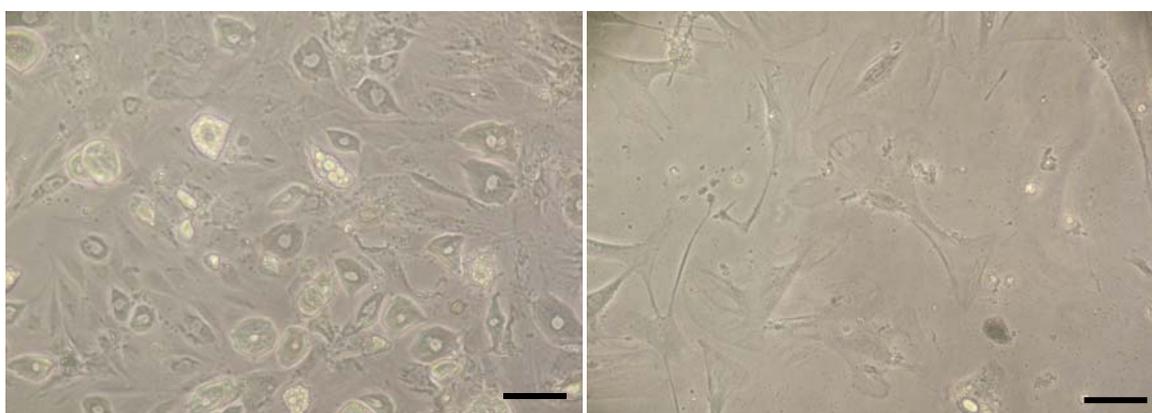
Di seguito sono riassunti tutti gli animali utilizzati per l'analisi degli splenociti suddivisi per età e sintomatologia:

ETÀ (mesi)	OMOZIGOTI JNPL3L			EMIZIGOTI JNPL3			CTRL	JN25
	Presint.	Interm.	A termine	Presint.	Interm.	A termine		
21						2		
17-18					4	3	2	
14-16		2	2	4		1	6	1
10-13	2	3	8	2	1		4	
7-9	3	2		2			1	
5-6	1				3		2	3
3-4							2	5
1-2	2	1						2
TOT.	8	8	10	8	8	6	17	11

1.3 FIBROBLASTI

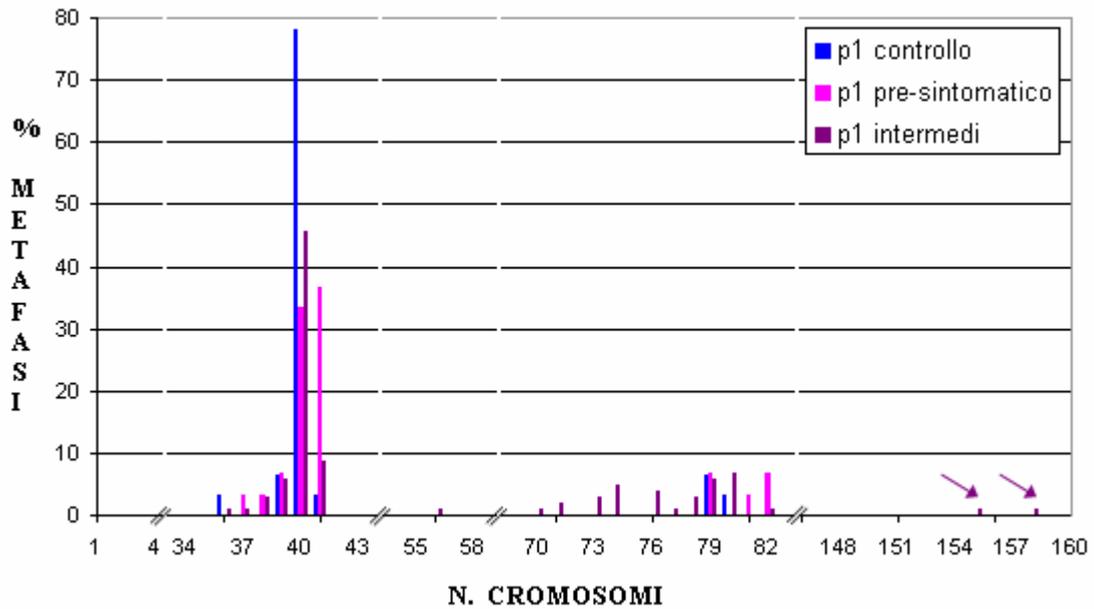
Colture primarie di fibroblasti murini sono state ottenute da circa un terzo delle biopsie cutanee messe in coltura (vedi tabella). Inoltre, i fibroblasti hanno mostrato molte difficoltà di crescita e hanno richiesto tempi molto lunghi per poter avere il numero necessario di cellule per un preparato cromosomico: in media più di un mese per ogni passaggio. Sono stati allestiti preparati a diversi passaggi di coltura, tuttavia non tutti hanno dato metafasi.

ANIMALI	NUMERO DI METAFASI				
	<i>p1</i>	<i>p2</i>	<i>p3</i>	<i>p4</i>	<i>p5</i>
Controllo ♀	32	-	-	-	-
Controllo ♀	fallimento di coltura				
Controllo ♂	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote pre-sintomatica ♀	30	-	-	26	-
JNPL3 omozigote pre-sintomatica ♀	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote pre-sintomatico ♂	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote pre-sintomatico ♂	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote intermedia ♀	55	20	-	-	-
JNPL3 omozigote intermedia ♀	48	-	-	-	-
JNPL3 omozigote intermedia ♀	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote a termine ♀	-	-	-	-	37
JNPL3 omozigote a termine ♂	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote a termine ♀	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote a termine ♂	fallimento di coltura				
JNPL3 omozigote a termine ♂	fallimento di coltura				

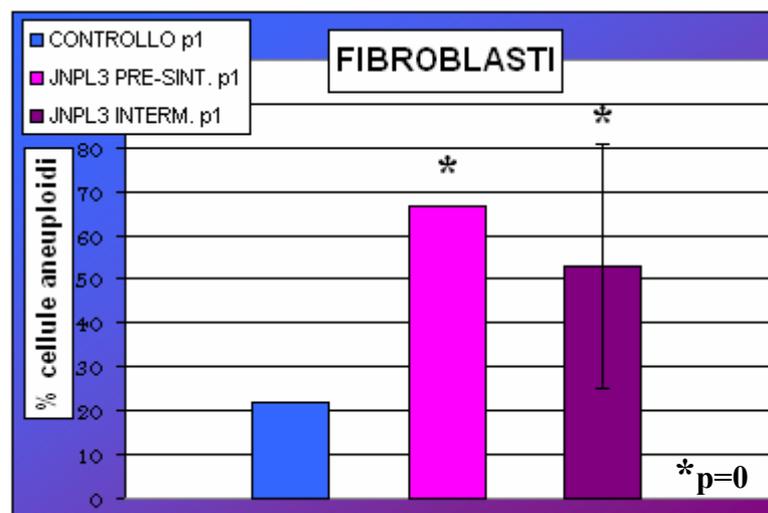


Esempi di aree di crescita di fibroblasti murini dalla stessa flask. Campione sintomatico intermedio al primo passaggio. Barra 5 μ m.

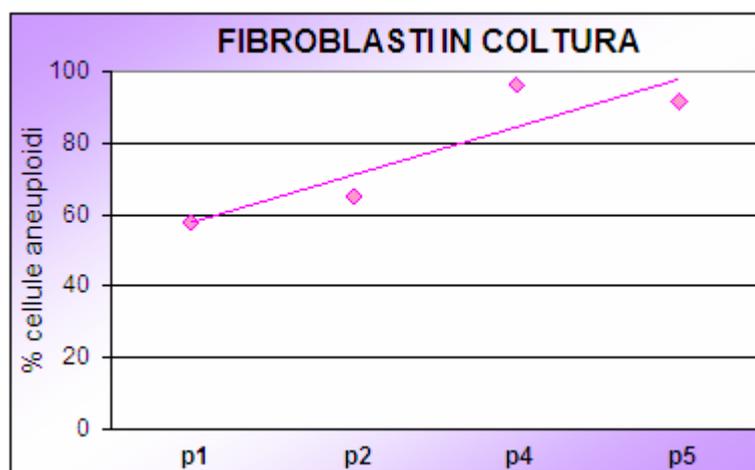
Per il primo passaggio è stato possibile fare un confronto tra una coltura controllo e colture di omozigoti JNPL3 pre-sintomatici ed intermedi.



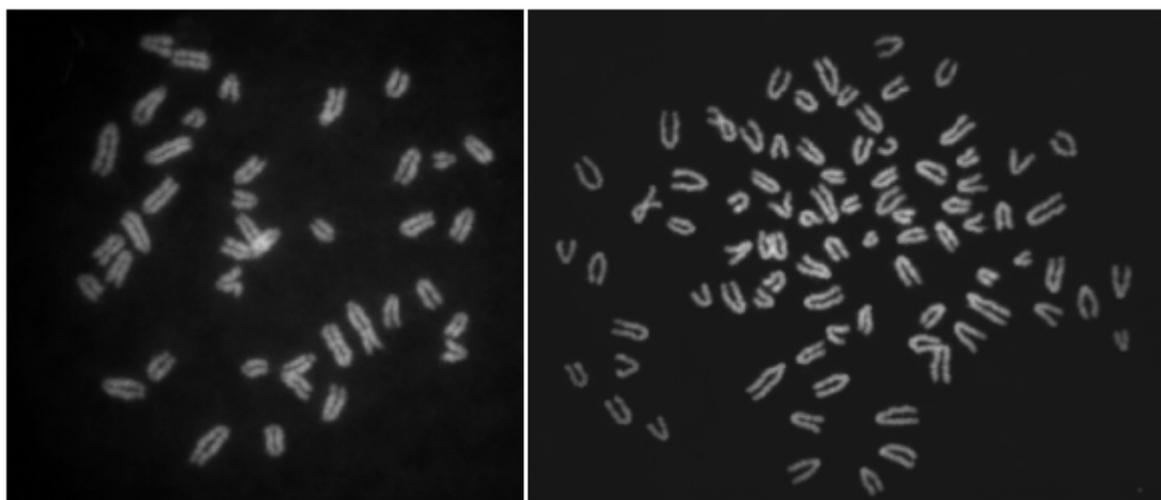
Si può notare la maggiore dispersione cromosomica dei transgenici rispetto al controllo, soprattutto nel caso degli intermedi, in cui sono presenti anche metafasi ipooctaploidi (155, 158 cromosomi). Nonostante la maggiore dispersione cromosomica degli intermedi, la percentuale di cellule aneuploidi è maggiore nel campione omozigote pre-sintomatico, in accordo con quanto riportato precedentemente per le milze. Per entrambi esiste una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo ($p=0$, chi-quadro).



Poiché gli omozigoti non hanno mostrato una differenza statisticamente significativa nel numero di aneuploidie del primo passaggio di coltura e dato lo scarso numero di passaggi in cui si sono ottenute metafasi, si è pensato di valutare l'andamento delle aneuploidie nel tempo senza suddividere gli omozigoti in base allo stadio della malattia.



Come è possibile osservare dal grafico è presente una tendenza all'incremento delle aneuploidie con l'aumentare dei passaggi in coltura. Questo incremento è dovuto principalmente alla presenza della componente di cellule quasi-tetraploidi (71-90 cromosomi) che aumenta in ogni passaggio.



