

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche

Dottorato di Ricerca in Neuroscienze XXIII ciclo



MUTAZIONI NEL GENE *TAU* ASSOCIATE  
AD INSTABILITÀ CROMOSOMICA:  
UN NUOVO RUOLO DELLA PROTEINA TAU.  
STUDIO NELL'UOMO.

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Giovanni TREDICI

Tutore: Chiar.ma Prof.ssa Leda DALPRÀ

Tesi di Dottorato di

Elena PANZERI

Matricola 052401

Anno Accademico 2009-2010

---

ABBREVIAZIONI.....	1
RIASSUNTO.....	3
INTRODUZIONE	
1. Il citoscheletro.....	6
2. I neuroni.....	8
3. La proteina tau.....	10
3.1 La localizzazione di tau.....	10
3.2 La funzione di tau.....	11
3.3 Le isoforme di tau.....	13
3.4 I domini della proteina tau, il dominio di proiezione.....	14
3.5 I domini della proteina tau, il dominio di legame ai microtubuli.....	15
3.6 Le modificazioni post-trascrizionali di tau.....	16
3.6.1 Fosforilazione.....	16
3.6.2 Glicosilazione e O-Glc-NAc.....	19
3.6.3 Glicazione.....	20
3.6.4 Ubiquitinazione.....	20
3.6.5 Troncatura e deamidazione.....	21
3.6.6 Ossidazione.....	21
3.6.7 Poliaminazione.....	21
3.6.8 Isomerizzazione.....	21
3.6.9 Nitrazione.....	21
3.7 Il ruolo patogenetico di tau.....	22
3.7.1 Il processo di aggregazione di tau.....	22
3.7.2 L'aumento di tau.....	23
3.7.3 I cambiamenti conformazionali e le modificazioni post-trascrizionali.....	24
3.7.4 L'iperfosforilazione.....	25
3.7.5 La formazione di aggregati patologici.....	29
3.7.6 Tau e l'apoptosi.....	30
4. Il gene <i>MAPT</i> .....	31
4.1 Gli alplotipi.....	32
4.2 Lo splicing alternativo.....	32
4.3 La Saithoina.....	33
4.4 Le mutazioni.....	34
4.4.1 Mutazioni che alterano l'interazione tau-MT.....	35

---

4.4.2 Mutazioni che alterano lo splicing dell'mRNA.....	35
4.4.3 Mutazioni che promuovono la formazione di filamenti tau.....	37
<b>5. Le taupatie.....</b>	<b>40</b>
5.1 Alzheimer.....	41
5.2 Sindrome di Down.....	42
5.3 Malattia di Pick.....	42
5.4 Paralisi Progressiva Sopranucleare.....	42
5.5 Degenerazione Cortico Basale.....	43
5.6 Malattia di Niemann-Pick di tipo C.....	43
5.7 Complesso Guamaniano SLA/PDC.....	44
5.8 Demenza Argirofilica Granulosa.....	44
5.9 Parkinsonismo postencefalitico.....	44
<b>6. La Demenza Frontotemporale.....</b>	<b>45</b>
6.1 Epidemiologia genetica.....	46
6.2 Le mutazioni in <i>MAPT</i> .....	47
6.3 Età di esordio.....	48
6.4 Presentazione clinica.....	49
6.5 Indagini diagnostiche.....	50
6.6 Trattamento terapeutico.....	50
<b>SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>52</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	
1. Collaborazione.....	54
2. Pazienti.....	55
3. Linfociti periferici.....	55
4. Fibroblasti.....	56
5. Linfoblasti.....	56
6. array-CGH.....	57
7. Soluzioni.....	58
<b>RISULTATI</b>	
1. Linfociti periferici.....	60
2. Fibroblasti.....	66
3. Linfoblasti.....	73

---

3.1 Bleomicina.....	73
3.2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	75
4. array-CGH.....	77
4.1 Paziente RA.....	77
4.2 Paziente DSG.....	81
4.3 Paziente DI.....	84
4.4 Paziente CA.....	84
4.5 Paziente GG.....	87
4.6 Paziente DM.....	89
4.7 Paziente EP.....	93
DISCUSSIONE.....	99
BIBLIOGRAFIA.....	108
RINGRAZIAMENTI.....	128

*Ai miei Angeli  
volati lassù  
e a quelli  
rimasti quaggiù*

MT: microtubuli

MAP: proteina associata ai microtubuli

*MAPT*: proteina tau associata ai microtubuli

NFT: grovigli neurofibrillari

PHF: filamenti a doppia elica

AD: Alzheimer

FTD: demenza frontotemporale

CGH: ibridazione genomica comparativa

*Riassunto*

La proteina tau è codificata dal gene *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau, 17q21.1) ed è principalmente coinvolta nell'assemblaggio e nella stabilizzazione dei microtubuli, sia in cellule neurali che in linfociti e fibroblasti. Tau può essere tuttavia considerata una proteina multifunzionale, data la sua capacità di legare il DNA e la sua presenza in diversi compartimenti cellulari, oltre che nel nucleo interfase e lungo i cromosomi in mitosi.

È stata riportata una maggiore frequenza di aberrazioni cromosomiche, aneuploidie, difetti del fuso mitotico e alterazioni della struttura cromatinica in pazienti con mutazione P301L, la più frequente nel gene *MAPT* e causa di demenza frontotemporale, facendo supporre che la proteina possa svolgere una funzione nucleare nella stabilità cromosomica attraverso l'interazione sia con i microtubuli che con la cromatina (Rossi G, 2008).

Ad oggi sono state descritte 44 mutazioni nel gene, che esplicano il loro effetto riducendo l'affinità di legame di tau ai microtubuli, causando l'iperfosforilazione della proteina o modificando il fisiologico rapporto tra isoforme proteiche.

Scopo del presente progetto di ricerca è stato quello di analizzare cellule somatiche (linfociti periferici e fibroblasti) di pazienti affetti da demenza causata da diverse mutazioni nel gene *MAPT* attraverso tecniche di citogenetica classica (analisi del cariotipo) e molecolare (array-CGH) per valutare se la proteina tau sia in grado di provocare una patologia nucleare in cellule non neurali oltre alla patologia citoscheletrica del sistema nervoso e chiarire i meccanismi molecolari alla base dell'instabilità cromosomica osservata.

È stata osservata un'elevata percentuale di cellule aneuploidi e con lesioni cromosomiche in entrambe le popolazioni cellulari studiate nei pazienti rispetto ai controlli, confermando una maggiore suscettibilità dei primi ad anomalie che potrebbero essere dovute alla disfunzione di tau mutata nel corretto assemblaggio e nella stabilizzazione dei microtubuli e di conseguenza del fuso mitotico. Nelle cellule dei pazienti presi in esame è stata inoltre riscontrata un'aumentata percentuale di separazione prematura dei cromatidi (pcs), correlata con la perdita del controllo della segregazione cromosomica che potrebbe spiegare le aneuploidie osservate.

Poiché alcune delle aberrazioni riscontrate nei nostri pazienti sono presenti in sindromi da instabilità cromosomica causate da mutazioni di proteine coinvolte nei sistemi di riparo del DNA, è stato indagato se le cellule mutate fossero più sensibili ad agenti genotossici. A tale scopo è stato studiato l'effetto di bleomicina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sui linfoblasti di tre pazienti con mutazione P301L. Per quanto riguarda il possibile coinvolgimento della tau nei sistemi di riparo del DNA, i nostri dati preliminari portano ad escludere che tau intervenga nei sistemi di riparo delle rotture a doppio filamento attivati dalla bleomicina, mentre non escludono che



possa essere coinvolta nei sistemi di riparo delle lesioni a singola elica, attivati dall' $H_2O_2$ . Questi dati sono comunque da implementare sia in termini di numero di osservazioni totali sia reclutando altri controlli e pazienti, ove possibile.

Nel loro complesso, i nostri risultati confermano che le aberrazioni riscontrate nei pazienti non sono esclusivamente legate alla mutazione P301L, ma sono un fenomeno più generale riconducibile ad un ruolo della proteina nella stabilità e nella segregazione cromosomica, attraverso la sua interazione sia con i microtubuli che con la cromatina.

La costruzione di un fuso mitotico instabile a causa della disfunzione della proteina tau potrebbe quindi causare errori nel mantenimento e nella segregazione dei cromosomi nonché nel riparo dei danni al DNA, con conseguenti alterazioni nel dosaggio e nell'espressione genica, morte neuronale e degenerazione.

Tau potrebbe quindi essere considerata una proteina coinvolta anche nel controllo del fuso mitotico e nella stabilità cromosomica e cromatinica e di conseguenza un possibile componente del complesso sistema alla base della protezione della stabilità genomica.

# *Introduzione*

## 1. IL CITOSCHELETRO

Il citoscheletro è composto da tre costituenti principali: i microtubuli, i microfilamenti o filamenti di actina ed i filamenti intermedi.

I filamenti actinici, con il loro spessore di 6-7 nm, sono i filamenti citoscheletrici più sottili. L'unità base è rappresentata dall'actina, i cui monomeri si uniscono a formare lunghe catene elicoidali, con un'estremità positiva in grado di allungarsi grazie all'idrolisi di ATP ed una negativa in grado di accorciarsi.



Figura 1. Polimerizzazione del citoscheletro actinico (modificata da Metzler DE, 2001)

Le proteine associate ai filamenti actinici sono numerose: ci sono proteine che inibiscono la polimerizzazione dei filamenti, altre che li tagliano ed altre ancora che li incappucciano per evitare che si accrescano; ci sono anche proteine che collegano i microfilamenti per formare un fascio, come avviene nei microvilli, ed altre proteine che conferiscono loro la contrattilità, rendendoli così capaci di far cambiare forma alla cellula e di dirigere i traffici interni ad essa. Inoltre, su questi filamenti scorrono le miosine che, grazie all'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP, trasportano vescicole. Le miosine e l'actina partecipano anche al processo di mitosi, dove concorrono alla formazione della strozzatura della membrana plasmatica durante la citochinesi.

I filamenti intermedi hanno diametro di 10 nm, possiedono una grande resistenza alla trazione, consentono alla cellula di sopportare stress meccanici e sono costituiti da proteine filamentose non globulari, quali desmina, vimentina, proteina acida gliale, neurofilamenti, lamina nucleare. A differenza dei filamenti actinici e dei microtubuli, non sono polarizzati, sono più stabili e non intervengono nella motilità cellulare. Appartengono a questa classe le lamine che si trovano alla base dell'involucro nucleare che separa ed isola il DNA dal citoplasma.

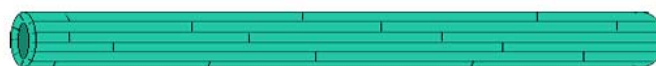


Figura 2. Struttura di un filamento intermedio, formato da una serie ripetuta di subunità proteiche filamentose (modificata da Metzler DE, 2001)

I microtubuli (MT) infine sono composti da eterodimeri di tubulina- $\alpha$  e tubulina- $\beta$  che si depolarizzano e ripolarizzano di continuo a partire dal centrosoma. La tubulina è una proteina in grado di legarsi al GTP, ma solo la  $\beta$  può idrolizzare GTP a GDP. I dimeri si uniscono formando protofilamenti  $\alpha/\beta$ -tubulinici, cioè singole unità che si associano a

formare il microtubulo, una struttura a cilindro cavo delimitata esternamente da un "anello" di tredici protofilamenti. L'assemblaggio del microtubulo è più rapido in corrispondenza di una zona, detta estremità positiva, mentre l'altra viene definita estremità negativa. Le estremità negative di tutti i microtubuli si riuniscono in un MTOC (*MicroTubules Organizing Centre*, Centro d'Organizzazione dei Microtubuli), posizionato al centro della cellula e normalmente coincidente con il centrosoma, zona dove risiedono una coppia di centrioli e alcune proteine necessarie per la coordinazione dei microtubuli di nuova formazione (come la tubulina- $\gamma$ ).

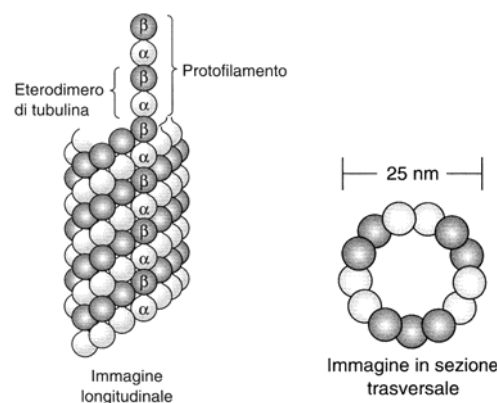


Figura 3. Sezioni della struttura dei microtubuli (modificata da Mangiarotti G, 1994)

A bassissime concentrazioni di tubulina libera *in vitro* si ha la depolimerizzazione del microtubulo formato e man mano che la concentrazione di tubulina aumenta, la depolimerizzazione rallenta fino a raggiungere un punto di equilibrio (*punto critico*). Se le concentrazioni di tubulina libera sono abbastanza elevate, i microtubuli possono formarsi spontaneamente, ma nella cellula normalmente non viene raggiunta la concentrazione sufficiente affinché ciò avvenga.

La crescita di un microtubulo non è un processo continuo e lineare, ma il filamento va incontro a fasi di rapida crescita e rapida contrazione continuamente alternate, secondo un processo di "instabilità dinamica", fortemente influenzato dalla funzione che i microtubuli stanno svolgendo, ad esempio durante la mitosi e nella formazione del fuso mitotico l'instabilità dei microtubuli aumenta molto.

Due microtubuli possono anche scorrere l'uno sull'altro grazie a "motori proteici" che trasformano l'energia derivante dall'idrolisi di ATP in energia motrice, facendo muovere organelli e vescicole verso l'estremità positiva (chinesine) o negativa (dineine). I microtubuli contengono proteine che ne costituiscono il 10-15% della massa e danno l'avvio all'assemblaggio: le principali proteine, denominate MAPs (Microtubule Associated Proteins), sono Tau, MAP1 e MAP2 e possono essere fosforilate in più siti da chinasi, permettendo il

controllo dell'assemblaggio.

Le funzioni più importanti dei microtubuli sono il trasporto intracellulare di vescicole, il posizionamento di organelli e la formazione del fuso mitotico durante la mitosi. Inoltre formano l'asse portante di ciglia e flagelli.

Va ricordato che il citoscheletro è coinvolto in numerose funzioni fondamentali per la cellula, infatti:

- conferisce un elevato livello di organizzazione cellulare
- permette l'assunzione ed il mantenimento di una forma cellulare complessa
- svolge un ruolo fondamentale in movimento, divisione cellulare, posizionamento e movimento di organelli e mRNA
- è il sito di ancoraggio per molti enzimi del citosol, facilitando lo scambio di prodotti intermedi delle vie metaboliche
- è correlato ai processi di segnalazione ed adesione cellulare.

Dati questi presupposti, risulta evidente che qualsiasi cambiamento nella sua conformazione può provocare gravi conseguenze per la cellula.

## **2. I NEURONI**

I neuroni sono cellule con morfologia estremamente complessa che presentano due tipi di estensioni citoplasmatiche, gli assoni ed i dendriti. La trasmissione neurale avviene attraverso queste strutture e di conseguenza qualsiasi cambiamento nella morfologia neuronale può comprometterne il comportamento e causare patologie.

La morfologia di un neurone è determinata dalla conformazione del suo citoscheletro, di conseguenza proteine che si associano ai principali componenti del citoscheletro come i microtubuli (MT) ne influenzano enormemente la morfologia e la fisiologia. L'integrità del citoscheletro è quindi critica per la funzione e la sopravvivenza dei neuroni, infatti diverse patologie neurodegenerative sono caratterizzate da specifiche anomalie citoscheletriche neuronali e lesioni cerebrali tipiche che hanno in comune la formazione di depositi filamentosi costituiti da proteine anomale.

Il citoscheletro neuronale è composto da microtubuli, neurofilamenti e microfilamenti.