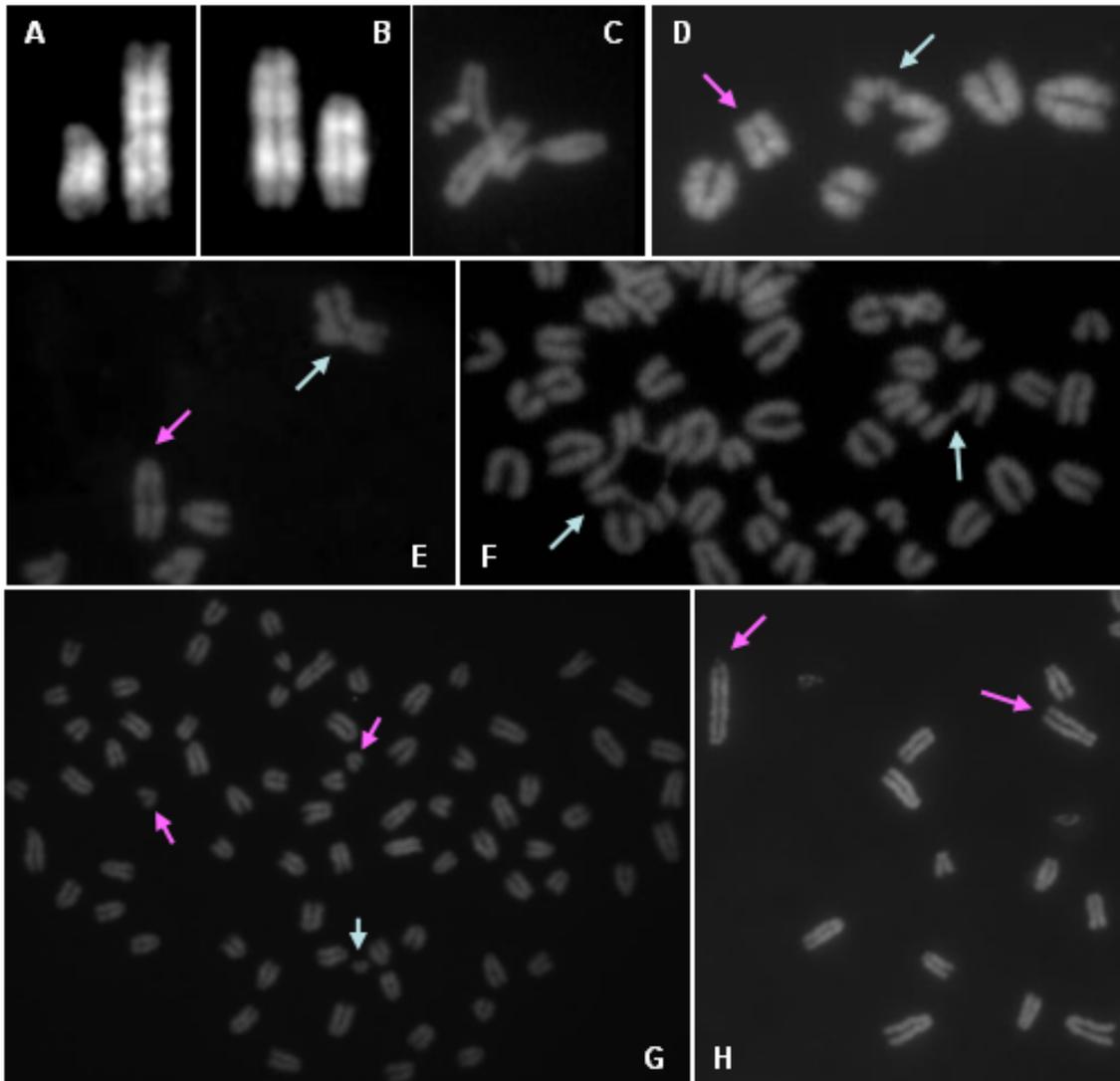
Metafase con il normale corredo cromosomico murino (sinistra) e metafase ipertetraploide (destra).

Sono inoltre presenti alcune anomalie strutturali riassunte in tabella. I valori indicano la percentuale calcolata sul totale delle metafasi di ogni campione.

ANIMALI	CTB	CSB	CTG	CSG	MAR	DER	PCS
Controllo	12.5	-	-	-	-	-	-
JNPL3 omozigote pre-sintomatica p1	-	-	-	-	-	-	16.7
JNPL3 omozigoti intermedi p1	9.7	2.9	1	-	4.8	-	1.9
JNPL3 omozigote intermedio p2	5	-	-	-	15	5	-
JNPL3 omozigote pre-sintomatica p4	3.8	-	-	-	-	3.8	-
JNPL3 omozigote a termine p5	10.8	2.7	-	-	-	13.5	2.7

LEGENDA: CTB, rottura di un cromatidio; CSB, rottura di entrambi i cromatidi; CTG, gap di un cromatidio; CSG, gap di entrambi i cromatidi; MAR, marcatore soprannumerario; DER, cromosoma derivativo da traslocazione; PCS, separazione prematura dei cromatidi.

Non sembrano essere presenti differenze significative nelle percentuali delle anomalie strutturali, si può però notare l'aumento della percentuale di derivativi (non presenti nei p1) nei passaggi più alti di coltura. La presenza di marcatori soprannumerari sembra una caratteristica esclusiva degli omozigoti intermedi. Sorprendentemente, le rotture di entrambi i cromatidi risultano più elevate nei controlli rispetto agli altri gruppi.



Esempi di aberrazioni presenti nei fibroblasti in coltura. Normale cromosoma 15 (sinistra) e isocromosoma 15 (destra)(A); derivativo del cromosoma 4 (sinistra) e normale cromosoma 4 (destra)(B); esempi di instabilità cromosomica (C, D, E, F frecce azzurre); PCS cromosoma 14 (D, freccia rosa); esempi di derivativi (E, H frecce rosa) e marcatore soprannumerario (G freccia azzurra, frecce rosa normali cromosomi 19).

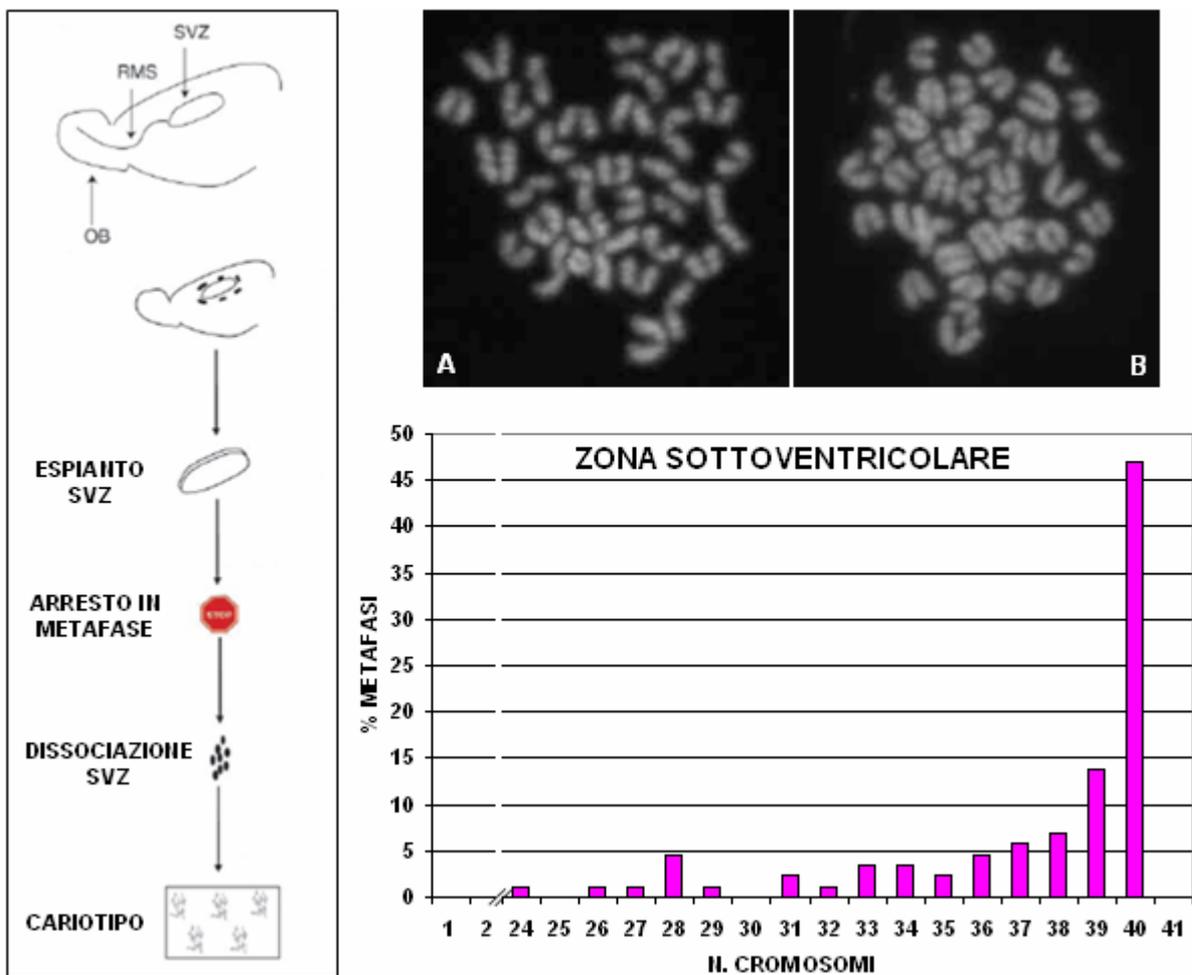
1.4 CELLULE STAMINALI NEURALI

1.4.1 ANALISI DIRETTA

Il vantaggio di utilizzare un modello animale per la demenza frontotemporale è la possibilità di analizzare il ruolo della proteina tau direttamente nel sistema nervoso centrale.

Si è deciso di valutare la frequenza delle aneuploidie nella zona sottoventricolare (SVZ), area del sistema nervoso centrale ricca di cellule staminali e precursori neurali, in topi di 5-10 giorni. Le SVZ sono state asportate chirurgicamente e messe intatte in coltura per circa 5 ore. Il tempo di coltura così breve ci ha permesso di valutare la situazione fisiologica delle cellule. Poiché la zona sottoventricolare in topi di 5-10 giorni è estremamente piccola (1-2 mm²), il numero di metafasi ottenibili da ogni animale è esiguo. Inoltre, la messa a punto di un protocollo che permettesse di ottenere metafasi valutabili e di buona qualità ha richiesto diverse prove.

È stato possibile ottenere 87 metafasi analizzabili da 31 topi omozigoti transgenici JNPL3 in media di 7 giorni.



Rappresentazione schematica della metodica utilizzata (sinistra, mod. da Kaushal et al., 2003). Esempio di metafase aneuploide (33 cromosomi, A) e di metafase diploide (B).

Istogramma del numero di cromosomi nelle metafasi analizzate.

Si nota una tendenza all'aneuploidia con una media del 53% di cellule aneuploidi per perdita di uno (13.8%) o più cromosomi (39.2%), al contrario non è mai presente l'acquisto. L'ottenimento di un numero così limitato di metafasi da un numero così elevato di animali ci ha portato ad abbandonare questo tipo di analisi e a sostituirla con la coltura di cellule staminali neurali.

Questi dati non possono quindi essere confrontati con dei controlli, tuttavia in letteratura esistono diversi studi che indicano il 33% come percentuale di cellule aneuploidi nelle SVZ embrionali e adulte di topi normali, a pari condizioni di coltura (Rehen et al., 2001, Kaushal et al., 2003). Considerando questo valore come quello di normalità, le SVZ degli omozigoti transgenici per la tau P301L mostrano una percentuale di aneuploidie che differisce in modo statisticamente significativo.

1.4.2 ANALISI DELLE NEUROSFERE

Sono stati raccolti ed analizzati preparati cromosomici ottenuti da cellule staminali neurali (NSC) a diversi passaggi di coltura. Le NSC sono state isolate all'Istituto Neurologico Besta ed ottenute da topi P301L omozigoti ed emizigoti e da topi controllo. Per gli emizigoti abbiamo avuto la possibilità di esaminare NSC isolate da topi di 7 e di 28 giorni, che sono state mantenute separate nell'analisi.

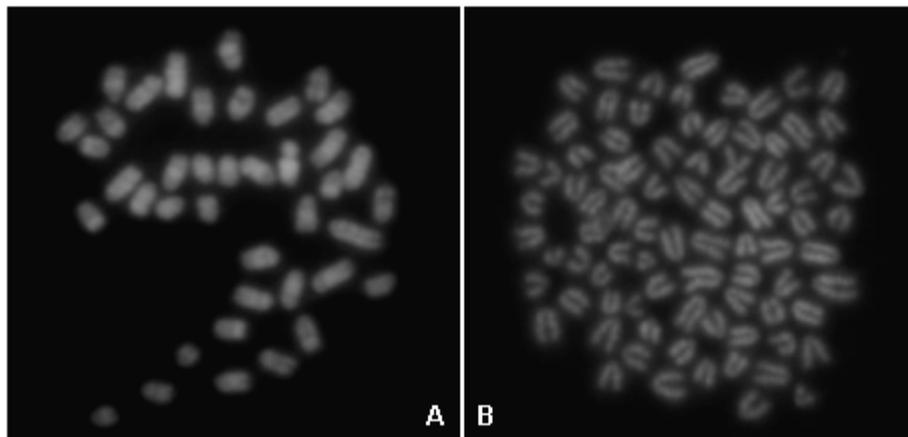
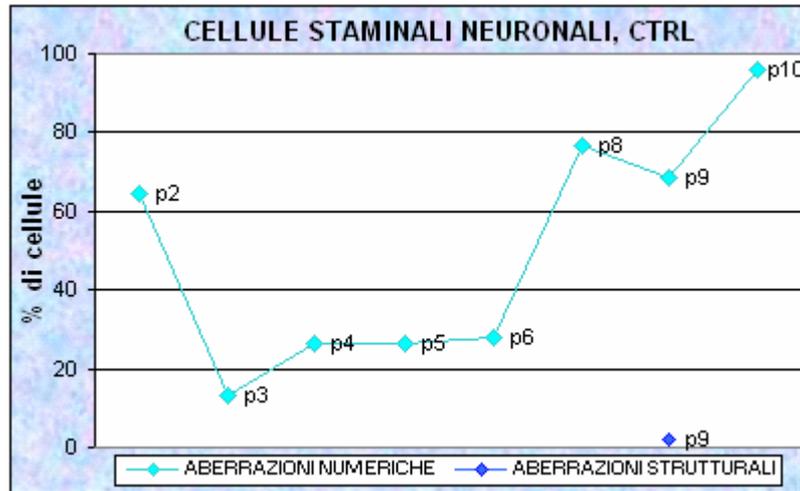
Le 933 metafasi ottenute a diversi passaggi di coltura hanno permesso di osservare le differenze nell'andamento delle aneuploidie nel tempo. Tutti i dati sono riportati nelle tabelle. È inoltre riportata la tabella per i livelli di ploidia, incluso il range del numero di cromosomi per ogni livello.