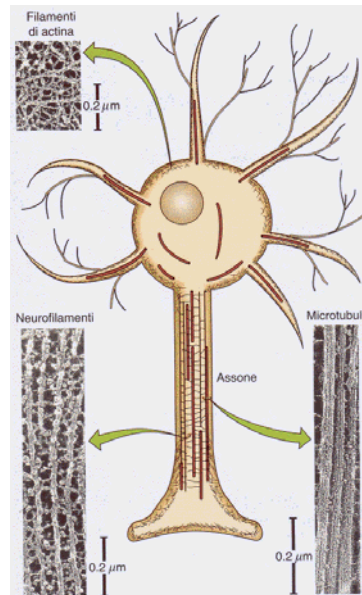


Figura 4. Struttura del neurone e del suo citoscheletro (modificata da Shepard GM, 1994)

I microtubuli sono tra i più importanti componenti strutturali presenti nei processi neuritici in crescita e maturi, sono disposti longitudinalmente nei dendriti e nell'assone, possono raggiungere diversi millimetri di lunghezza e sono distanziati l'uno dall'altro da circa 80-200 nm.

I neurofilamenti sono disposti in fasci longitudinali rispetto allo sviluppo assonico, hanno diametro medio di circa 10 nm e sono uniti da legami crociati che forniscono sostegno meccanico ed impediscono la rottura dell'assone. Sono costituiti da lunghe proteine lineari a forma di bastoncino, suddivisibili in sei classi in base alle omologie della loro sequenza aminoacidica.

I microfilamenti sono costituiti da filamenti di actina con diametro medio di 1 nm che formano un fitto intreccio posto in prossimità della membrana cellulare di tutto il neurone.

In cellule proliferanti come i neuroblasti (i precursori dei neuroni) la probabilità di assemblaggio dei microtubuli è la stessa della depolimerizzazione in qualsiasi direzione, permettendo il mantenimento di una morfologia cellulare simil-sferica. Tuttavia, durante la differenziazione dei neuroblasti in neuroni, i MT vengono stabilizzati in direzioni specifiche, generando le estensioni citoplasmatiche che diventeranno assoni e dendriti (Mitchison T, 1988).

Gli assoni in crescita sono strutture molto dinamiche e la stabilità dei microtubuli varia lungo la lunghezza dell'assone, con l'estremità distale più sensibile agli agenti depolimerizzanti e il turnover della tubulina più rapido nell'estremità prossimale.

### 3. LA PROTEINA TAU

La proteina tau è stata isolata nel 1975 da microtubuli derivanti da cervello come una proteina associata ai microtubuli (MAP) a basso peso molecolare (Weingarten MD, 1975). Successive analisi *in vitro* e studi su linee cellulari hanno suggerito che la proteina facilitasse l'assemblaggio dei microtubuli e la stabilizzazione dei loro polimeri attraverso il legame con la tubulina (Cleveland DW, 1990; Drubin DG, 1986; Caceres A, 1990), indicando che tau potesse sopprimere le dinamiche dei microtubuli (Panda D, 1995). La stessa funzione può essere svolta da altre MAP, spiegando così la compatibilità con la vita di topi knockout per tau che mostrano un fenotipo lieve, con debolezza muscolare, iperattività, disorganizzazione dei microtubuli in alcuni assoni di piccolo calibro, ma non neurodegenerazione (Dawson HN, 2001).

Tau è una proteina altamente idrofila, solubile e stabile al calore che adempie a diverse funzioni, oltre al mantenimento della struttura del citoscheletro.

#### 3.1 La localizzazione di tau

Tau è una fosfoproteina espressa costitutivamente ed abbondantemente sia nel sistema nervoso centrale (SNC) che in quello periferico (SNP). Nel SNC, tau è espressa soprattutto nei neuroni e negli assoni maturi ed in crescita, anche se è presente in minore quantità in oligodendrociti ed astrociti. È stata tuttavia dimostrata la presenza della proteina anche in cellule non-neurali, quali fibroblasti e linfociti (Ingelson M, 1996; Thurston VC, 1996). La fosforilazione della proteina sembra influenzare la sua distribuzione nelle cellule in crescita, con tau fosforilata presente soprattutto nel compartimento somatodendritico, mentre defosforilata nella regione distale dell'assone (Mandell JW, 1996).

È presente una quantità pressoché simile di tau sia negli assoni/sostanza bianca che nel compartimento somatodendritico/sostanza grigia dove è associata al reticolo endoplasmatico rugoso e all'apparato di Golgi (Khatoun S, 1994).

Tau è stata riscontrata a livello del citoscheletro, ma anche nei ribosomi di cellule neuronali e gliali, nella vicinanza della membrana plasmatica nelle linee cellulari neuronali (Papasozomenos S, 1991) e nei nucleoli di fibroblasti ed altre cellule in coltura. In particolare, la proteina è risultata localizzata nelle regioni fibrillari dense dei nucleoli in interfase e nelle NORs (Nucleolar Organizing Regions) dei cromosomi acrocentrici in mitosi. È stato inoltre dimostrato che tau colocalizza con le sequenze  $\alpha$ -satellite eterocromatiche e con la nucleolina a livello della periferia interna del nucleolo (Sjoberg MK, 2006). Va ricordato che sia tau che la nucleolina sono presenti in forma fosforilata nei grovigli neurofibrillari osservati in alcune patologie neurodegenerative denominate taupatie.

Recentemente è stata anche dimostrata la presenza di tau fosforilata all'interno del nucleo durante l'interfase e lungo i cromosomi dalla profase alla metafase e successivamente nella telofase, così che possa essere considerata una delle proteine dello strato pericromosomico insieme alla nucleolina (Rossi G, 2008). La maggior parte delle proteine dello strato pericromosomico sono associate ai cromosomi durante tutta la mitosi, ma alcune si dispongono nella periferia cromosomica in alcune fasi del ciclo cellulare e l'ipotesi che tali proteine possano svolgere un ruolo nella progressione della cellula in mitosi è supportato dalla recente scoperta che la nucleolina svolge un ruolo nel movimento cromosomico (Ma N, 2007).

### 3.2 La funzione di tau

La proteina tau è coinvolta principalmente nella polimerizzazione e nella stabilizzazione dei microtubuli, partecipando di conseguenza nell'organizzazione e nell'integrità del citoscheletro, infatti è in grado di aumentare la velocità di polimerizzazione dei microtubuli ed inibirne la depolarizzazione. Stabilizzandoli, tau può conferire resistenza contro i veleni dei microtubuli (Baas PW, 1994).

Tau si lega ai microtubuli in due modi: quando questi sono assemblati si lega alla loro superficie esterna (Al-Bassam J, 2002), mentre quando viene miscelata con la tubulina è incorporata nei microtubuli in crescita come una struttura integrante (Kar S, 2003).

A livello neuronale tau è coinvolta nella polarità dei neuroni, nel trasporto assonale e nell'allungamento neuritico. Sembra che tau e altre MAP possano agire in modo cooperativo per regolare l'allungamento assonale e la migrazione neuronale, compensando un eventuale ruolo difettivo della proteina. Topi knockout per tau sono infatti vitali e fertili e mostrano un normale sviluppo fino all'età adulta, mentre animali doppi knockout per tau e MAP2 o per MAP1a e MAP2 muoiono 4 settimane dopo la nascita e mostrano difetti nell'allungamento e nella migrazione neuronale ed un evidente disassemblaggio dei microtubuli nel cono di crescita (Teng J, 2001). In un neurone maturo e normale, la tubulina è presente in concentrazione dieci volte maggiore rispetto a tau che di conseguenza risulta completamente legata ai microtubuli nella cellula.

Nelle cellule non neuronali tau induce la formazione di lunghe estensioni citoplasmatiche (Knops J, 1991). Ad oggi non è ancora stata chiarita la funzione della proteina a livello nucleare, soprattutto dopo che studi *in vitro* hanno dimostrato che essendo una proteina basica, è in grado di legare efficientemente il DNA in modo sequenza-indipendente se a doppio filamento o sequenza-specifico se a singolo filamento, inducendo un cambiamento conformazionali nel DNA (Hua Q, 2003; Krylova SM, 2005).

Dal momento che la proteina colocalizza parzialmente con le sequenze di DNA  $\alpha$ -satellite



pericentromeriche, è stato suggerito un ruolo di tau anche nell'organizzazione nucleolare e/o nell'eterocromatinizzazione di una parte dei geni dell'RNA ribosomale (Sjoberg MK, 2006). Questi geni, che sono silenziati nei nucleoli di tutti i tipi cellulari indipendentemente dalla loro attività metabolica sono organizzati in strutture dense e sono adiacenti all'eterocromatina centromerica perinucleare (Akhmanova A, 2000). A livello nucleolare, tau potrebbe quindi creare un link tra le ripetizioni di rDNA e l'eterocromatina pericentromerica, partecipando nel silenziamento dei geni dell'rRNA e/o nell'organizzazione e nell'integrità nucleolare (Sjoberg MK, 2006).

Tau colocalizza e, di conseguenza, potrebbe interagire anche con la nucleolina che, associandosi ai trascritti nascenti di pre-rRNA e a proteine ribosomali, è coinvolta nella struttura della cromatina, nella trascrizione dell'rDNA, nella maturazione dell'rRNA, nell'assemblaggio dei ribosomi e nel trasporto nucleo-citoplasmatico (Johansson C, 2004). Una prova della loro interazione potrebbe essere la loro simultanea presenza nei grovigli neurofibrillari tipici delle taupatie (Dranovsky A, 2001).

Tau è inoltre in grado di prevenire la denaturazione termica del DNA, migliorarne la rinaturazione, proteggerlo dai danni indotti dai radicali liberi, suggerendo una funzione simil-chaperon della proteina. Tau è risultata essere anche un inibitore dell'istone deacetilasi 6 (HDAC6) che regola l'acetilazione della tubulina.

Esistono crescenti prove che tau possa anche modulare il trasporto lungo i microtubuli basato su motori molecolari, infatti sembra interferire con il legame ai microtubuli della chinesina e proteine simili causando un'inibizione preferenziale del trasporto diretto verso l'estremità positiva (Ebner A, 1998).

È stato dimostrato che tau interagisce con molte altre proteine tra cui le fosfatasi, le Serina/Treonina chinasi, la Tirosina chinasi Fyn e la proteina scaffold 14-3-3, facendo supporre che tau possa svolgere un ruolo nella regolazione della localizzazione e della funzione di altre proteine. Per esempio, è stato dimostrato che il processo di formazione degli oligodendrociti coinvolga un'interazione tra Fyn e tau ed il reclutamento di tau da parte di Fyn attivato nei rafts in membrana sembra essere uno step importante nella mielinizzazione, suggerendo un ruolo essenziale di tau per la maturazione degli oligodendrociti (Klein C, 2002).

Anche il legame di tau alla proteina 14-3-3 è interessante per il ruolo centrale che svolge questa proteina nella regolazione della distribuzione intracellulare di altre proteine modulandone la funzione nella cellula. Può essere ipotizzato che tau possa regolare la distribuzione spaziale di 14-3-3 e dunque influire sulla funzione di questa importante proteina scaffold.

Infine, il legame a fosfatasi e chinasi può non solo svolgere un ruolo nella regolazione dello stato di fosforilazione di tau stessa, ma anche essere essenziale per la localizzazione di queste fosfotransferasi in specifici compartimenti intracellulari, regolando così la fosforilazione di altri substrati.

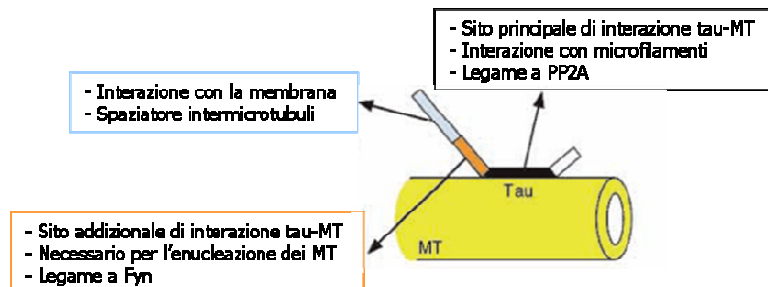


Figura 5. Organizzazione funzionale della proteina tau. La regione di legame ai microtubuli (MT) è mostrata in nero, la regione ricca di Proline in arancione e il dominio di proiezione in azzurro (modificata da Shahani N, 2002)

### 3.3 Le isoforme di tau

Nel cervello umano, tau è una proteina solubile presente in sei maggiori isoforme composte da un minimo di 352 ad un massimo di 441 aminoacidi con peso molecolare da circa 45 a 65 kDa, ottenute dallo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 del gene *MAPT*. In particolare, lo splicing dell'esone 10 porta alla formazione di isoforme che differiscono per la presenza di 3 o 4 domini al C-terminale (3R o 4R) che sono costituiti da 31 o 32 aminoacidi e rappresentano il sito di legame con la tubulina, mentre lo splicing degli esoni 2 e 3 produce 3 isoforme con zero (0N), uno (1N) o due (2N) inserti di 29 aminoacidi nel dominio N-terminale che mediano l'interazione di tau e dei MT con la membrana plasmatica come mostrato in figura 5. Ognuna di queste isoforme sembra avere un particolare ruolo fisiologico, dal momento che vengono diversamente espresse durante lo sviluppo, con l'espressione della forma 3R0N principalmente nel cervello fetale e transitoriamente durante la neurogenesi adulta (Bullmann T, 2007) e quantità quasi uguali di 3R e 4R nel cervello adulto. Le isoforme mancanti dell'esone 10 sono riscontrate precocemente o in cellule specifiche come le cellule dei granuli del giro dentato, mentre le isoforme derivanti dallo splicing degli esoni 2, 3 e 10 sono specifiche del cervello adulto, ma sembra che possano essere distribuite diversamente all'interno delle sottopopolazioni neuronali (Goedert M, 1989a). Esiste anche un'isoforma ad alto peso molecolare (120 kDa) denominata "big tau", che è espressa unicamente nei neuroni del sistema nervoso periferico e contiene un esone supplementare nell'N-terminale (Andreadis A, 1992). L'affinità di legame delle isoforme alla tubulina è differente, infatti la 4R si lega tre volte più forte rispetto alla 3R ed assembla i MT in modo più efficace grazie alla regione compresa tra i primi due domini di legame ai MT presente unicamente nella forma

4R che può anche spiazzare l'isoforma a tre ripetizioni. Dal momento che tau 3R si lega meno efficacemente ai MT, è stato suggerito che una stabilizzazione più dinamica potrebbe essere necessaria per la flessibilità del citoscheletro durante la migrazione neuronale, l'allungamento assonale, la proliferazione dendritica negli step precoci dello sviluppo neuronale così che l'espressione della tau 3R possa essere un marker di plasticità neuronale (Goode BL, 1994). Le isoforme nucleari di tau sono simili a quelle citoplasmatiche, ma mostrano minore solubilità, probabilmente a causa di modificazioni post-trascrizionali come la fosforilazione.

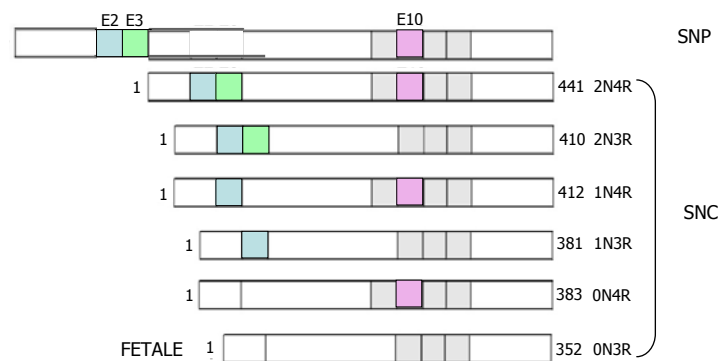


Figura 6. Isoforme della proteina tau. (modificata da Avila J, 2004)

### 3.4 I domini della proteina tau, il dominio di proiezione

Le due sequenze di 29 aminoacidi codificate dagli esoni 2 e 3 del gene *MAPT* conferiscono una diversa lunghezza all'N-terminale della proteina tau che rappresenta circa due terzi della intera proteina ed, a sua volta, può essere ulteriormente suddiviso in due sub-regioni: la regione più prossimale, che contiene un'elevata percentuale di residui acidi e quella più distale che invece è altamente basica in quanto ricca di residui di Prolina organizzati in motivi PPXXP o PXXP. Questa regione viene chiamata dominio di proiezione, dal momento che protrude dalla superficie dei microtubuli dove potrebbe interagire con altri elementi citoscheletrici, organelli citoplasmatici e la membrana plasmatica, permettendo il legame di tau a mitocondri e lisosomi (Brandt R, 1995). Questo dominio determina inoltre le spaziature tra i microtubuli negli assoni e nei dendriti e potrebbe aumentare il diametro assonale (Chen J, 1992).