LIVELLO DI PLOIDIA	RANGE	LIVELLO DI PLOIDIA	RANGE
Quasi-aploide (20 ±)	≤ 30	Quasi-pentaploide (100 ±)	91-110
Ipoaploide (n-)	<20	Ipopentaploide (5n-)	91-99
Iperaploide (n+)	21-30	Iperpentaploide (5n+)	101-110
Quasi-diploide (40 ±)	31-50	Quasi-esaploide (120 ±)	111-130
Ipodiploide (2n-)	31-39	Ipoesaploide (6n-)	111-119
Iperdiploide (2n+)	41-50	Iperesaploide (6n+)	121-130
Quasi-triploide (60 ±)	51-70	Quasi-eptaploide (140 ±)	131-150
Ipotriploide (3n-)	51-59	Ipoeptaploide (7n-)	131-139
Ipertriploide (3n+)	61-70	Iperseptaploide (7n+)	141-150
Quasi-tetraploide (80 ±)	71-90	Quasi-octaploide (160 ±)	151-170
Ipotetraploide (4n-)	71-79	Ipoottaploide (8n-)	151-159
Ipertetraploide (4n+)	81-90	Iperottaploide (8n+)	161-170

Passaggi	n° di metafasi	% disomia	% metafasi aneuploidi		% metafasi con aberrazioni strutturali
			% perdite	% guadagni	
CONTROLLI					
p2	51	35.3	62.74 (n+,2n-)	1.96 (4n-)	0
p3	45	86.67	13.33 (n+,2n-)	0	0
p4	19	73.7	26.3 (2n-)	0	0
p5	42	73.8	23.8 (n+,2n-)	2.4 (2n+)	0
p6	50	72	24 (n+,2n-)	4 (2n+,3n-)	0
p8	73	23.3	48 (n+,2n-)	28.7 (2n+,3n±,4n-, 4n, 5n-)	0
p9	96	31.25	31.25 (n+,2n-)	37.5 (2n+,3n±, 4n±,5n-,7n±)	2
p10	24	4.17	4.17 (2n-)	91.7 (2n+,3n+,4n±)	0
EMIZIGOTI P301L 7 GIORNI					
p3	48	62.5	33.33 (n+,2n-)	4.17 (2n+,4n-)	4.17
p4	73	71.2	21.9 (2n-)	6.9 (2n+,4n)	5.5
p6	85	55.3	40 (n+,2n-)	4.7 (2n+,4n)	0
EMIZIGOTI P301L 28 GIORNI					
p2	91	33	65.9 (n+,2n-)	1.1 (2n+)	16.5
p8	121	17.4	27.2 (2n-)	55.4 (2n+,3n-,4n±)	23.1
p9	105	21.9	25.7 (2n-)	52.4 (2n+,3n±,4n±)	29.5
OMOZIGOTI P301L 7 GIORNI					
p2	10	0	50 (n±)	50 (2n+,3n+)	10

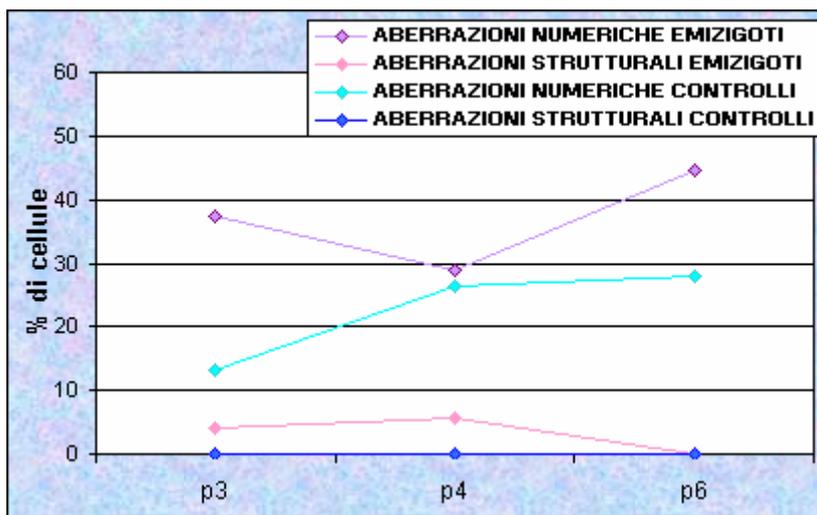
Per quanto riguarda i controlli si ha un iniziale picco di aneuploidia (p2) che diminuisce drasticamente nel passaggio successivo. Dal terzo passaggio si nota una diminuzione nel numero di cellule disomiche graduale fino al sesto passaggio. Il settimo passaggio non ha dato metafasi, nonostante le condizioni di allestimento siano state mantenute invariate rispetto ai passaggi precedenti. Nell'ottavo passaggio

si rileva un drastico aumento nel numero di metafasi aneuploidi, che continua fino al decimo passaggio soprattutto per la presenza di cellule iperdiploidi, quasi-triploidi e quasi-tetraploidi, probabilmente dovute all'aumento dei passaggi in coltura.

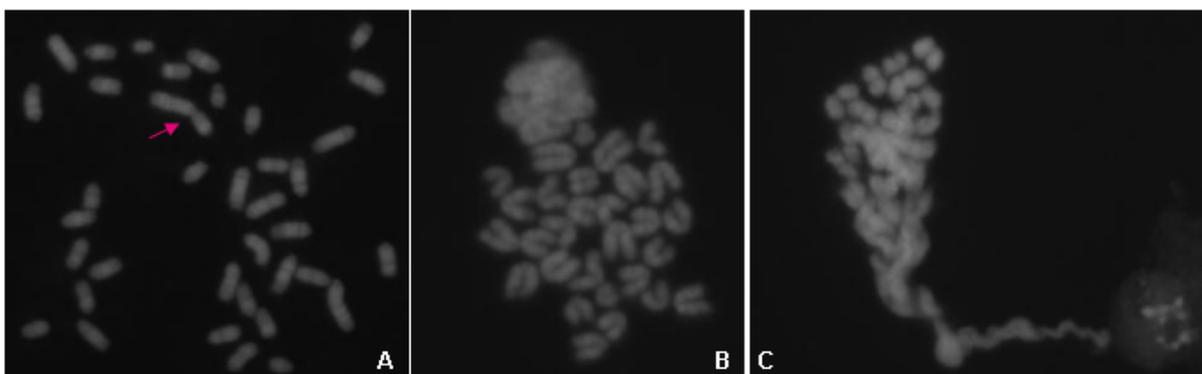


Metafase diploide (A) e metafase ipertetraploide (B).

Le cellule staminali neurali isolate dai topi transgenici emizigoti di 7 giorni mostrano un livello di aneuploidia più alto rispetto ai controlli sia nel p3 che nel p6, mentre si equipara nel p4 (28.8% rispetto al 26.2% dei controlli). La differenza sostanziale è la presenza di anomalie strutturali, che nei controlli compaiono solo nel nono passaggio.

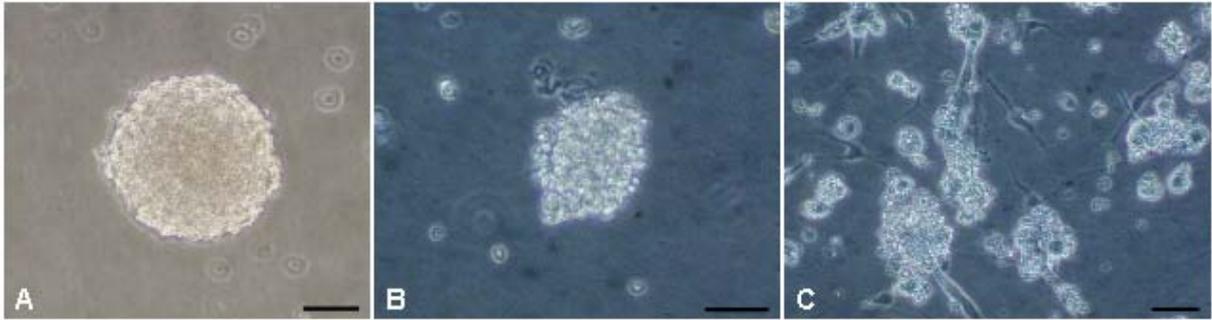


Inoltre, nel sesto passaggio si nota un'elevata quota di metafasi con cromosomi decondensati e di conseguenza non valutabili (vedi figura).



Metafase ipodiploide con der(1;16)(A) ed esempi di metafasi con cromosomi decondensati (B,C).

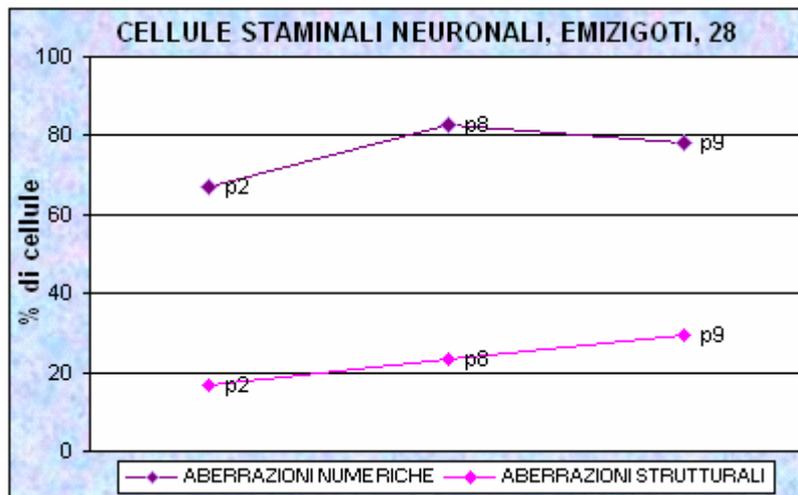
Dal settimo passaggio le cellule hanno modificato la loro morfologia, aumentato la tendenza ad aderire al fondo della flask ed i preparati allestiti al settimo e all'ottavo passaggio non hanno dato metafasi, nonostante siano stati provati tempi più lunghi di trattamento con Colcemid.

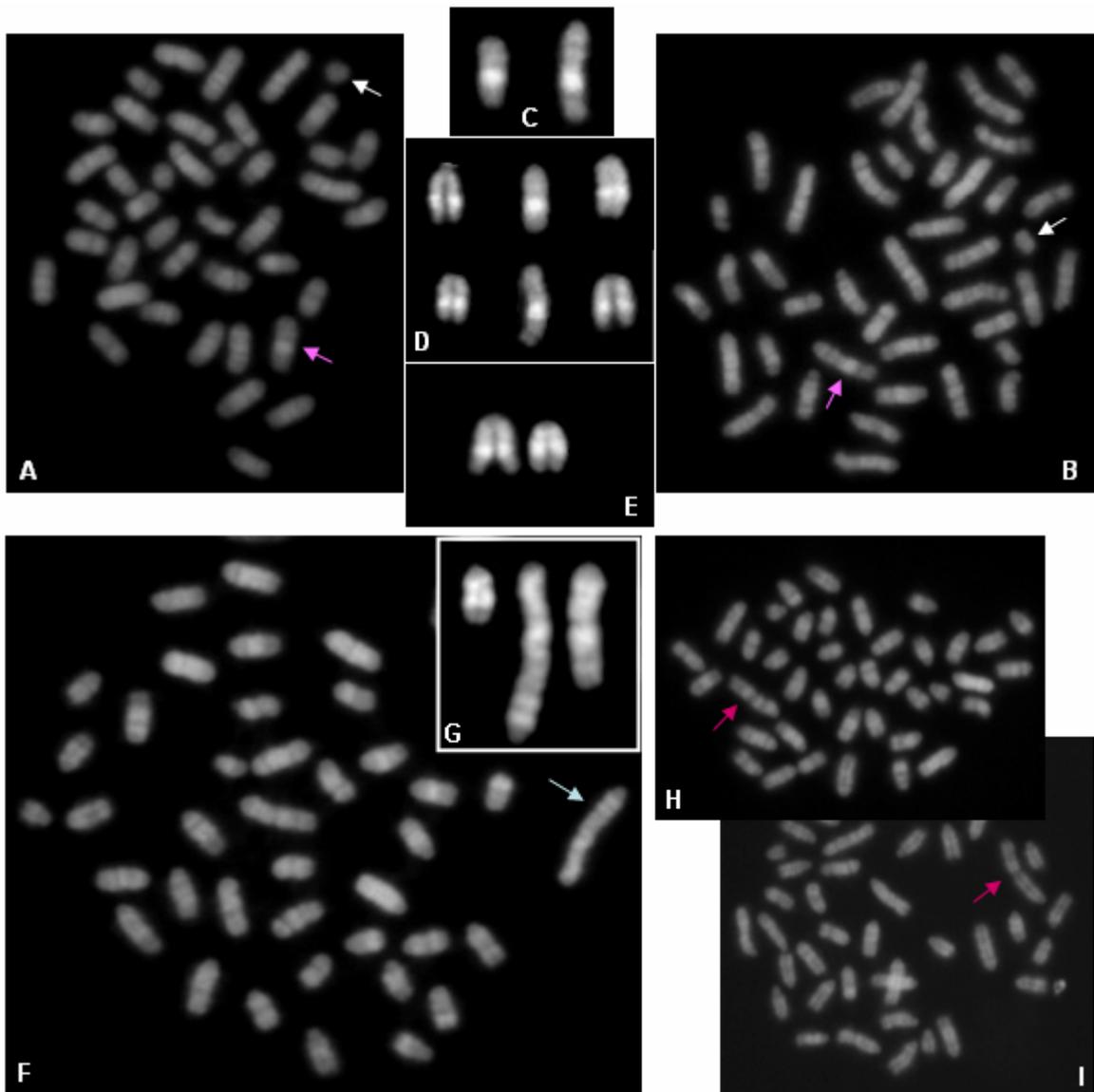


Neurosfera con normale morfologia (A) e neurosfere al settimo passaggio di coltura in sospensione (B) e adese (C). Barra 5 μ m.

Le cellule staminali neurali isolate dai topi emizigoti di 28 giorni hanno mostrato una percentuale di aneuploidie già molto alta nei primi passaggi (circa il 67% nel p2), fino ad arrivare a circa l'80% nei passaggi elevati (p8 e p9).

Molto alta è apparsa anche la percentuale di anomalie strutturali, il 15% nei primi passaggi e circa il 20% nei passaggi elevati. Molte di queste sono clonali, come ad esempio la presenza nel p2 di un derivativo der(9;12) e la presenza in alta percentuale nei passaggi elevati del der(9;11), di un derivativo coinvolgente il cromosoma 5 e di un marcatore soprannumerario.



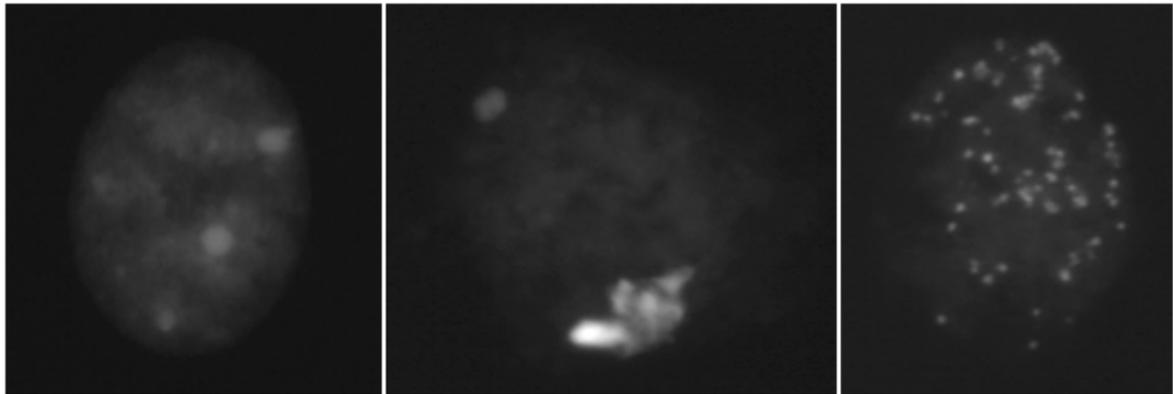


Metafasi (A,B) con $der(?) (?;5)$ (freccia rosa) e marcatore soprannumerario (freccia bianca).

Derivativo clonale coinvolgente il cromosoma 5 presente in diverse metafasi (C,D) e derivativo (sinistra) insieme al normale cromosoma 5 (destra)(E). Metafase con cromosoma $dic(1;15)$ (F) e cromosoma dicentrico insieme al normale cromosoma 1 (destra) e al normale cromosoma 15 (sinistra)(G). Metafasi con $der(9;11)$ clonale (H,I).

Le cellule staminali neurali isolate dagli omozigoti JNPL3 crescono molto più lentamente rispetto alle altre, richiedendo tempi di coltura più lunghi tra i diversi passaggi, inoltre sono visivamente di dimensioni inferiori. Per ora è stato possibile allestire un preparato solo al secondo passaggio e, nonostante il tempo di Colcemid sia stato prolungato fino a 48 ore per la scarsa velocità di crescita di questo tipo di cellule, si sono ottenute solo 10 metafasi.

Tutte le 10 metafasi sono aneuploidi (5 con perdita, 5 con guadagno) e una presenta un marcatore soprannumerario, tuttavia questi dati andranno integrati con preparati cromosomici su passaggi successivi. Un altro aspetto interessante è la presenza di numerose cellule con degenerazione cromatinica, non presenti negli altri preparati a pari condizioni di coltura ed ottenuti con lo stesso protocollo.



Esempi di degenerazione cromatinica.

Discussione

Tau è la principale proteina associata ai microtubuli e ne promuove l'assemblaggio e la stabilizzazione. In condizioni fisiologiche tau è localizzata principalmente negli assoni dei neuroni ed è critica nel processo di crescita neuronale ed integrità assonale. È presente anche in cellule non-neuronali come fibroblasti e linfociti. Tau è soggetta a numerose modificazioni post-traduzionali, tra cui la fosforilazione è la più studiata.

In condizioni patologiche (taupatie) tau diventa iperfosforilata, attraverso un aumento della fosforilazione in siti fisiologici, ma anche in addizionali siti patologici. La fosforilazione diminuisce il legame di tau ai microtubuli con conseguente distruzione del citoscheletro e formazione di strutture macroscopicamente visibili chiamate grovigli neurofibrillari.

Le taupatie di origine genetica sono causate da mutazioni dominanti nel gene MAPT, la più comune è la P301L, associata alla demenza frontotemporale. L'espressione di questa mutazione in un modello animale transgenico determina deficit motori e comportamentali dovuti allo sviluppo, dipendente dall'età e dalla dose, dei grovigli neurofibrillari. Gli animali, inoltre, mostrano gliosi, neuropatia periferica e atrofia muscolare. Il fenotipo dei topi riproduce le caratteristiche della patologia umana e fornisce un ottimo modello per lo studio della proteina.

È stata riportata in letteratura la localizzazione di tau nei nucleoli (Thurston et al., 1996) e nelle NORs dei cromosomi acrocentrici, suggerendo un suo possibile ruolo nell'organizzazione nucleolare e nell'eterocromatinizzazione dei geni dell'RNA ribosomiale (Sjoberg et al., 2006). Più recentemente è stato suggerito un possibile ruolo di tau nella stabilità cromosomica attraverso l'analisi di linfociti da sangue periferico e fibroblasti di pazienti affetti da demenza frontotemporale con mutazione P301L (Rossi et al., 2008). Questi pazienti hanno mostrato numerose aberrazioni cromosomiche, sia numeriche che strutturali, anomalie cromatiniche e difetti nel fuso mitotico.

Partendo da queste ipotesi, durante il dottorato di ricerca è stato studiato il possibile coinvolgimento della proteina tau nella segregazione cromosomica e nella stabilità cromatinica, utilizzando per la prima volta un approccio citogenetico in topi transgenici per la proteina tau umana mutata P301L.

Sono stati analizzati linfociti splenici, fibroblasti e cellule staminali neurali ottenute dalla zona sottoventricolare. Abbiamo avuto a disposizione quattro gruppi di animali,

forniti dalla Divisione di Neuropatologia dell'Istituto Neurologico "Carlo Besta": topi transgenici omozigoti per la proteina tau mutata P301L (JNPL3 -/-), emizigoti P301L (JNPL3 +/-), topi della stessa famiglia, ma senza transgene, come controlli e topi emizigoti transgenici per la proteina tau umana wild-type (JN25).

L'analisi degli splenociti ha permesso di ottenere un elevato numero di metafasi per ogni gruppo di animali, con un totale di circa 4000 metafasi esaminate, che ci permettono di aumentare notevolmente il potere statistico dello studio. La percentuale di cellule aneuploidi differisce in modo statisticamente significativo tra gli omozigoti JNPL3, gli emizigoti JNPL3 ed i controlli ($p=0$, t di Student).

Per valutare che le differenze non fossero causate dal solo inserimento del transgene, sono stati aggiunti all'analisi i topi transgenici per la tau umana wild-type, che hanno mostrato una percentuale di cellule aneuploidi paragonabile a quella dei controlli. Il livello di aneuploidia negli splenociti sembra, quindi, non essere determinato dal mero inserimento di un transgene, ma correlato con la presenza specifica del transgene mutato. Sembra inoltre esserci un effetto dose-dipendente, sottolineato dalla differenza statisticamente significativa di splenociti aneuploidi tra gli omozigoti e gli emizigoti per la tau P301L.

Non esistono in letteratura studi di questo genere su topi transgenici per la proteina tau umana, sono invece riportati dati su splenociti ottenuti da topi transgenici per la presenilina mutata e wild-type umana, in modelli per lo studio dell'Alzheimer familiare (Boeras et al., 2008). In questo caso viene riportata una differenza significativa nella percentuale di aneuploidie tra i topi transgenici per la presenilina wild-type e i transgenici per la presenilina mutata.

Gli autori ipotizzano quindi che mutazioni nel gene della presenilina possano contribuire all'insorgenza della patologia, non solo attraverso l'aumento della produzione del peptide β -amiloide, ma anche attraverso un'errata segregazione cromosomica. La presenza di anomalie del fuso mitotico, identificate come causa degli errori di segregazione, fa ipotizzare inoltre che la presenilina mutata possa interferire con la funzione dei microtubuli attraverso un effetto diretto sulle proteine associate ai microtubuli, come ad esempio tau.

Recentemente è stato pubblicato un nuovo studio di questo gruppo su topi transgenici per la proteina APP umana mutata, normalmente impiegati come modelli

animali per lo studio dell'Alzheimer familiare (Granic et al., 2010). Anche in questo caso gli splenociti dei topi transgenici per APP mostrano una percentuale più alta di cellule aneuploidi rispetto ai controlli, supportando l'ipotesi che l'aumentata produzione di A β possa interferire con il citoscheletro portando ad un'errata segregazione cromosomica. Inoltre l'analisi degli splenociti prelevati da topi knock-out per la tau murina e da controlli, dopo coltura con A β , ha mostrato che l'assenza di tau aumenta il livello di aneuploidie.

Questo, secondo gli autori, evidenzia che il meccanismo d'azione del peptide A β sui microtubuli richiede l'attivazione di GSK-3 β , chinasi principale di tau. A questo proposito è interessante osservare che anche cellule trasfettate con Pin-1, modulatore della fosforilazione di tau, mostrano un'errata segregazione cromosomica (Suizu et al., 2006).

Per valutare eventuali perdite o guadagni clonali di cromosomi preferenziali negli splenociti analizzati, si è deciso di ricostruirne il cariotipo. Questo è stato possibile per buona parte delle cellule, dipendentemente dalla buona qualità del bandeggio, poiché i cromosomi murini, a differenza di quelli umani, sono tutti acrocentrici. Non sembra tuttavia esserci nessun cromosoma perso o guadagnato in modo preferenziale. Non esistono in letteratura lavori sull'analisi di linfociti o splenociti murini che riportano dettagli sui singoli cromosomi, eccetto per il cromosoma 16, il più simile al 21 umano, il cui livello di aneuploidia (analizzato tramite FISH) risulta aumentato negli animali transgenici per la presenilina e per APP rispetto ai controlli, ma non viene confrontato con quello degli altri cromosomi (Boeras et al., 2008, Granic et al., 2010).

I nostri animali omozigoti ed emizigoti transgenici per la proteina mutata P301L sviluppano grovigli neurofibrillari e lesioni neuronali simili ai corpi di Pick nell'amigdala, nei neuroni settali, nell'ipotalamo, nei nuclei profondi del cervelletto e nel midollo spinale, che hanno come risultato deficit motori e comportamentali (Lewis et al., 2000). Il fenotipo patologico sopraggiunge a circa 6.5 mesi negli emizigoti e 4.5 mesi negli omozigoti, tuttavia esiste variabilità tra gli animali.

Per questo motivo tutti gli animali utilizzati sono stati suddivisi in base alla sintomatologia (pre-sintomatici, sintomatici intermedi e sintomatici a termine) dai veterinari dell'Istituto Besta. La suddivisione dei dati ottenuti dall'analisi delle milze

nelle tre classi di sintomatologia ha mostrato una tendenza alla diminuzione di aneuploidie con l'aumento della gravità dei sintomi negli omozigoti ed una tendenza contraria negli emizigoti. Sembra, quindi, che negli emizigoti la mutazione provochi un costante aumento nel livello di aneuploidie nonostante l'aggravamento dei sintomi, mentre negli omozigoti si assiste ad una sorta di diminuzione nei difetti di segregazione con l'aumentare della gravità della patologia. Da non trascurare anche l'effetto dell'età sulle aneuploidie, che mostra una tendenza opposta.

L'analisi dei fibroblasti è stata più complessa, sia per l'elevato numero di fallimenti di coltura, sia per le difficoltà di crescita, che hanno richiesto tempi molto lunghi per poter avere il numero necessario di cellule per un preparato cromosomico. I dati ottenuti al primo passaggio mostrano una differenza statisticamente significativa nel numero di aneuploidie tra i controlli e gli omozigoti JNPL3 ($p=0$, chi-quadro), con un livello di aneuploidia più elevato nei pre-sintomatici rispetto ai sintomatici intermedi, in accordo con la tendenza osservata negli splenociti.