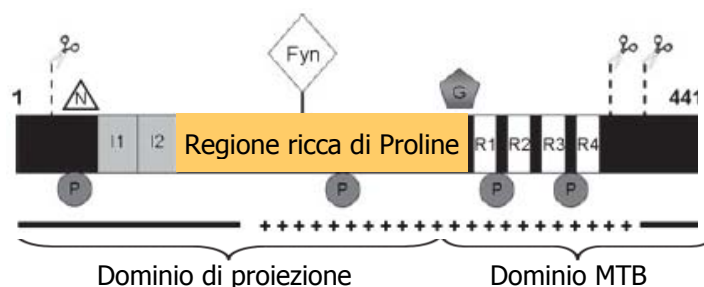


Figura 7. Domini di tau, siti di fosforilazione (P), glicosilazione o glicazione (G), nitrurazione (N), troncatura (forbice) e sito di legame per Fyn (modificata da Meraz-Riós MA, 2010)

Va ricordato che nei neuroni periferici che spesso proiettano un assone molto lungo con grande diametro, è presente un'altra sequenza N-terminale codificata dall'esone 4A che genera una specifica isoforma denominata "*big tau*". Ciò suggerisce che le regioni N-terminali siano fondamentali nell'organizzazione e nella stabilizzazione di alcuni tipi di assoni (Buè L, 2000).

È stato inoltre dimostrato che l'interazione di tau con la membrana plasmatica prevede il legame tra la sequenza ricca di Proline del dominio di proiezione ed i domini SH3 della famiglia src delle Tirosin chinasi non recettoriali, come Fyn. Questi dati suggeriscono un ruolo di tau nel signaling cellulare e nel pathway di queste proteine che sono in grado di modificare la forma cellulare agendo sull'actina citoscheletrica sottomembranosa. Il legame di tau alle famiglie fyn o src può infatti comportare la fosforilazione a livello della tirosina 18 (Lee G, 2005) che non influenza la capacità di legame ai microtubuli a differenza della fosforilazione di Serine e Treonine. Va ricordato che la fosforilazione della tirosina è importante per la funzione del cono di crescita nelle cellule neuronali, per il mantenimento della normale architettura dei neuriti e per la trasduzione del segnale neuronale (Goldberg DJ, 1996).

La regione ricca di Proline interagisce anche con la subunità p150 del complesso della dinactina coinvolto nel trasporto assonale retrogrado (Magnani E, 2007). Questo dominio che permette il legame di tau a componenti della membrana plasmatica neurale può essere importante anche per la localizzazione assone-specifica della proteina.

Grazie alla presenza dei residui acidi, questa regione contiene la regione per il legame ai cationi, (per esempio il ferro), ma anche la sequenza KKXX per il legame all'eparina (Arrasate M, 1997).

### 3.5 I domini della proteina tau, il dominio di legame ai microtubuli (MTB, MT Binding)

Tau lega i microtubuli attraverso regioni ripetitive nel C-terminale, chiamate domini di ripetizione (R1-R4) codificate dagli esoni 9-12. Le tre (3R) o quattro (4R) ripetizioni sono costituite da sequenze ripetute simili, ma non identiche di 31 o 32 residui, suddivisi in 18 aminoacidi altamente conservati che rappresentano la regione minima richiesta per il legame alla tubulina, separati da domini inter-repeat costituiti da 13 o 14 aminoacidi meno conservati. Questo dominio può essere suddiviso in tre regioni: basica, di reale legame alla tubulina e acidica carbossi-terminale.

È stato dimostrato che le isoforme di tau con 4R, tipiche dell'adulto, inducono più efficientemente l'assemblaggio dei MT rispetto all'isoforma 3R, poiché la parte maggiormente

coinvolta nella polimerizzazione è compresa tra le ripetizioni 1 e 2 (più specificamente il peptide  $_{274}\text{KVQIINKK}_{281}$ ), presente unicamente nella tau 4R (Goode BL, 1994).

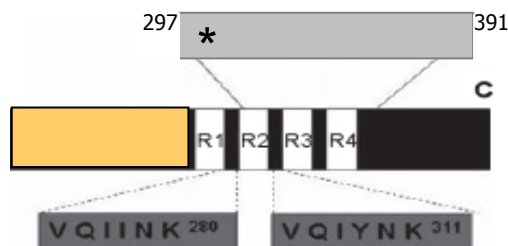


Figura 8. Regioni della proteina tau importanti nella sua aggregazione.

In arancione è mostrata la regione ricca di Prolina. (modificata da Meraz-Riós MA, 2010)

Questo dominio potrebbe essere coinvolto in altre funzioni: studi sperimentali hanno infatti dimostrato un legame diretto e competitivo tra questo dominio (residui 224-236 secondo la numerazione dell'isoforma più lunga) e i MT da una parte e PP2A (Protein Phosphatase 2 A) dall'altra (Sontag E, 1999), con la conseguenza che i MT potrebbero inibire l'attività di PP2A attraverso la competizione per il legame al dominio C-terminale di tau. È stato inoltre dimostrato il legame a questo dominio dei residui 250-298 della presenilina 1 (PS1), coinvolti anche nel legame con la chinasi GSK-3 $\beta$  responsabile della fosforilazione di tau (Takashima A, 1998).

### 3.6 Le modificazioni post-trascrizionali di tau

Durante il normale sviluppo, la proteina tau è soggetta a diverse modificazioni post-trascrizionali, come fosforilazione, glicosilazione, ubiquitinazione, deaminazione, ossidazione, nitratura, cross-linking e glicazione. In condizioni patologiche queste modificazioni possono comportare l'aggregazione di tau.

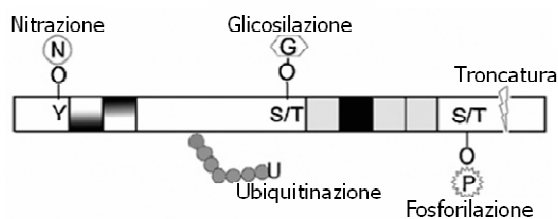


Figura 9. Schema delle modificazioni post-trascrizionali di tau. (modificata da Wang JZ, 2008 )

#### 3.6.1 Fosforilazione

La principale e più studiata modificazione di tau è la fosforilazione, che è regolata durante lo sviluppo, infatti nella vita fetale è alta e diminuisce con l'età per l'attivazione delle fosfatasi. La regolazione della fosforilazione durante lo sviluppo del Sistema Nervoso potrebbe essere importante per il controllo delle dinamiche dei microtubuli nell'allungamento e nella maturazione dei neuriti (Wang JZ, 2008). L'attività biologica della proteina è regolata dalla

sua fosforilazione: nel cervello adulto sano contiene 2-3 moli di fosfato per mole di proteina e questa sembra essere la condizione ottimale per l'interazione di tau con la tubulina ed il conseguente assemblaggio dei microtubuli (Lindwall G, 1984). La maggior parte delle proteine coinvolte nella fosforilazione di tau appartengono alle chinasi dirette da Prolina (PDPK, Proline-Directed Protein Kinases), tra le quali GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ), espressa ad alto livello nei neuroni e svolge un ruolo importante in condizioni fisiologiche e patologiche. Tra le fosfatasi coinvolte nella defosforilazione di tau sono presenti PP-1,-2A,-2B e -2C (Protein Phosphatase 1, 2A, 2B, 2C) che agiscono in diversi siti della proteina e sono anch'esse regolate durante lo sviluppo (Soulié C, 1996).

La proteina è fosforilata *in vivo* in molteplici siti (circa 79 nell'isoforma più lunga) lungo la molecola e la fosforilazione influenza negativamente la sua capacità di legare i MT, infatti nelle cellule in divisione tau ha un basso grado di fosforilazione ed è per lo più legata ai MT durante l'interfase, mentre con l'avvento della mitosi diventa altamente fosforilata, riducendo l'affinità ai MT e permettendone l'instabilità dinamica necessaria per i movimenti mitotici (Illenberger S, 1998). È interessante notare che la fosforilazione di alcuni residui all'interno del dominio MTB (v. Serina 262) abolisce completamente il legame di tau ai microtubuli, mentre all'interno della regione ricca di Proline riduce la capacità di tau di promuovere la nucleazione *de novo* dei microtubuli. Questo suggerisce che il ruolo di tau nella regolazione temporale e spaziale dell'assemblaggio dei MT viene modulata dal suo stato di fosforilazione (Shahani N, 2002).

*In vitro* tau è fosforilata da numerose Serina/Treonina chinasi, ma anche da Tirosina chinasi, tra cui Fyn (Lee G, 2001). Sembrano modulare indirettamente la fosforilazione di tau anche la prolil isomerasi Pin1 ed alterazioni del metabolismo del colesterolo, infatti l'inibizione della biosintesi del colesterolo nei neuroni in coltura causa l'iperfosforilazione di tau e la degenerazione dei neuriti (Fan QW, 2001). Vi sono anche prove che ApoE e la famiglia dei recettori LDL hanno un ruolo nel modulare la fosforilazione di tau: l'allele  $\epsilon 4$  del gene ApoE (ApoE4) è infatti un fattore di rischio per lo sviluppo dell'AD e la sua espressione aumentata nei neuroni causa l'iperfosforilazione di tau (Tesseur I, 2000). È stato dimostrato che tau è il principale substrato di Pin1 nei neuroni e che tale isomerasi svolge un ruolo essenziale nel mantenimento delle normali funzioni cellulari, provvedendo una relativa protezione contro la neurodegenerazione età-dipendente (Lu PJ, 1999). Tale enzima riconosce su tau specifici residui di Serina e Treonina fosforilati seguiti da Prolina (Thr231-Pro) e catalizza una modificazione conformazionale (cis/trans isomerizzazione), con conseguente recupero dell'abilità di legame ai microtubuli (Kosik KS, 2005), e/o ne facilita la defosforilazione da parte di PP2A (Zhou XZ, 2000).

La principale chinasi coinvolta nella fosforilazione di tau è GSK3 $\beta$ , la cui attività è regolata sia dalla sua fosforilazione (in Ser9 l'attività viene inibita, in Tyr216 aumentata) sia da interazioni proteina-proteina. È stato dimostrato che l'insulina e l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) modulano l'attività di GSK3 $\beta$ : l'attivazione prolungata di IGF-1 o recettori dell'insulina causano infatti la diminuzione della regolazione dell'attività della chinasi, diminuendo la fosforilazione di tau. L'arruolamento da parte dell'insulina e di IGF-1 dei loro rispettivi recettori provoca l'attivazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) e la successiva fosforilazione di Akt mediata da PDK1, che fosforila GSK3 $\beta$  sulla Ser9, diminuendone l'attività. Tuttavia, il trattamento con insulina può aumentare transitoriamente la fosforilazione di tau, probabilmente per un aumento dell'attivazione di Fyn e la successiva fosforilazione della tirosina di GSK3 $\beta$  che ne aumenta l'attività. Inoltre, l'aumento della fosforilazione di tau mediata da IGF-1 è direttamente correlato con una transitoria dissociazione di tau dal citoscheletro che si ridistribuisce nel cono di crescita e nel segmento distale degli assoni. Ne consegue che GSK3 $\beta$  può essere attivata transitoriamente da IGF-1 e modulare la fosforilazione e la funzione di tau nei neuroni (Lesort M, 2000).

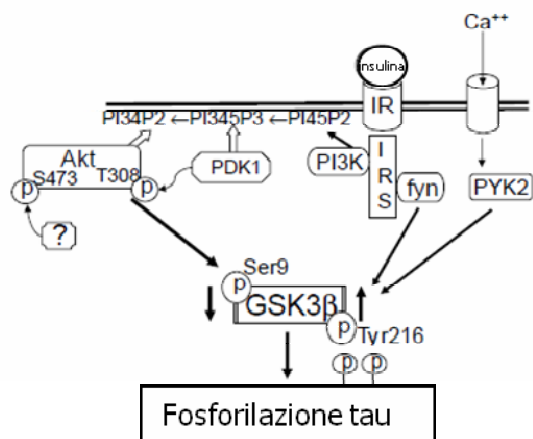


Figura 10. Regolazione dell'attività di GSK3 $\beta$  con la fosforilazione (modificata da Johnson GW, 2002)

Oltre ad essere regolata dalla fosforilazione, GSK3 $\beta$  è regolata anche da interazioni proteina-proteina, tra le quali il pathway di Wnt svolge un ruolo fondamentale. Le Wnts sono una famiglia di glicoproteine secretorie che svolgono un ruolo importante nello sviluppo embrionale e nella modulazione della sopravvivenza cellulare. Queste proteine si legano ai recettori con sette domini transmembrana (recettori frizzled) attivando un pathway che si porta ad una diminuzione nella fosforilazione, mediata da GSK3 $\beta$ , della  $\beta$ -catenina che si accumula ed agisce nel nucleo.

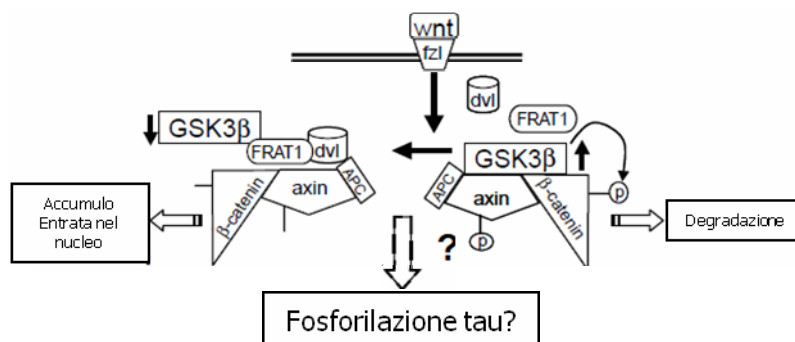


Figura 11. Regolazione dell'attività di GSK3β attraverso interazioni proteina-proteina  
(modificata da Johnson GW, 2002)

GSK3β svolge anche un ruolo importante nella catabolismo e quindi nella degradazione di tau da parte del proteosoma: la fosforilazione di tau da parte di tale chinasi ne causa infatti il legame di Hsc70 ed il reclutamento da parte della E3 ubiquitin-ligasi CHIP, con conseguente ubiquitinizzazione e degradazione (Shimura H, 2004).

La presenilina 1 (PS1) è in grado di legare direttamente GSK3β e tau, regolandone l'interazione e di conseguenza la fosforilazione di tau (Takashima A, 1998). Mutazioni di PS1 sono in grado di diminuire l'attivazione di Akt, che porterebbe alla diminuzione della fosforilazione di GSK3β in Ser9 ed il conseguente aumento della fosforilazione di tau. Questi dati indicano che ci possa essere un collegamento diretto tra la presenza di PS1 mutanti e l'iperfosforilazione di tau che si osserva per esempio nell'Alzheimer.

Per quanto riguarda le fosfatasi, solo PP1, PP2 and PP2B sono in grado di defosforilare tau iperfosforilata, ma PP2A sembra agire sulla maggior parte dei siti fosforilati (Gong CX, 2000). Dal momento che tau è una delle principali proteine citoscheletriche, la sua iperfosforilazione influenza la morfologia e le funzioni biologiche dei neuroni, infatti la fosforilazione anomala di tau è una caratteristica delle cosiddette taupatie, patologie ad esordio nell'età adulta caratterizzate dalla distruzione del citoscheletro e dalla deposizione di filamenti iperfosforilati nelle cellule neuronali e gliali con conseguente atrofia cerebrale e demenza. In alcuni esperimenti la propensione di tau ad aggregarsi è bassa, mentre in altri è elevata e ciò può essere dovuto a diverse concentrazioni proteiche o ai residui fosforilati.

Non è tuttora chiaro se l'iperfosforilazione di tau sia causa di neurotossicità: secondo i dati disponibili si ipotizza che un'iperfosforilazione transitoria possa essere neuroprotettiva, ma se prolungata possa portare all'accumulo di tau e comportare neurodegenerazione.