L'analisi dei fibroblasti JNPL3 a diversi passaggi di coltura ha mostrato un incremento di cellule aneuploidi con l'aumentare dei passaggi, dovuto principalmente alla presenza della componente di cellule quasi-tetraploidi, e la comparsa di riarrangiamenti strutturali. Questi risultati tuttavia potrebbero essere dovuti all'effetto della coltura *in vitro*, e richiedono quindi di essere confrontati con i controlli. In letteratura non sono presenti studi citogenetici su fibroblasti murini adulti.

Il vantaggio fondamentale nell'utilizzo di un modello animale per questo tipo di patologia è la possibilità di studiare gli effetti della proteina direttamente nel sistema nervoso centrale, che ne è il target principale. Per questo sono state prelevate ed analizzate le zone sottoventricolari di topi omozigoti JNPL3 di 5-10 giorni. La zona sottoventricolare (SVZ) è una delle due aree neurogeniche del sistema nervoso centrale che rimane attiva per tutta la vita (Gage, 2002) tramite la proliferazione di un gruppo di cellule progenitrici neurali (NPC) (Alvarez-Buylla et al., 2002).

I nostri dati mostrano che, in condizioni fisiologiche, più della metà delle cellule neurali dei topi omozigoti JNPL3 è ipodiploide con perdita di uno (13.8%) o più cromosomi (39.2%), mentre non è mai presente l'acquisto. Poiché, a causa delle ridotte dimensioni delle SVZ, questa metodica ha richiesto l'utilizzo di un elevato

numero di animali, si è pensato di sostituirla con l'analisi delle cellule staminali neurali in coltura.

Tuttavia questi risultati possono essere confrontati con quelli riportati in letteratura. Neuroprogenitori aneuploidi sono stati descritti nella zona corticale ventricolare embrionale (Rehen et al., 2001), nella zona sottoventricolare adulta (Kaushal et al., 2003) e nel cervelletto in sviluppo (Westra et al., 2008) del normale sistema nervoso centrale murino. La percentuale di aneuploidia in queste regioni (20-33%) differisce in modo statisticamente significativo rispetto ai nostri dati (53%), facendo ipotizzare un possibile ruolo di tau nella segregazione cromosomica anche nelle cellule neurali.

È probabile che l'elevata percentuale di mosaicismi aneuploidi nei neuroprogenitori sia una caratteristica generale dello sviluppo e dell'organizzazione del sistema nervoso centrale (Westra et al., 2008). I neuroprogenitori che vanno incontro ad errata segregazione cromosomica potrebbero dare origine ad una popolazione fondatrice con assetto cromosomico variabile (Yang et al., 2003).

Cromosomi in ritardo anafasico e centrosomi soprannumerari sembrano essere la causa principale della generazione di cellule ipodiploidi, mentre la non disgiunzione produce cellule ipodiploidi e iperdiploidi in rapporto 1:1. L'unione di questi tre meccanismi spiegherebbe la preponderanza di cellule ipodiploidi tra le aneuploidie del sistema nervoso centrale (Yang et al., 2003).

Considerando la prevalenza di questi processi nello sviluppo del cervello è ipotizzabile che questi difetti di segregazione cromosomica rappresentino meccanismi biologicamente normali, associati alla proliferazione delle cellule neurali che danno come risultato popolazioni cellulari genomicamente diverse (Westra et al., 2008). Inoltre, il fatto che la percentuale di cellule aneuploidi differisca (20% nel cervelletto, 33% nella corteccia e nella zona sottoventricolare) suggerisce che possa esserci un diverso livello di mosaicismi nelle diverse regioni cerebrali. Una diversità cellulare generata attraverso la variazione cromosomica (Rehen et al., 2005).

L'analisi delle cellule staminali neurali isolate dalle SVZ e mantenute in coltura ha permesso di valutare il livello di aneuploidie nel tempo. I controlli mostrano un forte aumento di cellule aneuploidi solo negli alti passaggi, prodotto dall'elevato numero di cellule iperdiploidi, quasi-triploidi e quasi-tetraploidi, probabilmente indotte dalla prolungata coltura *in vitro*.

Per quanto riguarda le neurosfere degli emizigoti JNPL3 la possibilità di avere due diverse colture (ottenute da topi di 7 e 28 giorni) ha portato ad avere dati estremamente diversi. Le neurosfere dei topi P7 presentano un numero più elevato di aneuploidie rispetto ai controlli, con la presenza di una bassa percentuale di aberrazioni strutturali. Il cambiamento morfologico delle neurosfere (avvenuto al settimo passaggio) è coinciso con la presenza di difetti di condensazione dei cromosomi. Le neurosfere di topi P28 mostrano, invece, un elevatissimo numero di aberrazioni strutturali già nei primi passaggi di coltura, che aumenta con il tempo di coltura. Questo potrebbe essere causato dal maggiore effetto della proteina tau in topi più adulti.

Le neurosfere isolate dagli omozigoti JNPL3 mostrano una crescita molto più lenta rispetto alle altre, richiedendo tempi di coltura più lunghi tra i diversi passaggi. Questo è stato confermato dall'ottenimento di un numero esiguo di metafasi nonostante un tempo di Colcemid triplicato rispetto agli altri preparati. Un altro aspetto interessante è la presenza di numerose cellule con degenerazione cromatinica, non presenti negli altri preparati, che potrebbero spiegare le difficoltà di crescita di queste cellule.

In letteratura sono presenti studi sull'instabilità genetica delle neurosfere in coltura. Un recente lavoro ha mostrato la presenza di un guadagno costante del cromosoma 1 nei passaggi di coltura elevati di neurosfere isolate da embrioni murini (Vukicevic et al., 2010), allo stesso modo guadagni dei cromosomi 12 e 17 erano stati precedentemente osservati in cellule staminali embrionali umane (Draper et al., 2004). Questi guadagni sono stati considerati un adattamento alle condizioni di coltura che fornirebbe un vantaggio selettivo per queste varianti cellulari rispetto alle cellule diploidi (Baker et al., 2007). Le aneuploidie da noi riscontrate però comprendono sia perdite che guadagni e non sono comuni nei diversi gruppi di animali.

In conclusione, abbiamo analizzato splenociti, fibroblasti e cellule staminali neurali isolate da topi transgenici per la tau mutata P301L come modello per lo studio dell'interazione della proteina tau con la cromatina. I risultati preliminari mostrano un elevato numero di aberrazioni cromosomiche in accordo con quelle osservate nei pazienti (Rossi et al., 2008).

L'analisi degli splenociti ha mostrato una differenza significativa nella percentuale di cellule aneuploidi che sembra essere correlata con la presenza e la dose del transgene mutato. L'analisi dei fibroblasti ha mostrato un elevato numero di cellule aneuploidi che aumenta nei passaggi di coltura, ma questi risultati richiedono un ulteriore confronto con i controlli. Le cellule staminali neurali isolate dalla zona sottoventricolare, in condizioni fisiologiche, hanno mostrato una percentuale di cellule aneuploidi aumentata in modo statisticamente significativo rispetto a quella riportata in letteratura per questa regione nel normale sistema nervoso centrale murino. Le cellule staminali in coltura hanno mostrato caratteristiche cariotipiche, tempi di crescita e cambiamenti morfologici diversi nei tre gruppi di animali da cui sono state isolate ed anche all'interno dello stesso gruppo se isolate in età diverse. Questi dati suggeriscono che tau abbia, di fatto, un ruolo rilevante nella stabilità cromosomica.

Bibliografia

-
- **Abraha A**, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW et al. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113: 3737–3745, 2000.
 - **Akeson EC** and Davisson MT. Mitotic chromosome preparations from mouse cells for karyotyping. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 4:Unit4.10, 2001.
 - **Al-Bassam J**, Ozer RS, Safer D, Halpain S and Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* 157: 1187–1196, 2002.
 - **Aldini G**, Carini M, Beretta G, Bradamante S and Facino RM. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction? *Biochem Biophys Res Commun* 298: 699–706, 2002.
 - **Allen B**, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R et al. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 22: 9340–9351, 2002.
 - **Alonso AC**, Grundke-Iqbal I and Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2: 783–787, 1996.
 - **Alonso AC**, Grundke-Iqbal I, Barra HS and Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 298–303, 1997.
 - **Alonso AC**, Li B, Grundke-Iqbal I and Iqbal K. Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8864–8869, 2006.
 - **Alonso AC**, Zaidi T, Grundke-Iqbal I and Iqbal K. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5562–5566, 1994.
 - **Alonso AC**, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I and Iqbal K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired

-
- helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6923–6928, 2001.
- **Alvarez-Buylla A** and Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22: 629–34, 2002.
 - **Alzheimer A**. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr Psych Gerichtl Med* 64: 146–148, 1907.
 - **Amadoro G**, Serafino AL, Barbato C, Ciotti MT, Sacco A et al. Role of N-terminal tau domain integrity on the survival of cerebellar granule neurons. *Cell Death Differ* 11: 217–230, 2004.
 - **Anderton BH**, Betts J, Blackstock WP, Brion JP, Chapman S et al. Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation. *Biochem Soc Symp* 67: 73–80, 2001.
 - **Andorfer C**, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K et al. Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* 25: 5446–5454, 2005.
 - **Andreadis A**, Brown WM, and Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31: 10626–10633, 1992.
 - **Appelt DM** and Balin BJ. The association of tissue transglutaminase with human recombinant tau results in the formation of insoluble filamentous structures. *Brain Res* 745: 21–31, 1997.
 - **Arai T**, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 602–611, 2006.
 - **Arnold CS**, Johnson GV, Cole RN, Dong DLY, Lee M et al. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271: 28741–28744, 1996.
 - **Arrasate M**, Perez M, Valpuesta JM and Avila J. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol* 151: 1115–1122, 1997.

- **Arriagada PV**, Growdon JH, Hedley-Whyte ET and Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 631–639, 1992.
- **Atamna H**, Robinson C, Ingersoll R, Elliott H and Ames BN. *N-t*-Butyl hydroxylamine is an antioxidant that reverses age-related changes in mitochondria in vivo and in vitro. *FASEB J* 15: 2196–2204, 2001.
- **Auer IA**, Schmidt ML, Lee VMY, Curry B, Suzuki K et al. Paired helical filament tau (PHF-tau) in Niemann–Pick type C disease is similar to PHF-tau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 90: 547–551, 1995.
- **Avila J**, Lucas JJ, Perez M and Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84: 361–384, 2004.
- **Avila J**. Intracellular and extracellular tau. *Front Neurosci* 4: 49, 2010.
- **Baker DE**, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25: 207–215, 2007.
- **Baker M**, Litvan I, Houlden H, Adamson J, Dickson D et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 8: 711–715, 1999.
- **Baker M**, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442: 916–919, 2006.
- **Baki L**, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A et al. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J* 23: 2586 – 2596, 2004.
- **Bancher C**, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K et al. Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 477: 90–99, 1989.
- **Barghorn S** and Mandelkow E. Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 41: 14885–14896, 2002.

-
- **Benzing WC** and Mufson EJ. Apolipoprotein E immunoreactivity within neurofibrillary tangles: relationship to Tau and PHF in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 132: 162–171, 1995.
 - **Biernat J**, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM and Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11: 153–163, 1993.
 - **Boekhoorn K**, Terwel D, Biemans B, Borghgraef P, Wiegert O et al. Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy. *J Neurosci* 26: 3514–3523, 2006.
 - **Boeras DI**, Granic A, Padmanabhan J, Crespo NC, Rojiani AM et al. Alzheimer's presenilin 1 causes chromosome missegregation and aneuploid. *Neurobiol Aging* 29: 3119–3128, 2008.
 - **Braak E**, Braak H and Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol (Berl.)* 87: 554–567, 1994.
 - **Braak H** and Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239–259, 1991.
 - **Braak H** and Braak E. On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 68: 325–332, 1985.
 - **Brandt R**, Leger J and Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131: 1327–1340, 1995.
 - **Brion JP**, Hanger DP, Couck AM and Anderton BH. A68 proteins on tau proteins in Alzheimer's disease are composed of several tau isoforms in a phosphorylated state which affects their electrophoretic mobilities. *Biochem J* 279: 831–836, 1991.
 - **Brion S**, Plas J and Jeanneau A. Pick's disease. Anatomico-clinical point of view. *Rev Neurol* 147: 693–704, 1991.

-
- **Bu B**, Klunemann H, Suzuki K, Li J, Bird T et al. Niemann-pick disease type C yields possible clue for why cerebellar neurons do not form neurofibrillary tangles. *Neurobiol Dis* 11: 285–297, 2002.
 - **Buée L**, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A and Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 33: 95–130, 2000.
 - **Buée L**, Ding W, Delacourte A and Fillit H. Binding of secreted human neuroblastoma proteoglycans to the Alzheimer's amyloid A4 peptide. *Brain Res* 601: 154–163, 1993.
 - **Buée L**, Perez-Tur J, Leveugle B, Buée-Scherrer V, Mufson EJ et al. Apolipoprotein E in Guamanian amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism–dementia complex: genotype analysis and relationships to neuropathological changes. *Acta Neuropathol* 91: 247–253 1996.
 - **Buée-Scherrer V**, Buée L, Hof PR, Leveugle B, Gilles C et al. Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis /parkinsonism–dementia complex of Guam. Immunochemical characterization of tau proteins. *Am J Pathol* 146: 924–932, 1995.
 - **Buée-Scherrer V**, Buée L, Leveugle B, Perl DP, Vermersch P et al. Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 42: 356–359, 1997.
 - **Buée-Scherrer V**, Hof PR, Buée L, Leveugle B, Vermersch P et al. Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 91: 351–359, 1996.
 - **Bugiani O**, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G et al. Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 667–677, 1999.
 - **Busciglio J**, Lorenzo A, Yeh J and Yankner BA. Beta-Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879–888, 1995.
 - **Caceres A** and Kosik KS. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343: 461–463, 1990.

- **Carmel G**, Mager EM, Binder LI and Kuret J. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 271: 32789–32795, 1996.
- **Cash AD**, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H et al. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol* 162: 1623–1627, 2003.
- **Chen J**, Kanai Y, Cowan NJ and Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674–677, 1992.
- **Chen JS** and Mehta K. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 817–836, 1999.
- **Chirita CN**, Necula M and Kuret J. Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J Biol Chem* 278: 25644–25650, 2003.
- **Clavaguera F**, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11: 909–913, 2009.
- **Coleman PD** and Yao PJ. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24: 1023–1027, 2003.
- **Collot M**, Louvard D and Singer SJ. Lysosomes are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 788–792, 1984.
- **Conrad C**, Vianna C, Freeman M, and Davies P. A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7751–7756, 2002.
- **Constantinidis J**, Richard J and Tissot R. Pick's disease. Histological and clinical correlations. *Eur Neurol* 11: 208–217, 1974.
- **Cripps D**, Thomas S, Jeng Y, Yang F, Davies P et al. Alzheimer disease specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 281: 10825–10838, 2006.

-
- **Cross DC**, Muñoz JP, Hernández P and Maccioni RB. Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem* 78: 305–17, 2000.
 - **Crowther RA**, Olesen OF, Jakes R and Goedert M. The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 309: 199–202, 1992.
 - **D'Souza I** and Schellenberg GD. Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim Biophys Acta* 1739: 104–115, 2005.
 - **D'Souza I** and Schellenberg GD. Tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J Biol Chem* 277: 26587–26599, 2002.
 - **D'Souza I**, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM et al. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5598–5603, 1999.
 - **David DC**, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M et al. Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem* 83: 176–185, 2002.
 - **Davis DR**, Anderton BH, Brion JP, Reynolds CH and Hanger DP. Oxidative stress induces dephosphorylation of tau in rat brain primary neuronal cultures. *J Neurochem* 68: 1590–1597, 1997.
 - **Dawson HN**, Cantillana V, Chen L and Vitek MP. The tau N279K exon 10 splicing mutation recapitulates frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 tauopathy in a mouse model. *J Neurosci* 27: 9155–9168, 2007.
 - **Delacourte A**, Robitaille Y, Sergeant N, Buée L, Hof PR et al. Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 159–168, 1996.
 - **Delacourte A**, Sergeant N, Wattez A, Gauvreau D and Robitaille Y. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation. *Ann Neurol* 43: 193–204, 1998.

-
- **DeTure MA**, Di Noto L and Purich DL. In vitro assembly of Alzheimer-like filaments. How a small cluster of charged residues in Tau and MAP2 controls filament morphology. *J Biol Chem* 277: 34755–34759, 2002
 - **Donnelly MP**, Paschou P, Grigorenko E, Gurwitz D, Mehdi SQ et al. The distribution and most recent common ancestor of the 17q21 inversion in humans. *Am J Hum Genet.* 86(2): 161-71, 2010.
 - **Dotti CG**, Banker GA and Binder LI. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23: 121–130, 1987.
 - **Draper JS**, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22: 53–54, 2004.
 - **Ebneth A**, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B and Mandelkow E. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer’s disease. *J Cell Biol* 143: 777–794, 1998.
 - **Ekinci FJ** and Shea TB. Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol* 20: 497–508, 2000.
 - **Eldar-Finkelman H**. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8: 126–132, 2002.
 - **Engel T**, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J et al. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 27: 1258–1268, 2006.
 - **Eppig JT**, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE, Blake JA et al. The Mouse Genome Database (MGD): from genes to mice—a community resource for mouse biology. *Nucleic Acids Res* 33(Database issue):D471-5, 2005.
 - **Fath T**, Eidenmuller J and Brandt R. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer’s disease. *J Neurosci* 22: 9733–9741, 2002.

-
- **Feinstein SC** and Wilson L. Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta* 1739: 268–279, 2005.
 - **Fellous A**, Francon J, Lennon AM and Nunez J. Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur J Biochem* 78: 167–174, 1977.
 - **Ferrer I**, Blanco R, Carmona M and Puig B. Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *J Neural Transm* 108: 1397–1415, 2001.
 - **Flament S**, Delacourte A, Verny M, Hauw JJ and Javoy-Agid F. Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol* 81: 591–596, 1991.
 - **Forman MS**, Lal D, Zhang B, Dabir DV, Swanson E et al. Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J Neurosci* 25: 3539–3550, 2005.
 - **Forno LS**. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 259–272, 1996.
 - **Frost B**, Jacks RL and Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284: 12845–12852, 2009.
 - **Gage FH**. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22:612–613, 2002.
 - **García de Ancos J**, Correas I and Avila J. Differences in microtubule binding and self-association abilities of bovine brain tau isoforms. *J Biol Chem* 268: 7976–7982, 1993.
 - **Garruto RM**. Pacific paradigms of environmentally-induced neurological disorders: clinical, epidemiological and molecular perspectives. *Neurotoxicology* 12: 347–377, 1991.
 - **Giasson BI**, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL et al. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 300: 636–640, 2003.

-
- **Ginsberg SD**, Crino PB, Lee VMY, Eberwine JH and Trojanowski JQ. Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques. *Ann Neurol* 41: 200–209 1997.
 - **Glatz DC**, Rujescu D, Tang Y, Berendt FJ, Hartmann AM et al. The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96: 635 – 644, 2006.
 - **Goedert M** and Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 9: 4225–4230, 1990.
 - **Goedert M** and Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739: 240– 250, 2005.
 - **Goedert M**, Jakes R and Crowther RA. Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett* 450: 306–311, 1999.
 - **Goedert M**, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ et al. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosamino-glycans. *Nature* 383: 550–553, 1996.
 - **Goedert M**, Satumtira S, Jakes R, Smith MJ, Kamibayashi C et al. Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *J Neurochem* 75: 2155–2162, 2000.
 - **Goedert M**, Spillantini MG and Crowther RA. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1983–1987, 1992.
 - **Goedert M**, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D and Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3: 519–526, 1989b.
 - **Goedert M**, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J and Crowther RA. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated

- protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8: 393–399, 1989a.
- **Goedert M.** Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1101–1118, 1999.
 - **Goedert M.** Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 15: 45–49, 2004.
 - **Goldbaum O, Oppermann M, Handschuh M, Dabir D, Zhang B et al.** Proteasome inhibition stabilizes Tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid. *J Neurosci* 23: 8872–8880, 2003.
 - **Goldberg DJ and Wu DY.** Tyrosine phosphorylation and protrusive structures of the growth cone. *Perspect Dev Neurobiol* 4: 183–192, 1996.
 - **Gomez-Ramos A, Diaz-Nido J, Smith MA, Perry G and Avila J.** Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J Neurosci Res* 71: 863–870, 2003.
 - **Gomez-Ramos A, Smith MA, Perry G and Avila J.** Tau phosphorylation and assembly. *Acta Neurobiol Exp* 64: 33–39, 2004.
 - **Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I and Iqbal K.** Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61: 921–927, 1993.
 - **Goode BL and Feinstein SC.** Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124: 769–782, 1994.
 - **Gordon-Krajcer W, Yang L and Ksiezak-Reding H.** Conformation of paired helical filaments blocks dephosphorylation of epitopes shared with fetal tau except Ser199/202 and Ser202/Thr205. *Brain Res* 856: 163–175, 2000.
 - **Götz J and Götz NN.** Animal models for Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia: a perspective. *ASN Neuro* 1 pii: e00019 doi: 0.1042/AN20090042, 2009
 - **Götz J and Ittner LM** Animal models of Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9: 532–544, 2008.

- **Götz J**, Chen F, Barmettler R and Nitsch RM. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L Tau. *J Biol Chem* 276: 529–534, 2001.
- **Götz J**, Gladbach A, Pennanen L, van Eersel J, Schild A et al. Animal models reveal role for tau phosphorylation in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1802: 860–871, 2010.
- **Gotz J**, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R et al. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 14: 1304–1313, 1995.
- **Goux WJ**, Rodriguez S and Sparkman DR. Characterization of the glycolipid associated with Alzheimer paired helical filaments. *J Neurochem* 67: 723–733, 1996.
- **Granic A**, Padmanabhan J, Norden M and Potter H. Alzheimer A β peptide induces chromosome mis-segregation and aneuploidy, including trisomy 21: requirement for tau and APP. *Mol Biol Cell* 21: 511–520, 2010.
- **Green MC** et al. Standard Karyotype of the Mouse, *Mus musculus*. Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. 1971.
- **Grover A**, England E, Baker M, Sahara N, Adamson J et al. A novel tau mutation in exon 9 (1260V) causes a four-repeat tauopathy. *Exp Neurol* 184: 131–140, 2003.
- **Hall GF**, Lee VM, Lee G and Yao J. Staging of neurofibrillary degeneration caused by human tau overexpression in a unique cellular model of human tauopathy. *Am J Pathol* 158: 235–246, 2001.
- **Hall GF**, Yao J and Lee G. Human tau becomes phosphorylated and forms filamentous deposits when overexpressed in lamprey central neurons in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4733–4738, 1997.
- **Harada A**, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S et al. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369: 488–491, 1994.
- **Hardy JA** and Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184–185, 1992.

- **Hasegawa M**, Smith MJ and Goedert M. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 437: 207–210, 1998.
- **Hauw JJ**, Verny M, Delaere P, Cervera P, He Y et al. Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neurosci Lett* 119: 182-186, 1990.
- **Hayashi S**, Toyoshima Y, Hasegawa M, Umeda Y and Wakabayashi K. Late-onset frontotemporal dementia with a novel exon 1 (Arg5His) tau gene mutation. *Ann Neurol* 51: 525–530, 2002.
- **Healy DG**, Abou-Sleiman PM, Lees AJ, Casas JP, Quinn N et al. Tau gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 962–965, 2004.
- **Hensley K**, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA et al. p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 72: 2053-2058, 1999.
- **Hernandez F** and Avila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64(17): 2219-33, 2007.
- **Hernandez F**, Borrell J, Guaza C, Avila J and Lucas JJ. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally overexpress GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83: 1529–1533, 2002.
- **Hershko A** and Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425–479, 1998.
- **Higuchi M**, Zhang B, Forman MS, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ et al. Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *J Neurosci* 25: 9434–9443, 2005.
- **Hirano A**, Dembitzer HM, Kurland LT and Zimmerman HM. The fine structure of some intraganglionic alterations. Neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and 'rod-like' structures as seen in Guam amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism–dementia complex. *J Neuropathol Exp Neurol* 27: 167–182, 1968.

-
- **Hirano A**, Kurland LT, Kuroth RS and Lessell S. Parkinsonism–dementia complex, an endemic disease on the island of Guam I. Clinical features. *Brain* 84: 642–661, 1961.
 - **Hirano A**, Malamud N, Elizan TS and Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism–dementia complex on Guam. Further pathologic studies. *Arch Neurol* 15: 35–51, 1966.
 - **Hirokawa N**, Shiomura Y and Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107: 1449–1459, 1988.
 - **Hodges JR**, Davies RR, Xuereb JH, Casey B, Broe M et al. Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 56: 399–406, 2004.
 - **Hoernicka J**, Perez M, PerezTur J, Barabash A, Godoy M et al. The tau gene A0 allele and progressive supranuclear palsy. *Neurology* 53: 1219–1225, 1999.
 - **Hof PR**, Bouras C and Morrison JH. Cortical neuropathology in aging and dementing disorders: neuronal typology, connectivity, and selective vulnerability, in: A. Peters, J.H. Morrison (Eds.), *Cerebral Cortex*, Vol. 14, Kluwer Academic Plenum, New York, 1999, pp. 175–312.
 - **Hof PR**, Bouras C, Perl DP, Sparks DL, Mehta N et al. Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down’s syndrome. Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer’s disease. *Arch Neurol* 52: 379–391, 1995.
 - **Hof PR**, Charpiot A, Delacourte A, Buée L, Purohit D et al. Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci Lett* 139: 10–14, 1992.
 - **Hogg M**, Grujic ZM, Baker M, Demirci S, Guillozet AL et al. The L266V tau mutation is associated with frontotemporal dementia and Pick-like 3R and 4R tauopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 106: 323–336, 2003.
 - **Holzer M**, Holzapfel HP, Zedlick D, Bruckner MK and Arendt T. Abnormally phosphorylated tau protein in Alzheimer’s disease: heterogeneity of individual regional distribution and relationship to clinical severity. *Neuroscience* 63: 499–516, 1994.