### 3.6.2 Glicosilazione e O-GlcNAc

La N-glicosilazione di tau avviene nella forma iperfosforilata, mentre la forma non modificata può essere O-glicosilata. È stata dimostrata un'importante relazione tra fosforilazione e O-glicosilazione di tau nel controllo della localizzazione nucleare, infatti l'iperfosforilazione



diminuisce l'incorporazione di O-GlcNAc ed il trasporto nel nucleo. La glicosilazione anomala promuove la fosforilazione di tau ed inibisce la sua defosforilazione (Liu F, 2002).

L'O-GlcNAcilazione implica l'aggiunta di uno zucchero a residui aminoacidici di Serina/Treonina e modifica sia proteine nucleari che citoplasmatiche, con una modalità dinamica analoga alla fosforilazione. Nelle taupatie, probabilmente a causa di un alterato trasporto intracellulare e/o metabolismo del glucosio, l'O-GlcNAcilazione di tau comporta un'anormale iperfosforilazione di tale proteina (Liu F, 2004).

Nelle taupatie si assiste una diminuzione del metabolismo del glucosio che comporta l'O-GlcNAcilazione di tau causando l'iperfosforilazione anomala della proteina. Questa modificazione potrebbe essere coinvolta nell'interazione con la tubulina, ma anche nella localizzazione e nella degradazione di tau.

### 3.6.3 Glicazione

Questa modificazione è anche chiamata glicosilazione non enzimatica ed è la reazione tra la parte amminica di una catena aminoacidica e la parte carbossilica del glucosio o di altri zuccheri riducenti che porta alla formazione di prodotti eterogenei chiamati AGEs (Advanced Glycation End Products) che comportano la formazione di ponti intermolecolari anomali (cross-links) tra le proteine modificate. Avviene principalmente a livello dei residui di Lisina delle proteine con basso turnover. Sono stati identificati tredici residui di Lisina come possibili siti di glicazione nell'isoforma più lunga di tau. Tra questi, le Lisine localizzate nella sequenza compresa tra i residui 318 e 336 risultano glicate e dal momento che si trovano nel dominio di legame ai microtubuli, la loro modificazione può comportare un'aumentata interazione di tau con la tubulina (Ledesma MD, 1995). La proteina tau isolata dai PHF (Paired Helical Filaments) è fortemente glicata e questo potrebbe causare la loro insolubilità e l'aggregazione in composti più complessi, come i grovigli neurofibrillari riscontrati nelle taupatie. Inoltre, è stato dimostrato che l'aggiunta di tau glicata a cellule in coltura può generare radicali liberi dell'ossigeno (ROS) in grado di interferire con la funzionalità neuronale danneggiandola (Avila J, 2004).

### 3.6.4 Ubiquitinazione

Tau normalmente si presenta come una proteina non ripiegata che viene degradata *in vitro* dal core del proteasoma (20S) che funziona indipendentemente dall'ubiquitina (David DC, 2002). L'ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi che si associa a proteine che devono essere degradate in modo ATP-dipendente per difendere la cellula dalle proteine non correttamente ripiegate. L'inibizione del proteosoma ed un parallelo aumento dello stato di fosforilazione di tau causano l'aggregazione della proteina in colture di oligodendrociti di

ratto (Goldbaum O, 2003). Tau che costituisce PFH o NFT può essere modificata con poliubiquitine in residui prossimi o all'interno della regione di legame ai microtubuli (Lisina -6, -11 e -48), ma non viene degradata dal sistema ubiquitina-proteasoma e si accumula nella cellula (Wang JZ, 2008).

#### 3.6.5 Troncatura e deamidazione

La troncatura è definita come il taglio che avviene a livello dell'Acido Glutammico in posizione 391 (Glu391) o dell'Acido Aspartico in posizione 421 (Asp421) e potrebbe facilitare l'aggregazione aberrante di tau, come anche la deamidazione a livello dei residui di Asparagina o Glutamina (Avila J, 2004).

#### 3.6.6 Ossidazione

La presenza di una o due cisteine nelle isoforme di tau che mancano dell'esone 10 hanno fatto ipotizzare che tau formi dimeri attraverso ponti disolfuro intermolecolari ed in questo caso l'ossidazione della proteina potrebbe causarne l'aggregazione. Qualora l'esone 10 fosse presente, potrebbero formarsi ponti disolfuro intramolecolari (Schweers O, 1995).

La formazione di ponti disolfuro è risultata essere il primo passaggio fondamentale nella polimerizzazione di dimeri antiparalleli di tau che si possono assemblare in PHF.

#### 3.6.7 Poliaminazione

È stato dimostrato che l'enzima tissutale transglutaminasi (TGase) è in grado di catalizzare la formazione di legami tra i residui di Glutamina e le amine primarie presenti nei residui di Lisina o in poliammine. L'enzima svolge la sua funzione anche su tau *in vitro* e *in situ*. La poliaminazione di tau non ha effetti sul legame ai microtubuli, nonostante uno dei principali residui di Gln che viene modificato dall'enzima si trova all'interno del dominio di legame ai microtubuli. Tau poliaminata è molto meno suscettibile alla degradazione da parte della proteasi calpaina attivata dal calcio (Tucholski J, 1999).

#### 3.6.8 Isomerizzazione

Dal momento che l'isomerizzazione della proteina può aumentare il processo di aggregazione, questa modificazione potrebbe contribuire alla patogenesi delle taupatie, infatti la proteina L-isoaspartil metiltransferasi (PIMT) che potrebbe essere coinvolta nella riparazione delle proteine isomerizzate colocalizza con gli NFT nel cervello AD. Questi risultati suggeriscono un possibile ruolo dell'isomerizzazione della proteina nell'anomala aggregazione di tau nell'AD (Shimizu T, 2000).

#### 3.6.9 Nitrazione

Nei cervelli dei pazienti affetti da AD è stata riscontrata un'aumentata nitrazione di tau che

avviene a livello delle Tirosine 18 e 29, 197 e 394. La proteina nitrata mostra una significativa diminuzione del legame ai microtubuli e forma aggregati nei pazienti affetti da taupatia. Questa modificazione potrebbe dipendere dall'accumulo di ossidanti e rappresentare un danno ossidativo cerebrale (Wang JZ, 2008).

### 3.7 Il ruolo patogenetico di tau

Nonostante sia stata evidenziata una chiara relazione causa-effetto tra errori nel gene *MAPT* e morte neuronale e quindi demenza, le basi molecolari che sottendono al processo patologico non sono ancora note. È stato ipotizzato che alterazioni nella quantità o nella conformazione di tau, così come altre modificazioni possano avere effetti patologici, dal momento che nelle taupatie, tra le quali la malattia di Alzheimer (AD) è la più frequente, la neurodegenerazione è associata alla presenza di tau iperfosforilata e/o aggregata in grovigli insolubili (Hernández F, 2007). Nelle cellule nervose colpite si assiste allo spostamento di tau dal compartimento assonale a quello somatodendritico dove si accumula nei "pre-tangles", aggregati filamentosi a doppia elica (PHFs, Paired Helical Filaments) che alla fine si assemblano nei grovigli neurofibrillari (NFT, NeuroFibrillary Tangles). L'aumento dell'espressione di tau e la sua iperfosforilazione inducono la frammentazione dell'apparato di Golgi sia nelle cellule neuronali in coltura che nei neuroni nei topi transgenici P301L (Liazoghli D, 2005) e l'accumulo di tau iperfosforilata e non correttamente ripiegata nel reticolo endoplasmatico potrebbe causare neurodegenerazione in seguito allo stress protratto del reticolo (Kim I, 2008). Di seguito vengono proposti i vari meccanismi che potrebbero causare l'effetto patogenetico della proteina tau.

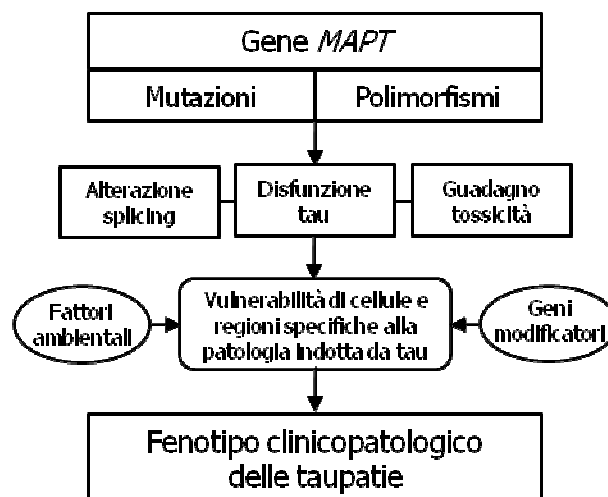


Figura 12. Possibili meccanismi patogenetici della proteina tau (modificata da Lee VMY 2001)

#### 3.7.1 Il processo di aggregazione di tau

Tale processo può essere suddiviso in più stadi sequenziali.

1. La proteina si accumula all'interno della cellula per poi associarsi attraverso le regioni di

legame ai microtubuli, formando dei filamenti arricchiti in strutture  $\beta$  a foglietto ripiegato stabilizzati in seguito all'ossidazione dei residui di Cisteina all'interno del dominio MTB.

2. Quando viene raggiunta la concentrazione critica, i monomeri di tau non ripiegati oligomerizzano transitando, attraverso profondi e lenti cambi conformazionali, in strutture a foglietto- $\beta$ . La struttura secondaria più precocemente rivelabile corrisponde agli aggregati di tau associati a strutture di membrana, evidenziando che il ripiegamento patologico di tau possa essere facilitato dall'interazione con i componenti delle membrane intracellulari.

3. A questo punto si assiste alla nucleazione dei filamenti tau, e la formazione di strutture più complesse come i grovigli neurofibrillari.

4. Si ha la completa perdita della vitalità cellulare e la formazione dei "ghost tangles", aggregati fibrillari extra-cellulari.

Tale processo di aggregazione implica la sequenziale transizione da una stadio precoce di aggregazione amorfa modulato sia dalla fosforilazione che da mutazioni geniche, seguito da uno più tardivo di fibrillazione (Chun W, 2007).

### 3.7.2 L'aumento di tau

Un modello che può spiegare il meccanismo alla base del ruolo patogenetico di tau può essere denominato "effetto-dosaggio" e prevede che l'attività della proteina oscilli in un intervallo che deve essere controllato da meccanismi omeostatici, al fine di garantire la sopravvivenza neuronale.

Un aumento della proteina potrebbe inibire il trasporto di vescicole, neurofilamenti ed organelli nei neuroni (Stamer K, 2002) e di conseguenza compromettere il trasporto assonale mediato dai microtubuli, infatti l'aumento dell'espressione di tau 4R wild-type nei neuroni di topi transgenici causa un eccessivo legame di tau ai microtubuli comportando il blocco del trasporto assonale bidirezionale e conseguente assonopatia, grave degenerazione e difetti motori (Spittaels K, 1999).

Alterazioni nella quantità o nella struttura di tau possono anche compromettere il suo ruolo nella stabilizzazione dei MT che a sua volta può influire sulla localizzazione ed organizzazione di altre strutture subcellulari, quali mitocondri o lisosomi (Nangaku M, 1994; Collot M, 1984).

I meccanismi per i quali l'aumentata espressione di tau 4R comporta neurodegenerazione non sono ancora stati identificati, ma è stato ipotizzato che questo aumento saturi i siti di legame ai microtubuli e che la rimanente tau 4R solubile in eccesso sia più suscettibile alla fosforilazione e all'aggregazione in filamenti insolubili (Goedert M, 2005).

Nel caso in cui le mutazioni nel gene *MAPT* aumentino la produzione di tau 3R, un minor legame ai MT potrebbe aumentare le concentrazioni citosoliche di tau favorendone l'auto-associazione. Altre mutazioni missenso diminuiscono apparentemente l'abilità di tau di

favorire l'assemblaggio dei MT e cadono principalmente all'interno e nelle vicinanze dei domini di legame alla tubulina (Hong M, 1998). Le mutazioni S305N e Q336R rappresentano due eccezioni, dal momento che aumentano l'assemblaggio dei MT.

Inoltre, dato che tau è un inibitore dell'istone deacetilasi 6 (HDAC6) che regola l'acetilazione della tubulina, un eccesso di tau potrebbe favorire il mantenimento dell'acetilazione della tubulina che faciliterebbe il trasporto assonale, ma potrebbe anche competere con la chinesina per il legame ai microtubuli.

Mutazioni geniche e/o cause di tipo ambientale che spostano l'attività di tau al di sopra o al di sotto del livello fisiologico, causano la disfunzione della proteina tau che perde la capacità di regolare l'instabilità dinamica dei microtubuli citoscheletrici comportando a lungo andare morte neuronale. Questa ipotesi implica che gli aggregati neurofibrillari non siano la causa della morte neuronale che avviene nelle taupatie.

### 3.7.3 I cambiamenti conformazionali e le modificazioni post-trascrizionali di tau

La tossicità di tau per i neuroni è stata correlata anche con cambiamenti conformazionali della proteina che potrebbero provocare l'aggregazione della proteina troncata, anche se questa ipotesi necessita di conferme, dal momento che i neuroni umani possono vivere per decenni pur contenendo i grovigli neurofibrillari (Zilka N, 2009).

I fosfolipidi, tra i quali l'acido arachidonico, sono in grado di indurre cambiamenti conformazionali della proteina che potrebbero facilitarne la fosforilazione ed aumentare la formazione di filamenti diritti. I cambiamenti conformazionali inoltre potrebbero rendere i filamenti resistenti alla proteolisi, dal momento che i potenziali siti di legame alle proteasi vengono nascosti all'interno dei filamenti diventando inaccessibili, così che possano accumularsi (Yang LS, 1997).

La proteina tau isolata dai grovigli neurofibrillari è ampiamente modificata a livello post-trascrizionale da fosforilazione, glicazione, racemizzazione e ubiquitinazione. Alcune delle modificazioni, come fosforilazione, troncatura e glicosilazione, sembrano verificarsi in una fase precoce delle taupatie, mentre ubiquitinazione e glicazione essere eventi tardivi nella neurodegenerazione. In ogni caso, l'iperfosforilazione sembra essere la modificazione maggiormente coinvolta nella patogenicità della proteina.

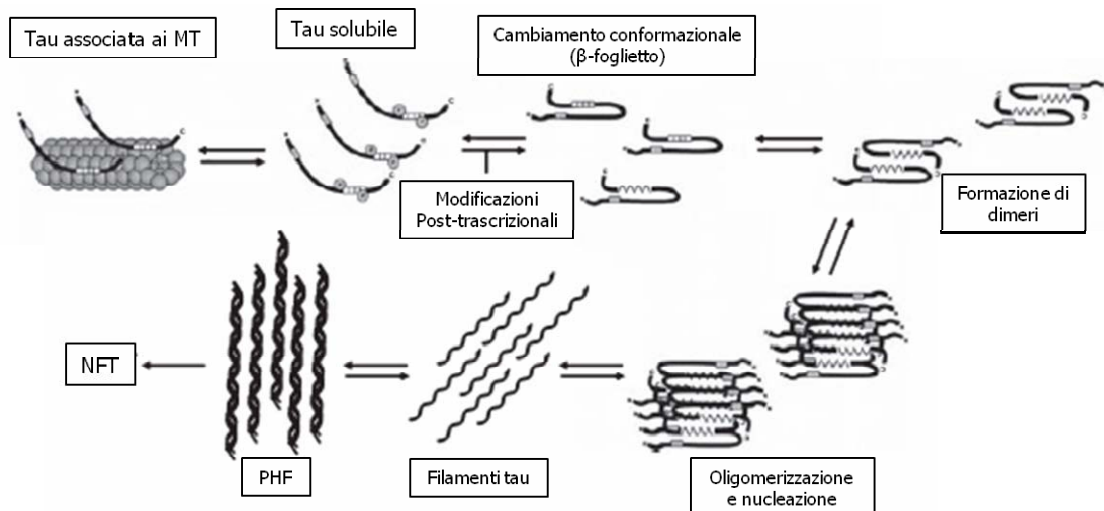


Figura 13. Rappresentazione dell'aggregazione di tau e della formazione di grovigli neurofibrillari (NFT) in seguito a cambiamenti conformazionali della proteina (modificata da Meraz-Rios RA, 2010)

### 3.7.4 L'iperfosforilazione

Rappresenta la causa più confermata e più interessante di disfunzione della proteina tau che si osserva nell'Alzheimer e nelle taupatie. L'iperfosforilazione di tau non è solo associata a patologie, ma è anche utilizzata dal neurone per diminuire transitoriamente e reversibilmente la sua attività, come avviene durante lo sviluppo. È la natura non reversibile dell'iperfosforilazione anomala nelle taupatie che comporta un involontario rallentamento dell'attività neuronale e la conseguente neurodegenerazione cronica progressiva accompagnata dal fenotipo clinico della demenza (Iqbal K, 2009). La tau che è presente nei PHFs e nei filamenti diritti è in uno stato iperfosforilato e quindi il rapporto tra fosforilazione di tau e la formazione di filamenti è di notevole interesse. La fosforilazione in siti Ser/Thr-Pro al di fuori dei domini di legame ai microtubuli ha scarso effetto sulla formazione dei filamenti, tuttavia la fosforilazione dei motivi KXGS all'interno del dominio inibisce significativamente la formazione di filamenti tau (Schneider A, 1999), indicando che l'iperfosforilazione di tau potrebbe non contribuire alla formazione di filamenti in AD o nelle taupatie. Al contrario, la pseudofosforilazione in Ser396/404 per una mutazione Ser→Glu aumenta in modo significativo la formazione di filamenti tau *in vitro*, come anche la rimozione di parte del C-terminale. Questi dati indicano che il C-terminale inibisca l'assemblaggio dei filamenti e la sua rimozione (per proteolisi) o fosforilazione in siti specifici (come Ser396/404) possa diminuire questa inibizione e permettere a tau di polimerizzare più facilmente (Abraha A, 2000). Nel loro insieme questi dati suggeriscono che la fosforilazione sito-specifica, ma non l'iperfosforilazione possa facilitare il processo di formazione dei filamenti.

L'iperfosforilazione sembra essere una modifica precoce nella cascata patologica, dovuta sia ad un aumento dell'attività chinasi o ad una diminuzione dell'attività fosfatasi

(Trojanowski JQ, 1995), oppure all'aggregazione nei filamenti. La proteina aggregata è infatti pressoché incapace di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli *in vitro* e la loro stabilizzazione: i MT assonali, di conseguenza, risultano destabilizzati e depolimerizzano, incidendo gravemente sul veloce trasporto assonale che avviene principalmente su di essi e inducendo la degenerazione dei neuroni. Un presupposto fondamentale in questa ipotesi è che i neuroni dipendano da tau per la stabilizzazione del loro assetto di microtubuli assonali, tuttavia, la rilevanza patologica di questa possibile perdita di funzione non sembra confermata da esperimenti in cui la proteina o il gene vengono inattivati nelle cellule e nei modelli animali. Come menzionato in precedenza, topi knockout sono infatti relativamente normali e non mostrano gravi anomalie citoscheletriche (Teng J, 2001) e l'immunodeplezione di tau assonale nei neuroni coltivati non influisce sulla crescita assonale o sulla distribuzione e sulla stabilità dei microtubuli assonali (Tint I, 1998). Inoltre, l'analisi della distribuzione di tau nei neuroni in coltura ha dimostrato che la proteina è localizzata principalmente nella regione distale dell'assone, nota per essere più dinamica e meno stabile, al contrario dalla distribuzione attesa di un agente stabilizzante i MT (Black MM, 1996). L'iperfosforilazione di tau può avere invece un ruolo più indiretto durante la patologia, aumentando la quantità di proteina tau libera per la successiva formazione di aggregati nei neuroni. In accordo con questa ipotesi, è stato dimostrato che tau iperfosforilata isolata dal citosol di cervello affetto da AD è in grado di aggregarsi in PHF e SF (Straight Filaments, filamenti dritti), capacità che perde in caso di defosforilazione (Alonso A, 2001). Inoltre, in *Drosophila* l'aumento dell'espressione di tau 4R e la fosforilazione dell'omologo della GSK3 $\beta$  Shaggy peggiora la neurodegenerazione indotta da tau, causando la formazione di aggregati filamentosi NFT-like, confermando *in vivo* la correlazione tra iperfosforilazione di tau e patologia neurofibrillare.



Figura 14. Possibili meccanismi d'azione coinvolti nell'aggregazione di tau mediata dalla fosforilazione (modificata da Johnson GWV,2002)

Tuttavia, altri studi indicano che la fosforilazione di tau non aumenta o addirittura riduce la formazione di filamenti *in vitro*, infatti inducendo l'iperfosforilazione di tau tramite mutagenesi sito-diretta, la proteina mostra ridotta formazione di filamenti rispetto alla forma wild-type (Eidenmüller J, 2000). Inoltre, topi doppi transgenici che esprimono GSK3 $\beta$  in eccesso e tau 4R mostrano una minore patologia assonale rispetto a topi che esprimono in eccesso unicamente tau 4R (Spittaels K, 2000) e in *Drosophila* l'aumentata espressione di tau senza la sua fosforilazione induce neurodegenerazione senza la formazione di NFT. Ciò suggerisce che un aumento della proteina tau e non l'iperfosforilazione sia responsabile del fenotipo neuropatologico in questi modelli animali in cui non si osserva la formazione di filamenti, pertanto la neurotossicità dipenderebbe da alterazioni della proteina che si verificano prima della formazione di aggregati. Questi dati suggeriscono che in determinate condizioni la proteina solubile svolga un'azione neurotossica nel cervello.

Un'ulteriore ipotesi è infatti che l'iperfosforilazione di tau possa rappresentare di per sé un insulto tossico per i neuroni, indipendentemente dalla formazione di filamenti. È interessante notare che tau pseudoiperfosforilata esercita un effetto neurotossico nelle cellule neurali, associato all'induzione dell'apoptosi (Fath T, 2002). Questi dati forniscono la prova di un "guadagno neurotossico di funzione" della proteina solubile come risultato di cambiamenti strutturali indotti dalla fosforilazione indipendentemente dall'aggregazione di tau tanto che la formazione di grovigli possa essere considerato un meccanismo di difesa per ridurre la quantità di tau libera nella cellula.

La proteina nella forma fosforilata sarebbe in grado di sequestrare altre MAP cerebrali, causando la disorganizzazione dei MT, il blocco del "trafficking" intracellulare, la promozione del rientro nel ciclo cellulare, l'inibizione delle proteasi e la formazione dei filamenti che nel loro insieme potrebbero risultare tossici per i neuroni (Alonso AD, 1997). È stato infatti dimostrato in un modello di *Drosophila* che la proteina fosforilata risulta tossica per i neuroni (Feuillet S, 2010) e l'inibizione dell'attività della chinasi GSK3 $\beta$  riduce la neurodegenerazione *in vivo* (Noble W, 2005).



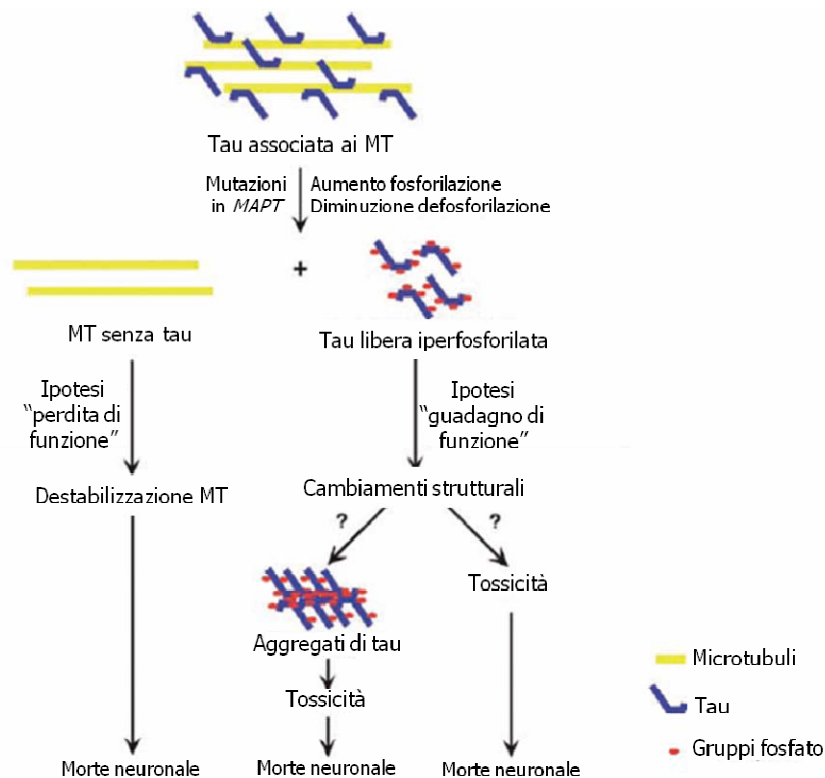


Figura 15. Possibili ipotesi del ruolo patogenetico di tau (modificata da Shahani N, 2002)

L'aumento della fosforilazione di tau inoltre sopprime completamente l'interazione di tau con la membrana plasmatica, contribuendo al distacco di tau dai microtubuli assionali e aumentando l'accumulo della proteina nel corpo cellulare (Shahani N, 2002).

Anche l'aumento dell'espressione di GSK3 $\beta$  si traduce in un aumento della fosforilazione di tau e nella neurodegenerazione in topi transgenici condizionali (Lucas JJ, 2001), mentre in colture primarie di neuroni inibisce il potenziamento a lungo termine con conseguente danneggiamento sinaptico (Zhu LQ, 2007).

È stato suggerito che anche un'aumentata attivazione di cdk5 possa contribuire alla fosforilazione aberrante della proteina tau nel cervello AD dal momento che vi è colocalizzazione di p25 (attivatore di cdk5) e NFT, e l'espressione di cdk5/p25 in neuroni corticali in coltura causa iperfosforilazione di tau, rotture del citoscheletro ed apoptosi (Patrick GN, 1999).

Lo stato di iperfosforilazione potrebbe essere mantenuto anche dal non corretto funzionamento di fosfatasi come PP2A a causa della diminuzione del loro legame a tau dovuto a mutazioni come avviene nella demenza frontotemporale o per cambiamenti conformazionali causati dall'iperfosforilazione stessa. Va ricordato che anche la proteina fetale è iperfosforilata e condivide i siti di fosforilazione osservati nelle proteine coinvolte nelle taupatie, ma non mostra difetti nella sua attività biologica e non è propensa a formare aggregati, pertanto rimane da determinare quali meccanismi siano coinvolti nella ri-

iperfosforilazione della forma adulta, nella perdita di funzione e nella formazione di aggregati insolubili (Wang JZ, 2008).

### 3.7.5 La formazione di aggregati patologici

Un'altra ipotesi sul ruolo patogenetico di tau è che la formazione di grandi aggregati intraneuronali agisca sia come barriera fisica per il trasporto assonale di proteine neurotrofiche ed altre funzioni essenziali o abbia effetti tossici diretti sulle cellule. In questo modo l'aggregazione di tau può rappresentare un "guadagno di funzione tossico" durante la malattia. A sostegno di questa tesi, l'aumento dell'espressione da cinque a dieci volte della proteina tau in animali transgenici porta alla formazione di inclusioni contenenti tau nei neuroni corticali, nel tronco encefalico e nel midollo osseo, associata a degenerazione assonale (Ishihara T, 1999). Nel cervello dei pazienti affetti da AD o da altre taupatie, la proteina tau iperfosforilata si aggrega in filamenti di calibro variabile tra 2.1 nm fino a 15 nm, indicando che alcuni eventi specifici di fosforilazione possano aumentare la tendenza alla formazione di aggregati (Iqbal K, 2005). La capacità di formare filamenti è una caratteristica di tutte le isoforme di tau nel cervello umano ed anche la tau murina è in grado di aggregarsi in un modo quasi identico a quello umano, indicando che non c'è specificità di specie per la formazione di filamenti tau (Kampers T, 1999). Il core dei PHF osservati nel cervello di pazienti affetti da Alzheimer è composto prevalentemente della regione di legame ai microtubuli e diversi studi *in vitro* hanno dimostrato che almeno un terzo di questa regione è essenziale per la formazione dei filamenti (Johnson GVW, 2002).

La struttura a foglietti  $\beta$  è presente unicamente nelle ripetizioni R2 e R3 che possono auto-assemblarsi in filamenti, mentre l'N- ed il C-terminale fiancheggiando le regioni di legame ai microtubuli sembrano inibire la formazione di filamenti (von Bergen M, 2000).

La formazione di inclusioni sembra dipendere dalla concentrazione di tau, perché l'espressione di bassi livelli di proteina (meno del doppio rispetto alla concentrazione di tau endogena) non causa la formazione di aggregati nei topi transgenici. Inoltre, modelli animali transgenici per mutazioni che causano taupatie come la demenza frontotemporale, mostrano caratteristiche tipiche delle malattie umane, compresi lo sviluppo di grovigli neurofibrillari e la degenerazione assonale (Götz J, 2001) ed il numero di NFT è strettamente correlato con il grado di demenza. È stata infatti osservata una correlazione inversa nelle regioni danneggiate tra il numero di grovigli neurofibrillari extracellulari ed il numero di cellule vive (Cras P, 1995): ciò suggerisce che i neuroni contenenti NFT possano degenerare e rilasciare questi grovigli intracellulari nell'ambiente extracellulare dove potrebbero risultare tossici per i neuroni circostanti (Gómez-Ramos A, 2006). I neuroni potrebbero infatti perdere i loro contatti sinaptici e, dopo un periodo di sopravvivenza, morire rilasciando per lisi cellulare tau

nello spazio extracellulare dove potrebbe legarsi a molecole come sGAG (sulfoglicosaminoglicani) che ne promuoverebbero la polimerizzazione e, dopo glicazione, aggregarsi in NFT.

La presenza della proteina nello spazio extracellulare tuttavia potrebbe essere dovuta ad esocitosi come avviene per la proteina prionica, infatti è stato recentemente descritto il trasferimento intraneuronale di tau, suggerendo che la regione N-terminale sia necessaria per la secrezione della proteina (Kim W, 2010).

È stato dimostrato che gli aggregati di tau possono entrare in cellule di origine neuronale inducendo l'aggregazione della proteina intracellulare, ma non è noto il meccanismo alla base dell'entrata nella cellula (Frost B, 2009). In uno studio *in vivo*, l'iniezione di un estratto cerebrale contenente la proteina aggregata ha provocato la trasmissione e la propagazione della patologia in topi transgenici che esprimono in eccesso tau umana con la mutazione P301S riscontrata in pazienti con demenza frontotemporale. Tuttavia, poco è noto sul possibile meccanismo alla base del passaggio di tau da cellula a cellula (Clavaguera F, 2009).

### 3.7.6 Tau e l'apoptosi

C'è una crescente evidenza che nel cervello AD si verificano dei processi apoptotici, tuttavia il loro contributo alla disfunzione/degenerazione neuronale rimane controverso. È stato dimostrato che all'inizio del processo apoptotico, la fosforilazione di tau è significativamente, ma transitoriamente, aumentata in numerosi epitopi, danneggiando notevolmente la sua capacità di legarsi ai microtubuli, mentre nelle fasi finali dell'apoptosi tau è defosforilata e degradata, probabilmente per l'attivazione delle caspasi esecutrici, come la caspasi-3 che può tagliare tau a livello della sequenza DMVD<sup>421</sup> (numerazione in base all'isoforma più lunga del cervello umano) e la successiva attivazione di altre proteasi, come la calpaina che può ulteriormente degradare tau. Oltre che nelle cellule neuronali, si verifica un aumento della fosforilazione di tau anche negli astrociti fetali umani apoptotici (Ksiezak-Reding H, 2000). Nonostante sia stato dimostrato in modelli cellulari che la fosforilazione di tau aumenta nei processi apoptotici, altri esperimenti suggeriscono che non vi è associazione tra marcatori di apoptosi e la fosforilazione aberrante di tau in modelli animali e in patologie neurodegenerative umane (Neystat M, 2001).