-
- **Houlden H**, Baker M, Morris HR, MacDonald N, Pickering-Brown S et al. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 56: 1702–1706, 2001.
 - **Hua Q** and He RQ. Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett* 9: 249–357, 2002.
 - **Hua Q**, He RQ, Haque N, Qu MH, del Carmen Alonso A et al. Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci* 60: 413–421, 2003.
 - **Hutton M**, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393: 702–705, 1998.
 - **Hwang SC**, Jhon DY, Bae YS, Kim JH and Rhee SG. Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 271: 18342–18349, 1996.
 - **Hyman BT** and Gomez-Isla T. Alzheimer's disease is a laminar, regional, and neural system specific disease, not a global brain disease. *Neurobiol Aging* 15: 353–354, 379–380, 1994.
 - **Hyman BT** and Trojanowski JQ. Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 1095–1097, 1997.
 - **Ignelzi Jr MA**, Miller DR, Soriano P and Maness PF. Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12: 873–884, 1994.
 - **Ihara Y**, Nukina N, Miura R and Ogawara M. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* 99: 1807–1810, 1986.
 - **Ishihara T**, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK et al. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24: 751–762, 1999.

- **Jackson GR**, Wiedau-Pazos M, Sang TK, Wagle N, Brown CA et al. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34: 509–519, 2002.
- **Jicha GA**, Rockwood JM, Berenfeld B, Hutton M and Davies P. Altered conformation of recombinant frontotemporal dementia-17 mutant tau proteins. *Neurosci Lett* 260: 153–156, 1999.
- **Jope RS** and Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29: 95–102, 2004.
- **Kampers T**, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM and Mandelkow E. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 399: 344–349, 1996.
- **Kanda R**, Shang Y, Tsuji S, Eguchi-Kasai K and Hayata I. An improved culture system of mouse peripheral blood lymphocytes for analysis of radiation-induced chromosome aberrations. *Biosci Rep* 24: 641–50, 2004.
- **Kar S**, Fan J, Smith MJ, Goedert M and Amos LA. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 22: 70–77, 2003.
- **Kaushal D**, Contos JJA, Treuner K, Yang AH, Kingsbury MA et al. Alteration of gene expression by chromosome loss in the postnatal mouse brain. *J Neurosci* 23:5599–5606, 2003.
- **Keck S**, Nitsch R, Grune T and Ullrich O. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85: 115–122, 2003.
- **Keller JN**, Hanni KB and Markesbery WR. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 75: 436–439, 2000.
- **Kertesz A**, Kawarai T, Rogaeva E, St George-Hyslop PH, Poorkaj P et al. Familial frontotemporal dementia with ubiquitinpositive, tau-negative inclusions. *Neurology* 54: 818–827, 2000.
- **Khlistunova I**, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M et al. Inducible expression of tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* 281: 1205–1214, 2006.

-
- **Kidd M.** Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197: 192–193, 1963.
 - **Kins S,** Cramer A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM et al. Reduced PP2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 276: 38193–38200, 2001.
 - **Knops J,** Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L et al. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol* 114: 725–733, 1991.
 - **Ko LW,** Ko EC, Nacharaju P, Liu WK, Chang E et al. An immunochemical study on tau glycation in paired helical filaments. *Brain Res* 830 301–313, 1999.
 - **Kraemer BC,** Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ et al. From the Cover: Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9980–9985, 2003.
 - **Kwok JB,** Teber ET, Loy C, Hallupp M, Nicholson G et al. Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55: 329–334, 2004.
 - **Lassmann H,** Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M et al. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol (Berl.)* 89: 35–41, 1995.
 - **Le Corre S,** Klafki HW, Plesnila N, Hubinger G, Obermeier A et al. An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9673–9678, 2006.
 - **Ledesma MD,** Bonay P and Avila J. Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J Neurochem* 65: 1658–1664, 1995.
 - **Lee G,** Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K et al. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24: 2304–2312, 2004.
 - **Lee VMY,** Goedert M and Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24: 1121–1159, 2001.

-
- **Lewis J**, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P et al. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genet* 25: 402–405, 2000.
 - **Li HL**, Wang HH, Liu SJ, Deng YQ, Zhang YJ et al. Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing beta-catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3591–3596, 2007.
 - **Li L**, Sengupta A, Haque N, Grundke-Iqbal I and Iqbal K. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Lett* 566: 261–269, 2004.
 - **Lippa CF**, Zhukareva V, Kawarai T, Uryu K, Shafiq M et al. Frontotemporal dementia with novel tau pathology and a Glu342Val tau mutation. *Ann Neurol* 48: 850–858, 2000.
 - **Litersky JM** and Johnson GV. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267: 1563–1568, 1992.
 - **Litvan I**. The clinical and pathologic hallmarks of progressive supranuclear palsy. *Curr Opin Neurol* 10: 346–350, 1997.
 - **Love S**, Bridges LR and Case CP. Neurofibrillary tangles in Niemann–Pick disease type C. *Brain* 118: 119–129, 1995.
 - **Lu PJ**, Wulf G, Zhou XZ, Davies P and Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399: 784–788, 1999.
 - **Lucas JJ**, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R et al. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 20: 27–39, 2001.
 - **Mackenzie IRA**, Shi J, Shaw CL, DuPlessis D, Neary D et al. Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta Neuropathol* 112:551–559, 2006.
 - **Mailliot C**, Sergeant N, Bussière T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A et al. Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett* 433: 201–204, 1998.

-
- **Mandell JW** and Banker GA. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16: 5727–5740, 1996.
 - **Mattson MP**, Fu WM, Waeg G and Uchida K. 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Neuroreport* 8: 2275–2281, 1997.
 - **Miller ML** and Johnson GV. Transglutaminase cross-linking of the tau protein. *J Neurochem* 65: 1760–1770, 1995.
 - **Mitchison T** and Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1: 761–772, 1988.
 - **Miyamoto K**, Kowalska A, Hasegawa M, Tabira T, Takahashi K et al. Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10+11-splice site in the tau gene. *Ann Neurol* 50: 117–120, 2001.
 - **Montejo de Garcini E**, Serrano L and Avila J. Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun* 141: 790–796, 1986.
 - **Mori H**, Kondo J and Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235: 1641–1644, 1987.
 - **Morishima-Kawashima M**, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K et al. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10: 1151–1160, 1993.
 - **Morishima-Kawashima M**, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H et al. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270(2):823-9, 1995.
 - **Morris HR**, Osaki Y, Holton J, Lees AJ, Wood NW et al. Tau exon 10+16 mutation FTDP-17 presenting clinically as sporadic young onset PSP, *Neurology* 61: 102–104, 2003.
 - **Morsch R**, Simon W and Coleman PD. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 188–197, 1999.
 - **Mulot SF**, Hughes K, Woodgett JR, Anderton BH and Hanger DP. PHF-tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS-PAGE which can be

- mimicked by in vitro phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3 beta. *FEBS Lett Neurochem* 349: 359–364, 1994.
- **Muyllaert D**, Terwel D, Borghgraef P, Devijver H, Dewachter I et al. Transgenic mouse models for Alzheimer's disease: the role of GSK-3B in combined amyloid and tau-pathology. *Rev Neurol* 162: 903–907, 2006.
 - **Myers AJ**, Kaleem M, Marlowe L, Pittman AM, Lees AJ et al. The H1c haplotype at the MAPT locus is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 14(16): 2399–404, 2005.
 - **Nangaku M**, Sato-Yoshitake R, Okada Y, Noda Y, Takemura R et al. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79: 1209–1220, 1994.
 - **Neary D**, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51: 1546–1554, 1998.
 - **Neve RL**, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM and Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387: 271–280, 1986.
 - **Novak M**. Truncated tau protein as a new marker for Alzheimer's disease. *Acta Virol* 38: 173–189, 1994.
 - **Nunomura A**, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 759–767, 2001.
 - **Nunomura A**, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K et al. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19: 1959–1964, 1999.
 - **Odetti P**, Garibaldi S, Norese R, Angelini G, Marinelli L et al. Lipoperoxidation is selectively involved in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 393–397, 2000.
 - **Ohkubo N**, Lee YD, Morishima A, Terashima T, Kikkawa S et al. Apolipoprotein E and Reelin ligands modulate tau phosphorylation through an apolipoprotein

- E receptor/disabled-1/glycogen synthase kinase-3beta cascade. *FASEB J* 17: 295 – 297, 2003.
- **Papasozomenos SC** and Su Y. Altered phosphorylation of tau protein in heat-shocked rats and patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(10):4543-7, 1991.
 - **Pastor P**, Ezquerro M, Munoz E, Marti MJ, Blesa R et al. Significant association between the tau gene A0/A0 genotype and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47: 242–245, 2000.
 - **Perez M**, Arrasate M, Montejo De Garcini E, Munoz V and Avila J. In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation. *Biochemistry* 40: 5983–5991, 2001.
 - **Perez M**, Cuadros R, Smith MA, Perry G and Avila J. Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett* 486: 270–274, 2000.
 - **Perez M**, Hernandez F, Gomez-Ramos A, Smith M, Perry G et al. Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur J Biochem* 269: 1484-1489, 2002.
 - **Perez M**, Hernandez F, Lim F, Diaz-Nido J and Avila J. Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 5: 301–308, 2003.
 - **Perez M**, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E and Avila J. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* 67: 1183–1190, 1996.
 - **Perl DP** and Brody AR. Alzheimer's disease: X-ray spectrometric evidence of aluminum accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science* 208: 297–299, 1980.
 - **Perry G**, Nunomura A, Lucassen P, Lassmann H and Smith MA. Apoptosis and Alzheimer's disease. *Science* 282: 1268–1269, 1998.
 - **Pickering-Brown SM**, Baker M, Nonaka T, Ikeda K, Sharma S et al. Frontotemporal dementia with Pick-type histology associated with Q336R mutation in the tau gene. *Brain* 127: 1415–1426, 2004.

- **Planel E**, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K et al. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24: 2401–2411, 2004.
- **Poirier J**, Minnich A and Davignon J. Apolipoprotein E synaptic plasticity and Alzheimer's disease. *Ann Med* 27: 663–670, 1995.
- **Poorkaj P**, Grossman M, Steinbart E, Payami H, Sadovnick A et al. Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 58: 383–387, 2001.
- **Probst A**, Götz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C et al. Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 99: 469–481, 2000.
- **Qu MH**, Li H, Tian R, Nie CL, Liu Y et al. Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* 15(18): 2723-7, 2004.
- **Raina AK**, Hochman A, Ickes H, Zhu X, Ogawa O et al. Apoptotic promoters and inhibitors in alzheimer's disease: who wins out? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 251–254, 2003.
- **Rapoport M**, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP and Ferreira A. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6364–6369, 2002.
- **Ratnavalli E**, Brayne C, Dawson L and Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 58: 1615–1621, 2002.
- **Rebeiz JJ**, Kolodny EH and Richardson EP Jr. Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia. *Arch Neurol* 18: 20–33, 1968.
- **Rehen SK**, McConnell MJ, Kaushal D, Kingsbury MA, Yang AH et al. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13361–13366, 2001.
- **Rehen SK**, Yung YC, McCreight MP, Kaushal D, Yang AH et al. Constitutional aneuploidy in the normal human brain. *J Neurosci* 25:2176–2180, 2005.

-
- **Ren QG**, Liao XM, Wang ZF, Qu ZS and Wang JZ. The involvement of glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase-2A in lactacystin-induced tau accumulation. *FEBS Lett* 580: 2503–2511, 2006.
 - **Rewcastle NB**. Degenerative diseases of the central nervous system, in: R.L. Davis, D.M. Robertson (Eds.), *Textbook Neuropathology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 903–961, 1991.
 - **Rinne JO**, Lee MS, Thompson PD and Marsden CD. Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases. *Brain* 117: 1183–1196, 1994.
 - **Rizzini C**, Goedert M, Hodges JR, Smith MJ, Jakes R et al. Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 990–1001, 2000.
 - **Rocca WA**, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M et al. Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980–1990 prevalence findings. The EURODEM- Prevalence Research Group, *Ann Neurol* 30: 381–390, 1991.
 - **Rossi G**, Dalprà L, Crosti F, Lissoni S, Sciacca FL et al. A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell Cycle* 7: 1788–94, 2008.
 - **Rosso SM**, van Herpen E, Deelen W, Kamphorst W, Severijnen LA et al. A novel tau mutation, S320F, causes a tauopathy with inclusions similar to those in Pick's disease. *Ann Neurol* 51: 373– 376, 2002.
 - **Salehi A**, Delcroix JD and Mobley WC. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 26: 73–80, 2003.
 - **Santacruz K**, Lewis J, Spire T, Paulson J, Kotilinek L et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476–481, 2005.
 - **Santa-Maria I**, Hernandez F, Martin CP, Avila J and Moreno FJ. Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers. *Biochemistry* 43: 2888–2897, 2004.