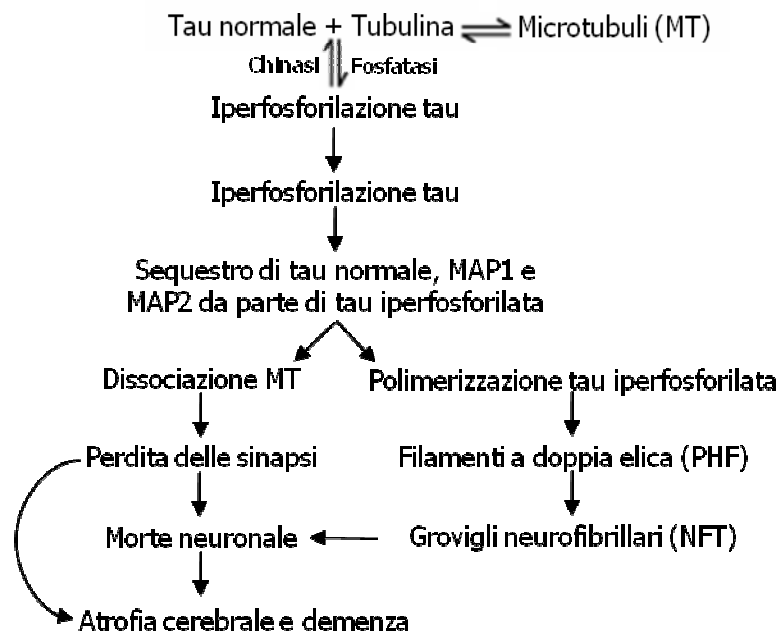


Figura 16. Meccanismi di degenerazione neurofibrillare indotta da tau (modificata da Iqbal K, 2005)

#### 4. IL GENE *MAPT*

La proteina tau è codificata dal gene *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau; MIM #157140), localizzato in posizione 17q21.2 e descritto nel 1998 come causa di demenza frontotemporale (FTD) familiare (Hutton M, 1998). Il gene occupa più di 100 kb e consiste di un esone non codificante 0 seguito da almeno 15 esoni codificanti totalmente o parzialmente.

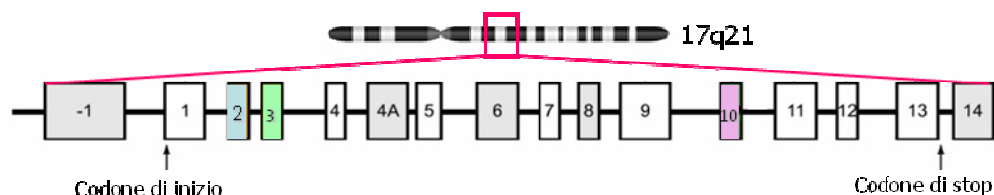


Figura 17. Posizione del gene *MAPT* e struttura genomica (modificata da Zhou J, 2007)

Il gene contiene due isole CpG, una nell'eson 9 ed una associata alla regione del promotore simile a quella presente nei promotori specifici per i neuroni e due regioni omologhe alle sequenze murine Alu. Il promotore presenta inoltre una struttura TATA-less, correlata alla presenza di siti multipli di inizio della trascrizione, tipica dei geni housekeeping che sono caratterizzati da multipli siti di inizio della trascrizione. In prossimità del primo sito di inizio della trascrizione, sono presenti infine siti consensus per i fattori SP1 e AP2, responsabili dell'inizio della trascrizione in promotori privi di sequenza TATA (Shahani N, 2002)

Dei 16 esoni che contiene il gene, tre (esoni 4A, 6 e 8) non sono mai presenti negli mRNA del cervello umano, ma sono specifici della forma periferica della proteina, mentre l'introne

13 è sempre mantenuto nell'mRNA. L'esone -1 fa parte del promotore, è trascritto, ma non tradotto, gli esoni 6 e 8 sono poco espressi, mentre gli esoni 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 e 13 sono costitutivi. L'esone 14 si trova nell'mRNA, ma non è tradotto nella proteina, gli esoni 2, 3 e 10 sono soggetti a splicing alternativo e sono specifici del cervello adulto, l'esone 2 può essere presente da solo, mentre l'esone 3 non appare mai indipendentemente dall'esone 2. Il gene è quindi trascritto in RNA nucleare che, sottoposto a splicing alternativo, porta alla formazione sei possibili combinazioni di mRNA (2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+), che una volta tradotti producono le diverse isoforme proteiche. (Goedert M, 1989). Le isoforme di tau presentano moduli aminoacidici diversi che ne influenzano la funzione biologica: gli esoni 2 e 3 modulano l'interazione con la membrana (Brandt R, 1995), l'esone 4a altera la spaziatura tra i microtubuli (Chen J, 1992), l'esone 6 codifica per un dominio ricco in Proline ed influenza l'allungamento neuritico (Luo MH, 2004), l'esone 10 aumenta l'affinità di tau per i microtubuli (Mandelkow EM, 1995) ed è importante nella transizione dal più instabile citoscheletro fetale a quello più rigido tipico dell'adulto.

Nel sistema nervoso periferico (PNS) è espressa un'isoforma ad alto peso molecolare contenente l'esone 4A che è nota come "big tau" e pesa circa 100 kDa (Goedert M, 1992).

#### 4.1 Gli aplotipi

Sono stati identificati due aplotipi del gene che codifica per la proteina tau, H1 e H2, comprendenti otto polimorfismi a singolo nucleotide. H1 è il più frequente ed è un fattore di rischio per patologie neurodegenerative come la paralisi progressiva sopranucleare (PSP) e la degenerazione corticobasale (CBD). Inoltre è stata identificata nell'introne 9 una ripetizione dinucleotidica TG polimorfica (Baker M, 1999), denominata allele tau A0 quando caratterizzata da 11 ripetizioni. È stata riscontrata una frequenza elevata di soggetti con questo allele in omozigosi nei pazienti affetti da PSP (95.5%), rispetto ai controlli (57.4%) e ai pazienti affetti da Alzheimer (49.7%). Anche se il meccanismo di suscettibilità alla malattia associato all'aplotipo H1 rimane sconosciuto, è stato suggerito che, considerando che la regione del promotore H1 sembra essere più efficiente di H2 a livello trascrizionale, livelli elevati di proteina tau possano essere la base per il fattore di rischio associato all'aplotipo tau. (Conrad C, 1997).

L'aplotipo H2 è presente solo nella popolazione caucasica, è associato ad un'inversione di circa 900 kb che include l'intero gene *MAPT*, è caratterizzato da una delezione di 238 coppie di basi tra gli esoni 9 e 10 e la sua frequenza è diminuita nei casi di PSP e CBD.

#### 4.2 Lo splicing alternativo

Nel cervello umano adulto, lo splicing alternativo degli esoni 2, 3 e 10 porta alla formazione

di sei isoforme proteiche che contengono rispettivamente 0, 1 o 2 inserti amino-terminali e 3 o 4 ripetizioni per il legame ai MT (0N/3R, 0N/4R, 1N/3N, 1N/4R, 2N/3R, 2N/4R).

Lo splicing alternativo dell'esone 10 produce isoforme contenenti l'esone (4R) o non (3R). Il rapporto tra le isoforme 4R/3R nel cervello adulto normale è circa 1:1 ed una sua alterazione è coinvolta in patologie neurodegenerative (D'Souza I, 2005), pertanto lo splicing alternativo è fondamentale per le fisiologiche funzioni neuronali.

Lo splicing dell'esone 10 è regolato dalla sequenza del gene e dagli introni fiancheggianti (Donahue CP, 2006), nonché da proteine regolatorie dello splicing (SRP). Tra queste, hnRNPE2 (Broderick J, 2004) e Tra2b (Jiang Z, 2003) si legano all'elemento enhancer ricco di purine nell'esone 10, stimolando l'inclusione dell'esone 10, mentre SRp54, un fattore che agisce in *trans*, reprime lo splicing dell'esone 10 facendolo escludere (Wu JY, 2006). L'attività di questi fattori è regolata dalla fosforilazione, infatti molte proteine chinasi incidono sullo splicing. Per esempio, l'aumentata espressione della chinasi cdc2-like reprime l'inclusione dell'esone 10 (Hartmann AM, 2001), mentre l'inibizione dell'attività di GSK3 $\beta$  aumenta lo splicing (Hernández F, 2004).

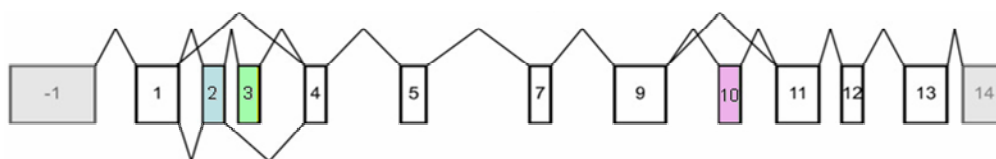


Figura 18. Splicing alternativo del gene *MAPT* (modificata da Zhou J, 2007)

#### 4.3 La Saithoina

L'intera struttura di esoni ed introni che costituiscono tau sono stati descritti inizialmente per il gene bovino (Himmler A, 1989). Recentemente è stato scoperto che all'interno dell'introne 9 del gene umano esiste una regione che si comporta come un esone, portando all'espressione di una proteina che prende il nome di *saithoina*, come mostrato in figura 19. Non si conosce molto di questa proteina, anche se è stato ipotizzato che un polimorfismo che comporta la sostituzione aminoacidica Q7R (Gln7Arg) sia correlato ad una maggiore suscettibilità all'Alzheimer (Conrad C, 2002). Nonostante questa associazione non sia stata confermata in uno studio successivo sull'Alzheimer ad esordio tardivo, è stata osservata una correlazione tra il genotipo QQ e la demenza frontotemporale (Verpillat P, 2002).

La saithoina non è stata ancora isolata e caratterizzata, tuttavia dall'analisi della sua sequenza sembra presentare somiglianze con alcune proteine che legano gli acidi nucleici (Conrad C, 2002). Inoltre non è noto se la proteina sia espressa unicamente in cellule umane o anche in altri organismi.

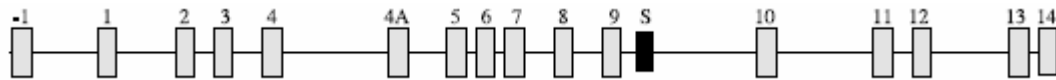


Figura 19. Struttura esonica ed intronica del gene *MAPT* (modificata da Avila J, 2004)

#### 4.4 Le mutazioni

Ad oggi sono state descritte 71 mutazioni in *MAPT*, riscontrate in 132 famiglie e raccolte nel database [www.molgen.ua.ac.be/FTDmutation](http://www.molgen.ua.ac.be/FTDmutation), che contiene 26 mutazioni non patogenetiche, 44 patogenetiche ed una il cui effetto non è chiaro.

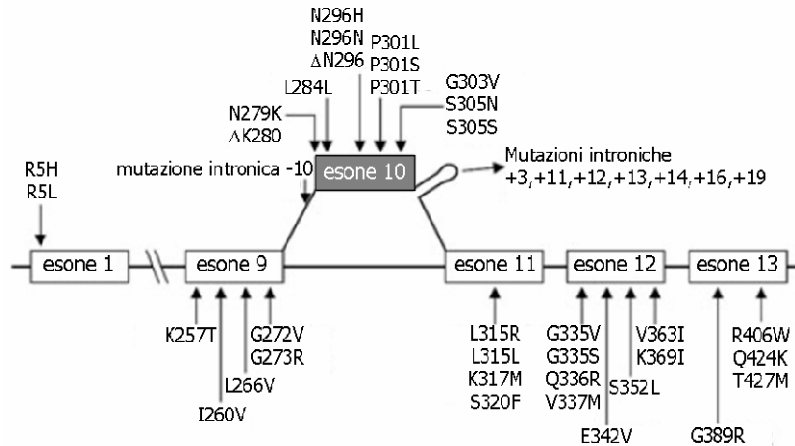


Figura 20. Mutazioni in *MAPT* causa di demenza frontotemporale (modificata da van Swieten J, 2007)

Come è possibile osservare nella figura, la maggior parte di queste mutazioni cade nella regione codificante del gene e comprende mutazioni missenso, silenti e delezioni, mentre le altre cadono nella regione adiacente al sito donatore di splicing dell'introne che segue l'esone 10 (Rademakers R, 2004).

Le mutazioni sono principalmente clusterizzate all'interno del dominio di legame ai microtubuli (esoni 9-12) o nelle sue vicinanze (esone 13), ma ne sono state identificate due anche nell'esone 1 (Rademakers R, 2002). Le mutazioni negli esoni 1, 9, 12 e 13 influiscono su tutte le sei isoforme di tau, mentre quelle nell'esone 10 solo sulle isoforme a quattro ripetizioni o sulla loro espressione. Alcune mutazioni provocano patologie sia neuronali che gliali, mentre altre strettamente neuronali.

Le mutazioni più frequenti sono le sostituzioni C-T nell'esone 10 (P301L), e nell'introne 10 (IVS10+16), quasi tutte sono eterozigoti e segregano come mutazioni dominanti all'interno delle famiglie.

Le mutazioni sono state classificate in base al tipo, alla posizione all'interno del gene e all'effetto sulla funzione e svolgono il loro effetto patologico influenzando la biologia di tau in tre diversi modi. Tuttavia, solo poche mutazioni agiscono attraverso un unico meccanismo e molte condividono diverse modalità d'azione. Il meccanismo principale sembra essere

predittivo del tipo di patologia che si svilupperà nel cervello, almeno per quanto riguarda la composizione in isoforme dei depositi tau.

#### 4.4.1. Mutazioni che alterano l'interazione tau-MT

In accordo con la loro localizzazione all'interno del dominio di legame ai microtubuli, la maggior parte delle mutazioni missenso diminuisce l'affinità di tau per i MT con la conseguente diminuzione del loro assemblaggio e della loro stabilizzazione. Questo meccanismo vale per le mutazioni che cadono negli esoni 1, 9, 11, 12 e 13, ma anche per le mutazioni P301L e P301S dell'esone 10. La mutazione Q336R nell'esone 12 svolge un effetto contrario, in quanto aumenta leggermente la capacità di tau di promuovere l'assemblaggio dei MT.

L'effetto di queste mutazioni potrebbe essere mediato da un cambiamento conformazionale nella regione N-terminale che comporta alterazioni nel "trafficking" e/o nella compartimentalizzazione di tau e come conseguenza nell'interazione e nella regolazione dei MT. Questi cambiamenti funzionali potrebbero essere causati anche dall'introduzione o dalla rimozione di siti di fosforilazione come avviene per le mutazioni K257T, P301S e S320F. Diverse mutazioni che alterano l'interazione tau-MT hanno anche effetti pro-fibrillogenici, infatti la riduzione del legame ai MT aumenta nel neurone la quantità di tau libera che di conseguenza può formare gli aggregati patologici (Rizzu P, 2000). Anche le mutazioni missenso nel C-terminale, come V337M (Tanemura K, 2002), K369I (Neumann N, 2001), G389R (Murrell JR, 1999) e R406W (Perez M, 2000) danneggiano il legame di tau ai MT e la sua capacità di promuoverne l'assemblaggio.

#### 4.4.2. Mutazioni che alterano lo splicing dell'mRNA

Tutte le mutazioni introniche e alcune esoniche, per lo più silenti, influenzano lo splicing dell'esone 10, alterando il rapporto tra le isoforme a tre e a quattro ripetizioni (Rademakers R, 2004) mediante la modificazione della struttura secondaria del sito di splicing dell'mRNA (stem-loop) e le sequenze regolatorie (l'enhancer ricco di purine e il soppressore di splicing). L'analisi della struttura secondaria ha infatti predetto la presenza di una struttura ad ansa-uncino (stem-loop) stabile al confine tra l'esone 10 e l'introne che lo segue. Si ipotizza che tale loop mascheri il sito di riconoscimento di splicing, permettendo che l'esone 10 venga escisso dall'mRNA maturo. Sebbene i meccanismi non siano stati completamente chiariti, mutazioni che diminuiscono la stabilità di questa struttura comportano un'aumentata incorporazione dell'esone 10 nell'mRNA maturo, con un conseguente aumento di trascritti che codificano per isoforme di tau 4R.



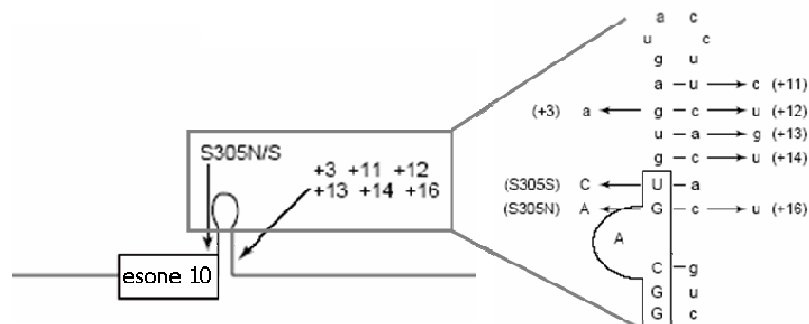


Figura 21. Particolare delle mutazioni esoniche ed introniche nella struttura a stem-loop che regola lo splicing dell'esone 10 (modificata da Ingram EM, 2002)

La maggioranza di queste mutazioni si verificano vicino al sito di splicing al 5' nell'introne che segue l'esone 10, all'interno della struttura a loop proposta. Tutte queste mutazioni comportano un aumento del rapporto 4R/3R (Johnson GVW, 2002).

Lo stesso vale per alcune mutazioni esoniche, quali N279K, G303V, S305N, L284L, N296N, N296H e S305S. Al contrario, le mutazioni +19 e le due mutazioni all'interno dell'esone 10 N279K e  $\Delta$ K280 diminuiscono lo splicing dell'esone 10 aumentando l'espressione di tau 3R e riducendo la capacità di tau di promuovere l'assemblaggio dei microtubuli (Hasegawa M, 1998). La mutazione  $\Delta$ N296 invece può portare sia un aumento dello splicing (Yoshida H, 2002) o mantenerlo inalterato (Grover A, 2002).

La mutazione silente S305S sembra indebolire il loop (Wszolek ZK, 2001), mentre la S305N crea un sito simile a un sito donatore di splicing ed entrambe aumentano l'espressione dell'isoforma 4R (D'Souza I, 1999).

Tutte le mutazioni introniche analizzate fino ad oggi influenzano la stabilità termodinamica di questa struttura rompendola. La mutazione S305N cambia l'ultimo aminoacido dell'esone 10 diminuendo la stabilità termodinamica dello stem-loop e, in modo simile alla mutazione intronica +3, aumenta il legame dell'snRNP U1 al sito di splicing in 5', aumentando lo splicing dell'esone 10. Al contrario, la mutazione silente S305S distrugge lo stem-loop senza alterare il legame dell'snRNP U1.

Un meccanismo alternativo si basa sull'interruzione delle sequenze regolatorie dello splicing. Diverse mutazioni nella regione codificante di *MAPT*, quali N279K, L284L, N296N e S305N perturbano infatti le sequenze regolatorie, portando allo "splicing-in" dell'esone 10 e la conseguente produzione eccessiva di tau 4R (D'Souza I, 2002). È stata anche identificata una serie di elementi locali enhancer o inibitori di splicing che modulano i siti di splicing 5' e 3' dell'esone 10. Le mutazioni N279K e L284L rafforzano un elemento enhancer ricco di purine che si trova nella regione 5' dell'esone 10, con conseguente aumento dei livelli di mRNA contenente l'esone 10 e di tau solubile 4R (D'Souza I, 2002). Lo stesso meccanismo

vale per una mutazione in posizione -10 dell'introne che precede l'esone 10 (Malkani R, 2006). La mutazione  $\Delta 280K$  causa la perdita della sequenza enhancer, diminuendo non solo l'inclusione dell'esone 10, ma anche l'assemblaggio dei microtubuli (Jiang Z, 2003), nonostante dovrebbero essere espresse meno isoforme 4R contenenti questa mutazione.

Le mutazioni silenti L284L e N296N comportano l'aumento dei livelli di trascritti contenenti l'esone 10 e l'espressione di tau 4R, mediante la distruzione di un inibitore di splicing (Spillantini MG, 2000) o la creazione di un enhancer (Grover A, 2002). Al contrario, è stato riportato che la mutazione +19 aumenta lo "splicing-out" dell'esone 10 alterando una sequenza inibitoria accanto alla sequenza enhancer (Stanford PM, 2003). La maggior parte delle mutazioni silenti aumentano il rapporto 4R/3R modulando lo splicing alternativo dell'esone 10.

#### 4.4.3 Mutazioni che promuovono la formazione di filamenti tau

Diverse mutazioni missenso localizzate nell'esone 10 esercitano potenzialmente i loro effetti sia a livello proteico che di RNA. Queste mutazioni cadono preferibilmente nella regione di legame ai MT (esone 10) e ciò può diminuire il legame di tau mutata ai MT (Hong M, 1998), influire sul legame di tau ad altre proteine (Goedert M, 2000) e compromettere la capacità di tau di regolare le dinamiche dei MT (Bunker JM, 2006). Inoltre, è stato riscontrato un aumento dell'auto assemblaggio in filamenti per la maggior parte di queste proteine mutate. Alcune mutazioni aumentano invece la fosforilazione della proteina risultando comunque nell'assemblaggio di tau (Goedert M, 2005).

Le mutazioni  $\Delta K280$ ,  $\Delta N296$  e N296H riducono notevolmente la capacità di tau di promuovere l'assemblaggio dei MT *in vitro* aumentando la formazione di  $\beta$ -strutture nelle vicinanze dei motivi  $^{306}VQIVYK^{311}$  e  $^{275}VQIINK^{280}$  (Grover A, 2002; Iseki E, 2001; von Bergen M, 2001), al contrario, S305N e Q336R la stimolano leggermente (Hasegawa M, 1999; Pickering-Brown SM, 2004). Sono stati riportati risultati divergenti sugli effetti di queste mutazioni sulla formazione di filamenti tau indotta dall'eparina, dalla stimolazione a nessun effetto (Goedert M, 1999). Il ritrovamento di una quantità significativamente maggiore di tau 3R nella frazione sarcosil-insolubile del cervello di un paziente con la mutazione  $\Delta K280$  ha stabilito che l'effetto primario di questa mutazione è a livello dell'RNA (van Swieten JC, 2007). La mutazione nell'esone 12 E342V colpisce tau sia a livello di RNA che di proteina, riducendo la capacità di tau di promuovere l'assemblaggio dei MT *in vitro* e probabilmente lo splicing-in dell'esone 10. In un paziente con questa mutazione è stato infatti riportato un aumento dell'mRNA contenente l'esone 10, accompagnato da un aumento di tau 4R senza inserti nell'N-terminale (Lippa CF, 2000), suggerendo che la mutazione possa causare demenza frontotemporale attraverso meccanismi che alterano lo splicing degli esoni 2, 3, e

10 aumentando la quantità di isoforma 4R senza inserti e promuovendo la formazione di filamenti.

La mutazione K257T comporta la formazione di depositi tau sotto forma di stretti nastri avvolti (*narrow twisted ribbons*)(Rizzini C, 2000), mentre P301L e P301S destabilizzano le interazioni di tau con i microtubuli e il loro assemblaggio causa il conseguente deposito di filamenti in neuroni e glia (Mirra SS, 2001; Bugiani O, 2000). La mutazione S320F si trova nell'esone 11 e comporta la diminuzione dell'assemblaggio dei microtubuli indotta da tau e nella formazione di filamenti dritti simili a quelli osservati nell'AD (Rosso SM, 2002), mentre due mutazioni missenso situate nei pressi dell'N-terminale di tau, R5H (Hayashi S, 2002) e R5L (Navas P, 2001) causano diffusi depositi di proteina.

Sono state identificate tre distinte mutazioni nel codone 296, all'interno del dominio di legame ai microtubuli nell'esone 10, altamente conservato tra le specie che regola lo splicing esonico (D'Souza I, 2000). La mutazione N296N comporta un notevole aumento del rapporto di tau 4R/3R, mentre la N296H un aumento dell'espressione dell'isoforma 4R, una diminuzione dell'assemblaggio dei microtubuli ed un aumento della formazione di aggregati (Grover A, 2002). La mutazione  $\Delta$ N296 è stata invece osservata come mutazione in omozigosi in due fratelli, correla con una età di esordio della demenza relativamente precoce (fine 30 anni), provoca un incremento non molto elevato dell'espressione di tau 4R, ma una grande diminuzione nella formazione dei microtubuli ed un forte aumento di aggregazione di tau (Pastor P, 2001).

Tabella 1. Riassunto delle mutazioni esoniche ed introniche osservate in *MAPT*. La numerazione del gDNA è riferita a AC091628.2 partendo dal nt 1; il nome della proteina mutata si riferisce all'isoforma più lunga di tau (4R2N); la formazione dei filamenti è misurata incubando tau con eparina o acido arachidonico; ND=not determined (modificata da Rademakers R, 2004)

EXON	GENOMIC MUTATION NAME	PROTEIN MUTATION NAME	EFFECT ON EX10 SPLICING	EFFECT ON MT ASSEMBLY	EFFECT ON TAU FILAMENT FORMATION
EX1	g.75756G>A	p.Arg5His	no	3R yes, 4R yes	3R ND, 4R yes
EX1	g.75756G>T	p.Arg5Leu	no	3R ND, 4R yes	ND
EX9	g.110018A>C	p.Lys592Thr	ND	3R yes, 4R yes	3R yes, 4R no
EX9	g.110026A>G	p.Ile595Val	no	3R no, 4R yes	3R no, 4R yes
EX9	g.110044C>G	p.Leu266Val	4R slightly ↑	3R yes, 4R yes	3R yes, 4R no
EX9	g.110063G>T	p.Gly272Val	ND	3R yes, 4R yes	3R yes, 4R yes
EX9	g.110065G>A	p.Gly273Arg	ND	ND	ND
EX10	g.123725T>G	p.Asn279Lys	4R ↑	No	ND

EX10	g.123740T>C	(p.Leu284)	4R ↑	No	no
EX10	g.123774A>C	p.Asn296His	4R ↑	4R yes	4R yes
EX10	g.123775_123777delATA	p.Asn296del	no or 4R ↑	4R yes	4R yes
EX10	g.123776T>C	(p.Asn296)	4R ↑	No	no
EX10	g.123789C>A	p.Pro301Thr	ND	ND	ND
EX10	g.123789C>T	p.Pro301Ser	no	4R yes	4R yes
EX10	g.123790C>T	p.Pro301Leu	no	4R yes	4R yes
EX10	g.123796G>T	p.Gly303Val	4R ↑	4R yes	4R yes
EX10	g.123802G>A	p.Ser305Asn	4R ↑	4R yes	no
EX10	g.123802G>T	p.Ser305Ile	4R ↓	ND	ND
EX10	g.123803T>C	(p.Ser305)	4R ↑	No	no
EX11	g.127672T>G	p.Leu315Arg	ND	3R yes, 4R yes	no
EX11	g.127673G>A	p.(Leu315)	ND	ND	ND
EX11	g.127678A>T	p.Lys317Met	ND	ND	ND
EX11	g.127687C>T	p.Ser320Phe	ND	3R yes, 4R yes	ND
EX12	g.132033G>A	p.Gly335Ser	ND	3R yes, 4R yes	no
EX12	g.132034G>T	p.Gly335Val	ND	ND	ND
EX12	g.132037A>G	p.Gln336Arg	ND	3R yes, 4R yes	3R yes, 4R yes
EX12	g.132039G>A	p.Val337Met	ND	3R yes, 4R yes	3R yes, 4R no
EX12	g.132055A>T	p.Glu342Val	4R slightly ↑	ND	ND
EX12	g.132085C>T	p.Ser352Leu	ND	3R ND, 4R yes	3R ND, 4R yes
EX12	g.132117G>A	p.Val363Ile	ND	ND	ND
EX12	g.132136A>T	p.Lys369Ile	ND	3R yes, 4R yes	3R and 4R altered
EX13	g.137420G>A	p.Gly389Arg	no	3R ND, 4R yes	ND
EX13	g.137420G>C	p.Gly389Arg	ND	3R yes, 4R yes	ND
EX13	g.137471C>T	p.Arg406Trp	ND	3R yes, 4R yes	conflicting results
EX13	g.137525C>A	p.Gln424Lys	ND	ND	ND
EX13	g.137535C>T	p.Thr427Met	ND	ND	ND

INTRON	GENOMIC MUTATION NAME	MUTATION ALIAS	EFFECT ON EX10 SPLICING	EFFECT ON MT ASSEMBLY	EFFECT ON TAU FILAMENT FORMATION
I9	g.123701G>T	IVS9-10G>T	ND	ND	ND
I10	g.123806G>A	IVS10+3G>A	4R ↑	No	no
I10	g.123814T>C	IVS10+11T>C	4R ↑	No	no
I10	g.123815C>T	IVS10+12C>T	4R ↑	No	no

I10	g.123816A>G	IVS10+13A>G	4R ↑	No	no
I10	g.123817C>T	IVS10+14C>T	4R ↑	No	no
I10	g.123819C>T	IVS10+16C>T	4R ↑	No	no
I10	g.123822C>G	IVS10+19C>G	3R ↑	No	no

## 5. LE TAUPATIE

Le taupatie sono un gruppo di patologie neurodegenerative caratterizzate da perdita neuronale e dall'importante presenza di aggregati fibrillari insolubili che contengono la proteina tau iperfosforilata (vedi tabella 2). Queste inclusioni intracellulari vengono suddivise in grovigli neurofibrillari (NeuroFibrillary Tangles, NFT), corpi di Hirano, corpi di Lewy e corpi di Pick.

Le taupatie comprendono la Demenza FrontoTemporale (FTD; MIM #600274), la malattia di Pick (PiD; MIM #172700), la malattia di Alzheimer (AD; MIM #104300), la demenza argirofilica granulosa (AGD), la paralisi progressiva sopranucleare (PSP; MIM601104), la degenerazione corticobasale (CBD) e la sindrome di Down (MIM #190685). I depositi di tau in queste patologie differiscono nelle isoforme proteiche che li compongono.

A differenza dell'AD, dove sono presenti anche depositi di  $\beta$ -amiloide e la tau iperfosforilata forma filamenti solo nei neuroni, in diverse taupatie, tra le quali PSP e CBD sono presenti anche numerose cellule gliali contenenti filamenti tau. Non è noto attualmente se la patologia gliale influisca sulla degenerazione neuronale o sia necessaria per la progressione della malattia.

Nella seguente immagine vengono mostrati i profili di Western blot di tau solubile ed insolubile in diverse taupatie. Come è possibile notare, le isoforme di tau nella forma defosforilata (+) e non (-) differiscono nelle diverse patologie. Nell'Alzheimer e nei casi di Demenza FrontoTemporale (FTD) causati da mutazioni che non alterano lo splicing (V337M, R406W) sono coinvolte tutte le sei isoforme della proteina tau; in PSP, CBD e FTD dovuta alla mutazione P301L si aggregano le forme iperfosforilate di proteina tau contenenti l'esone 10 (tau 4R), come nei casi dovuti a mutazioni nell'esone 10 e nell'introne 10, mentre in PiD e FTD dovuta a mutazioni che non cadono nell'esone 10 si aggregano isoforme che mancano di questo esone (tau 3R).

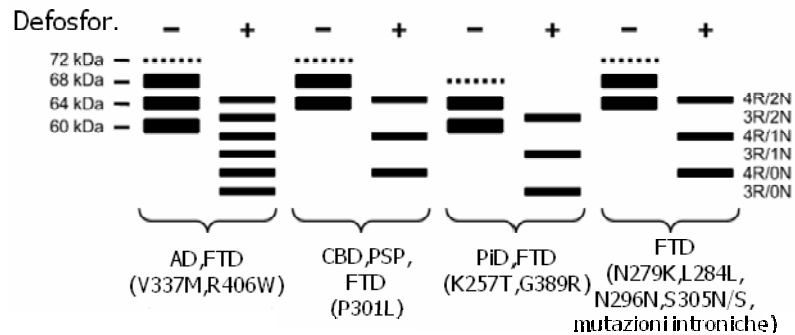


Figura 22. Profili di espressione, ottenuti tramite Western blot, della proteina tau fosforilata (-) e non (+) in cervelli di pazienti affetti da diverse taupatie e da diverse mutazioni nel gene *MAPT*. Lo spessore delle bande è proporzionale alla concentrazione dell'isoforma.