-
- **Sasaki N**, Fukatsu R, Tsuzuki K, Hayashi Y, Yoshida T et al. Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am J Pathol* 153: 1149–1155, 1998.
 - **Sayre LM**, Zelasko DA, Harris PLR, Perry G, Salomon RG et al. 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68: 2092-2097, 1997.
 - **Schindowski K**, Bretteville A, Leroy K, Begard S, Brion JP et al. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 169, 599–616, 2006.
 - **Schmechel DE**, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM et al. Increased amyloid betapeptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9649 – 9653, 1993.
 - **Schmidt ML**, Huang R, Martin JA, Henley J, Mawal-Dewan M et al. Neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy contain the same tau epitopes identified in Alzheimer's disease PHFtau. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 534–539, 1996.
 - **Schneider A**, Biernat J, vonBergen M, Mandelkow E and Mandelkow EM. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 38: 3549–3558, 1999.
 - **Schweers O**, Mandelkow EM, Biernat J and Mandelkow E. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8463–8467, 1995.
 - **Scott CW**, Fieles A, Sygowski LA and Caputo CB. Aggregation tau protein by aluminium. *Brain Res* 628: 77–84, 1993.
 - **Serrano L**, Montejo de Garcini E, Hernandez MA and Avila J. Localization of the tubulin binding site for tau protein. *Eur J Biochem* 153: 595–600, 1985.

-
- **Shin RW**. Interaction of aluminum with paired helical filament tau is involved in neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Gerontology* 43: 16–23, 1997.
 - **Singh TJ**, Zaidi T, Grundkeiqbal I and Iqbal K. Modulation of GSK-3-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline-dependent protein kinases. *FEBS Lett* 358: 4–8, 1995.
 - **Sjöberg MK**, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB and Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119(Pt 10):2025–34, 2006.
 - **Skibinski G**, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL et al. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37: 806–808, 2005.
 - **Smith MA**, Casadesus G, Joseph JA and Perry G. Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain. *Free Radic Biol Med* 33: 1194–1199, 2002.
 - **Smith MA**, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE et al. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382: 120–121, 1996.
 - **Snow AD**, Willmer JP and Kisilevsky R. Sulfated glycosaminoglycans in Alzheimer's disease. *Hum Pathol* 18: 506–510, 1987.
 - **Sontag E**, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C et al. Molecular Interactions among Protein Phosphatase 2A, Tau, and Microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem* 274: 25490–25498, 1999.
 - **Sperfeld AD**, Collatz MB, Baier H, Palmbach M and Storch A. FTDP-17: an earlyonset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann Neurol* 46: 708–715, 1999.
 - **Spillantini MG**, Crowther RA, Kamphorst W, Heutink P and van Swieten JC. Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau. *Am J Pathol* 153: 1359–1363, 1998.
 - **Spillantini MG**, Goedert M, Crowther RA, Murrell JR, Farlow MR et al. Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with

- abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4113–4118, 1997.
- **Spillantini MG**, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839–840, 1997.
 - **Spillantini MG**, Yoshida H, Rizzini C, Lantos PL, Khan N et al. A novel tau mutation (N296N) in familial dementia with swollen achromatic neurons and corticobasal inclusion bodies. *Ann Neurol* 48: 939–943, 2000.
 - **Spittaels K**, Van den Haute C, Geerts H, Moechars D and Van Leuven F. Expression of human GSK3B (S9A) reduces brain size in transgenic mice. *Proc Int Conf Alzheimer's Disease Related Disorders 6th Amsterdam The Netherlands* 1998.
 - **Spittaels K**, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K et al. Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155: 2153–2165, 1999.
 - **Spittaels K**, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M et al. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* 275: 41340–41349, 2000.
 - **Stanford PM**, Halliday GM, Brooks WS, Kwok JB, Storey CE et al. Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations. *Brain* 123: 880–893, 2000.
 - **Stanford PM**, Shepherd CE, Halliday GM, Brooks WS, Schofield PW et al. Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain* 126: 814–826, 2003.
 - **Steele JC**, Richardson J and Olszewski J. Progressive supranuclear palsy. A heterogeneous degeneration involving brain stem, basal ganglia and cerebellum with vertical gaze ans pseudobulbar palsy, nuchal dystonia and dementia. *Arch Neurol* 333–359, 1964.

- **Suizu F**, Ryo A, Wulf G, Lim J and Lu KP. Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol* 26:1463-79, 2006.
- **Takashima A**, Noguchi K, Sato K, Hoshino T and Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7789 – 7793, 1993.
- **Takeda A**, Perry G, Abraham NG, Dwyer BE, Kutty RK et al. Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with tau. *J Biol Chem* 275: 5395–5399, 2000a.
- **Takeda A**, Smith MA, Avila J, Nunomura A, Siedlak SL et al. In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J Neurochem* 75: 1234–1241, 2000b.
- **Tanaka T**, Zhong J, Iqbal K, Trenkner E and Grundke-Iqbal I. The regulation of phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells: the role of protein phosphatases. *FEBS Lett* 426: 248–254, 1998.
- **Tanemura K**, Akagi T, Murayama M, Kikuchi N, Murayama O et al. Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis* 8:1036-45, 2001.
- **Tatebayashi Y**, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K et al. Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13896–13901, 2002.
- **Terwel D**, Lasrado R, Snauwaert J, Vandeweert E, Van Haesendonck C et al. Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J Biol Chem* 280: 3963–73, 2005.
- **Thurston VC**, Zinkowski RP and Binder LI. Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 105: 20–30, 1996.
- **Troncoso JC**, Costello A, Watson AL Jr and Johnson GV. In vitro polymerization of oxidized tau into filaments. *Brain Res* 613: 313–316, 1993.
- **Tseng HC**, Lu Q, Henderson E and Graves DJ. Phosphorylated tau can promote tubulin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9503–9508, 1999.

- **Tu H**, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF et al. Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981–993, 2006.
- **Tucholski J**, Kuret J and Johnson GV. Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J Neurochem* 73: 1871–1880. 1999.
- **Uchida K**, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N et al. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem* 273: 16058-16066, 1998.
- **Vafai SB** and Stock JB. Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease. *FEBS Lett* 518: 1–4, 2002.
- **van Swieten J** and Spillantini MG. Hereditary frontotemporal dementia caused by tau gene mutations. *Brain Pathol* 17: 63–73, 2007.
- **van Swieten JC**, Stevens M, Rosso SM, Rizzu P, Joosse M et al. Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations. *Ann Neurol* 46: 617–626, 1999.
- **Vermersch P**, Delacourte A, Javoy-Agid F, Hauw JJ and Agid Y. Dementia in Parkinson's disease: biochemical evidence for cortical involvement using the immunodetection of abnormal Tau proteins. *Ann Neurol* 33: 445–450, 1993.
- **Vermersch P**, Frigard B, David JP, Fallet-Bianco C and Delacourte A. Presence of abnormally phosphorylated Tau proteins in the entorhinal cortex of aged non-demented subjects. *Neurosci Lett* 144: 143–146, 1992.
- **Vermersch P**, Robitaille Y, Bernier L, Wattez A, Gauvreau D et al. Biochemical mapping of neurofibrillary degeneration in a case of progressive supranuclear palsy: evidence for general cortical involvement. *Acta Neuropathol* 87: 572–577, 1994.
- **Verpillat P**, Camuzat A, Hannequin D, Thomas-Anterion C, Puel M et al. Association between the extended tau haplotype and frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 59(6): 935-9, 2002.

-
- **Verpillat P**, Ricard S, Hannequin D, Dubois B, Bou J et al. Is the Saitohin gene involved in neurodegenerative diseases? *Ann Neurol* 52: 829–832, 2002.
 - **Vershinin M**, Carter BC, Razafsky DS, King SJ and Gross SP. Multiple-motor based transport and its regulation by tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 87–92, 2007.
 - **von Bergen M**, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM et al. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif [(306)VQIVYK(311)] forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5129–5134, 2000
 - **Vukicevic V**, Jauch A, Dinger TC, Gebauer L, Hornich V et al. Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. *Mech Ageing Dev* 131: 124–32, 2010.
 - **Wakabayashi K**, Oyanagi K, Makifuchi T, Ikuta F, Homma A et al. Corticobasal degeneration: etiopathological significance of the cytoskeletal alterations. *Acta Neuropathol* 87: 545–553, 1994.
 - **Wang JZ** and Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* 85(2):148-75, 2008.
 - **Wang JZ**, Grundke-Iqbal I and Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Med* 2: 871–875, 1996.
 - **Wang JZ**, Grundke-Iqbal I and Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 25: 59–68, 2007.
 - **Wang Y**, Wang J, Gao L, Lafyatis R, Stamm S and Andreadis A. Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c, SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2b1. *J Biol Chem* 280: 14230–14239, 2005.
 - **Watanabe A**, Takio K and Ihara Y. Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments: unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *J Biol Chem* 274: 7368–7378, 1999.

- **Weingarten MD**, Lockwood AH, Hwo SY and Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1858–1862, 1975.
- **Westra JW**, Peterson SE, Yung YC, Mutoh T, Barral S et al. Aneuploid mosaicism in the developing and adult cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 507: 1944–51, 2008.
- **Wille H**, Drewes G, Biernat J, Mandelkow EM and Mandelkow E. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* 118: 573–584, 1992.
- **Williams A**, Jahreiss L, Sarkar S, Saiki S, Menzies FM et al. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr Top Dev Biol* 76: 89–101, 2006.
- **Wilson DM** and Binder LI. Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150: 2181–2195, 1997.
- **Wittmann CW**, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J et al. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293: 711–714, 2001.
- **Xie L**, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W et al. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22: RC221, 2002.
- **Yan SD**, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M et al. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nature Med* 1: 693–699, 1995.
- **Yang AH**, Kaushal D, Rehen SK, Kriedt K, Kingsbury MA et al. Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells. *J Neurosci* 23:10454–10462, 2003.
- **Yang LS** and Ksiezak-Reding H. Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. *Eur J Biochem* 233: 9–17, 1995.

-
- **Yang LS**, Gordon-Krajcer W and Ksiezak-Reding H. Tau released from paired helical filaments with formic acid or guanidine is susceptible to calpain-mediated proteolysis. *J Neurochem* 69: 1548–1558, 1997.
 - **Yang Y**, Yang XF, Wang YP, Tian Q, Wang XC et al. Inhibition of protein phosphatases induces transport deficits and axonopathy. *J Neurochem* 102: 878–886, 2007.
 - **Yankner BA**. New clues to Alzheimer's disease: unraveling the roles of amyloid and tau. *Nature Med* 2: 850–852, 1996.
 - **Yoshiyama Y**, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53: 337–351, 2007.
 - **Zhang YJ**, Xu YF, Liu YH, Yin J, Li HL et al. Peroxynitrite induces Alzheimer-like tau modifications and accumulation in rat brain and its underlying mechanisms. *FASEB J* 20: 1431–1442, 2006.
 - **Zhou F**, Zhu X, Castellani RJ, Stimmelmayer R, Perry G et al. Hibernation, a model of neuroprotection. *Am J Pathol* 158: 2145–2151, 2001.
 - **Zhou XW**, Tanila H, Liu R, Winblad B and Pei JJ. Ab mediates tau hyperphosphorylation via down-regulating PP2A in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dementia* 2: S463-S464, 2006.
 - **Zhou ZX**, Kops O, Werner A, Lu JP, Shen M et al. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 6: 873–883, 2000.

Ringraziamenti

Arrivata alla fine di questo percorso voglio ringraziare le persone che ne hanno fatto parte.

Il primo ringraziamento va alla Prof.ssa Leda Dalprà per la fiducia riposta nelle mie capacità e per avermi permesso di imparare da Lei in questi tre anni.

Grazie ad Elena che ha deciso di iniziare con me questa avventura tre anni fa, per avermi supportata e, soprattutto, sopportata tutto il giorno, tutti i giorni, senza mai avere istinti omicidi (forse).

Grazie al laboratorio di Genetica Medica, a Sere, Nicoletta, Elena, Francesca, Eugenio e Roberto, per avermi permesso di lavorare in un ambiente sereno e giocoso e per tutti i preziosi insegnamenti, a Saretta e a Fabi per le “consulenze mediche” e per le pause gossip che hanno rallegrato tantissime giornate e a Giò per essere stata il “silenzioso” sottofondo di tutta la stesura della tesi.

Grazie a Simo ed Angela per avermi sostenuta e per i consigli sempre scientificamente rilevanti.

Grazie a Fabio, Ale e tutti i miei amici, per aver sopportato gli infiniti bidoni degli ultimi due mesi e per la loro presenza costante in tutti questi anni, a Claudia per essersi iscritta con me in palestra nonostante sapesse già come sarebbe andata a finire e a Dario che continua ad essere convinto che io sia una grande ricercatrice.

Grazie alla mia famiglia, alla zia Pierca e ad Annalisa per avere sempre sostenuto le mie scelte.

Grazie a Pepe per essere la sveglia più tenera del mondo.

Grazie a Luca per essere la mia parte positiva e sognatrice e per la pazienza, non solo di questi ultimi mesi.

Un enorme grazie a mia mamma, per avermi sempre dato la possibilità di scegliere quello che volevo e per tutti i sacrifici che ha fatto per sostenermi.

Grazie a chi non c'è più, ma che in fondo è sempre con me.