AD: Alzheimer, FTD: Demenza FrontoTemporale, CBD: Degenerazione CorticoBasale; PSP: Paralisi Progressiva (modificata da Lee VMY, 2001)

### 5.1 Alzeihmer

È la taupatia più comune e più studiata, colpisce circa il 10% della popolazione sopra i 65 anni e comporta una diffusa atrofia cerebrale che parte dai lobi parietale e temporale. Il primo segno di deficit cognitivo è rappresentato dalla perdita di memoria a breve termine, seguita da afasia, agnosia, aprassia e disturbi comportamentali. Sono presenti anche deficit visivi e spaziali e difficoltà nello svolgimento delle normali attività. È caratterizzata da due tipi principali di inclusioni patologiche: le placche senili (SP) e i grovigli neurofibrillari intraneuronali (NFT). Le prime sono il risultato dell'accumulo extracellulare di peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), un frammento della proteina precursore dell'amiloide (APP) e sono diffuse in tutta la corteccia cerebrale e nelle strutture sottocorticali. Gli NFT sono invece costituiti da filamenti a doppia elica (PHF) e filamenti diritti (SF) contenenti tutte le isoforme della proteina tau iperfosforilata all'interno di specifiche popolazioni neuronali vulnerabili, come le grandi cellule piramidali dell'ippocampo e della corteccia entorinale e gli strati soprargranulari e infrargranulari delle aree di associazione corticale, mentre le cortecce primarie sensoriale e motoria sono relativamente risparmiate.

Analisi di microscopia elettronica hanno evidenziato che i PHF, che rappresentano circa il 95% degli NFT, consistono di due nastri elicoidali avvolti con una periodicità di 75-80 nm e uno spessore di 10-22 nm, mentre gli SF rappresentano la frazione meno abbondante pari a circa il 5% e non esibiscono alcuna periodicità. Il numero di NFT è direttamente correlato con la presenza ed il grado di demenza, infatti  $A\beta$  da solo non è responsabile della sintomatologia clinica.

Le forme autosomiche dominanti di Alzheimer sono causate da mutazioni nei geni codificanti il precursore dell'amiloide  $\beta$  (*APP-amyloid precursor protein*) e la presenilina 1 e 2 (*PS1/2*). Le mutazioni a carico dell'APP alterano il processamento proteolitico dell'APP, promuovendo

la formazione del peptide fibrillogenico A $\beta$ 42 (Hardy J, 2002). Le preseniline, unitamente ad altre proteasi, sono invece componenti centrali della  $\gamma$ -secretasi, l'enzima responsabile per il taglio al C-terminale di APP, e le loro mutazioni comportano una maggiore produzione di A $\beta$ 42 (Wilquet V, 2004).

Va ricordato che alcune lesioni neurofibrillari a bassa densità sono presenti anche nella corteccia entorinale e nell'ippocampo di anziani sani non affetti da demenza (Bueè L, 2000).

## 5.2 Sindrome di Down

È causata dalla trisomia del cromosoma 21 e comporta crescita e sviluppo cerebrali scorretti, causando deficit cognitivi e insorgenza di demenza a circa 40-50 anni d'età. Dal punto di vista neuropatologico, si assiste a grave perdita neuronale in ippocampo, neocorteccia e strutture sottocorticali. Si osserva un'alta densità di depositi amiloidi diffusi verso i 15 anni, seguita da massiccia deposizione di placche senili nella successiva decade di vita, mentre la degenerazione neurofibrillare con accumulo di tau avviene più tardi. Anche in questa patologia tau è iperfosforilata e mostra un pattern simile a quello dell'AD, probabilmente a causa dell'aumentata espressione della proteina precursore dell'amiloide codificata dal gene *APP* localizzato sul cromosoma 21 (Bueè L, 2000).

## 5.3 Malattia di Pick

È una patologia sporadica rara che comporta demenza presenile, deficit di linguaggio e di comportamento, associati ad atrofia frontotemporale e limbica, grave perdita neuronale, spongiosi e gliosi con neuroni rigonfi. Provoca cambiamenti nel carattere e nell'umore dei pazienti e nella relazione con gli altri, depressione ed afasia progressiva variabile che porta al mutismo (Constantinidis J, 1974). Dal punto di vista neuropatologico, è caratterizzata dalla presenza di inclusioni citoplasmatiche rotonde composte da filamenti tau nei neuroni del lobo frontale e nelle cellule granulari del giro dentato, chiamate corpi di Pick e costituite per lo più da isoforme di tau mancanti dell'esone 10, iperfosforilate ed ubiquinate. Diversi studi hanno tuttavia dimostrato che sono presenti sia l'isoforma a 3 che a 4 ripetizioni (King ME, 2001).

Le lesioni neurofibrillari sono ultrastrutturalmente composte da filamenti sottili e da un ridotto numero di filamenti tau elicoidali, a periodicità simile a quelli presenti nell'AD.

## 5.4 Paralisi Progressiva Sopranucleare

PSP è una patologia parkinsoniana atipica e progressiva con esordio in età adulta caratterizzata da paralisi sopranucleare dello sguardo, instabilità posturale moderata o severa, distonia facciale, nucale e tronculare e deficit cognitivi tardivi (Litvan I, 1996). La neuropatologia della PSP include atrofia dei gangli basali, subtalami e del tronco encefalico con significativa perdita neuronale, gliosi reattiva ed atrofia delle aree frontali del cervello

correlata con cambiamenti comportamentali (Cordato NJ, 2002). Nelle regioni del cervello colpite da PSP sono presenti NFT contenenti tau 4R (Sergeant N, 1999), anche se alcuni studi indicano che sia presente anche tau 3R (Liu WK, 2001). Vi è anche una pronunciata patologia nel midollo spinale, con gliosi, fibre di neuropilo, perdita neuronale e neuroni tau-positivi che tuttavia non si traduce in evidenti sintomi clinici (Vitaliani R, 2002). È interessante notare che la quantità di mRNA codificante per tau 4R è aumentata nel tronco encefalico (Chambers CB, 1999), inoltre, i livelli di cdk5 sono significativamente elevati nel cervello affetto da PSP, e colocalizzano con la patologia indotta da tau (Borghi R, 2002).

Le inclusioni contenenti tau sono riscontrate in cellule neuronali e gliali, colpendo sia astrociti "infocchettati" che oligodendrociti. Ultrastrutturalmente i grovigli neurofibrillari sono prevalentemente composti da filamenti dritti e da un minor numero di filamenti a nastro elicoidale, simili a quelli dei PHF presenti nell'AD (Schmidt ML, 1996).

### 5.5 Degenerazione Cortico Basale

È una patologia neurodegenerativa rara e sporadica, con esordio in età adulta, caratterizzata da disturbi cognitivi come afasia e aprassia, demenza moderata tardiva e disturbi motori extrapiramidali come rigidità, distonia limbica, acinesia e tremori (Rebeiz JJ, 1968). Analisi patologiche hanno dimostrato atrofia frontoparietale unilaterale, depigmentazione della substantia nigra e perdita neuronale e gliosi in queste regioni (Feany MB, 1995). La patologia gliale si manifesta come placche astrocitarie e numerose inclusioni tau positive nella sostanza bianca. Sono presenti inoltre neuroni rigonfi nella corteccia, nel tronco encefalico e nelle strutture sottocorticali. Le aree del cervello affette contengono grovigli neurofibrillari gliali e neuronali di tau che si possono presentare come PHF o filamenti dritti (Komori T, 1999). Biochimicamente, questi grovigli sono molto simili a quelli osservati nella PSP e contengono principalmente tau 4R. Molti lavori riportano infatti che le isoforme di tau che contengono l'esone 10 sono presenti nella CBD, mentre non sono rilevabili le isoforme che ne sono prive (E10-), suggerendo che in tale disordine si aggregano in filamenti principalmente le isoforme 4R (Sergeant N, 1999).

### 5.6 Malattia di Niemann-Pick di tipo C

È una patologia autosomica recessiva dell'immagazzinamento lipidico lisosomale, causato principalmente da mutazioni nel gene *NPC-1* in 18q11-q12 che comporta difetti nel "trafficking" intracellulare del colesterolo esogeno derivato dalle LDL (Low Density Lipoproteins). Le caratteristiche cliniche sono lipidosi distonica giovanile, lipidosi oftalmoplegica, deficit motori a causa di disfunzione cerebellare e demenza. L'esordio può essere nell'infanzia, nell'adolescenza o più raramente nell'età adulta. Si osservano dilatazioni



neuronal nella corteccia ed assoni rigonfi nel tronco encefalico, nonché NFT in molte parti del cervello incluse ippocampo, neocorteccia e strutture sottocorticali. Il pattern di tau iperfosforilata è simile a quello osservato nell'AD (Bueè L, 2000).

### 5.7 Complesso Guamaniano SLA/PDC

È una patologia neurodegenerativa cronica altamente riscontrata nella popolazione Chamorro dell'isola di Guam. Clinicamente è indistinguibile dalla Sclerosi Laterale Amiotrofica sporadica (SLA) e si manifesta con fascicolazioni e sintomi motori inferiori e superiori. Il complesso parkinsonismo-demenza è caratterizzato da un declino mentale progressivo e segni extrapiramidali come bradicinesia, rigidità e più raramente tremori. I pazienti presentano grave atrofia corticale, perdita neuronale e diffusi NFT, soprattutto nelle isocortecce temporale e frontale, nell'ippocampo e in diverse strutture sottocorticali, costituiti da filamenti diritti e PHF con caratteristiche simili a quelli osservati nell'AD, ma le due patologie si distinguono per la differente distribuzione laminare e per la densità di tali grovigli neuro fibrillari (Bueè L, 2000).

### 5.8 Demenza Argirofilica Granulosa

Tale patologia è caratterizzata da disturbi del comportamento, deficit cognitivi e di memoria. A livello neuropatologico, si osserva la presenza di numerosi grani argirofili nei tessuti cerebrali affetti, e di inclusioni neuronali tau-positive sia nell'ippocampo che nell'area limbica. Il rapporto 4R/3R è significativamente aumentato, accreditando la AGD come una patologia-4R. Ultrastrutturalmente, sono poi evidenti numerosi filamenti dritti e filamenti a nastro elicoidale, differenti da quelli tipici dell'AD in quanto mostrano una periodicità irregolare di 90-130 nm (Bueè L, 2000).

### 5.9 Parkinsonismo postencefalitico

È una patologia riscontrata nei pazienti che sono sopravvissuti alla pandemia dell'influenza spagnola degli anni 1916-1926. La principale caratteristica clinica è costituita dai sintomi extrapiramidali in assenza di deficit cognitivi o di linguaggio. Vengono colpite diverse aree cerebrali, ma le inclusioni contenenti tau sono riscontrate soprattutto in ippocampo, putamen, corteccia entorinale e regioni sottocorticali e mostrano somiglianze con i grovigli riscontrati nell'AD (Bueè L, 2000).

Tabella 2

<b>Malattie con patologia neurofibrillare di tau</b>
Alzheimer
Angiopatia amiloide cerebrale da proteina prionica
Complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica-parkinsonismo-demenza di Guam (ALS/PDC)
Degenerazione CorticoBasale
Demenza Argirofilica Granulosa
Demenza FrontoTemporale con Parkinsonismo legato al cromosoma 17
Demenza Pugilistica
Demenza tangle-only (con grovigli neuro fibrillari prevalenti)
Diffusi grovigli neurofibrillari con calcificazione
Distrofia Miotonia
Gliosi Progressiva Subcorticale
Malattia del motoneurone Non-Guamaniana con grovigli neurofibrillari
Malattia di Gerstmann-Straussler-Scheinker
Malattia di Hallervorden-Spatz
Malattia di Niemann-Pick, tipo C
Malattia di Pick
Morbo di Creutzfeldt-Jakob
Panencefalite Subacuta Sclerosante
Paralisi Progressiva Sopranucleare
Parkinsonismo postencefalitico
Sindrome di Down

## 6. LA DEMENZA FRONTOTEMPORALE

La Demenza FrontoTemporale (FTD; MIM #600274) è la terza causa globale di neurodegenerazione dopo l'Alzheimer e la demenza da corpi di Lewy e la seconda più comune dopo l'Alzheimer in età presenile ed ha un'incidenza di 5-15 casi su 100000 nel gruppo di età compreso tra 45 e 65 anni. Gli individui affetti mostrano un decorso della patologia lentamente progressivo che porta nella maggior parte dei casi alla morte entro circa sei anni dalla diagnosi (Hodges JR, 2003). È una patologia con presentazioni cliniche variabili e diverse patologie sottostanti associate.

La principale caratteristica patologica della FTD è l'atrofia della corteccia frontotemporale con grave perdita neuronale, gliosi della sostanza bianca e grigia e spongiosi degli strati superficiali laminari, nonché presenza di inclusioni filamentose di proteina tau sia all'interno dei neuroni che delle cellule gliali, in assenza di depositi di A $\beta$  tipici dell'AD. Ultrastrutturalmente e biochimicamente i grovigli fibrillari si distinguono se la patologia è

causata da mutazioni che colpiscono l'esone o l'introne 10 o da mutazioni esterne ad essi.

Le caratteristiche dei filamenti tau, come mostrato in figura 22, possono essere infatti identiche a quelle osservate nell'Alzheimer (Spillantini MG, 1996), nella malattia di Pick (Rizzini C, 2000) o nella paralisi progressiva sopranucleare e nella degenerazione corticobasale (Hong M, 1998).

I casi di FTD sono eterogenei dal punto di vista patologico e possono essere suddivisi in tre sottogruppi sulla base delle inclusioni proteiche nel cervello:

- inclusioni tau-positive
- inclusioni tau-negative, ubiquitina-positive
- senza istopatologia distintiva

### 6.1 Epidemiologia genetica

La maggior parte dei casi di FTD è sporadica, mentre il 20-30% dei casi è familiare. Tra i casi familiari, circa il 30% è dovuto a mutazioni in *MAPT* e presenta una trasmissione autosomica dominante anche se sono state descritte modalità recessive (Nicholl DJ, 2003), mentre il 20-40% non presenta mutazioni in questo gene.

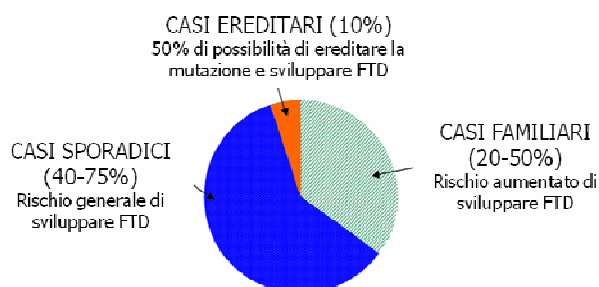


Figura 23. Epidemiologia dei casi di demenza frontotemporale (modificata da Radin L, 2003)

Ad oggi sono state descritte 71 mutazioni in *MAPT*, tuttavia in molte famiglie in cui l'analisi di linkage riconduceva al locus 17q21 non è stata riscontrata alcuna mutazione patogenetica in questo gene (Rosso SM, 2001). Il sequenziamento sistematico di geni candidati ha portato all'identificazione della prima mutazione nel gene *GRN* che codifica per la proteina progranulina. (Baker M, 2006). Ad oggi sono state identificate 68 diverse mutazioni in *GRN*, la maggior parte delle quali causa la terminazione prematura della sequenza codificante con degradazione dell'mRNA mutato, formazione di un allele *null* e conseguente perdita parziale della proteina funzionale. La progranulina è espressa sia nei neuroni che nella microglia attivata ed è un fattore di crescita con multiple funzioni che sembra svolgere un ruolo importante nella sopravvivenza neuronale, nella riparazione delle ferite, nella tumorigenesi ed in altri processi fisiologici e patologici, incluso un anomalo metabolismo della proteina ubiquitinata TDP-43, coinvolta in alcune forme di demenza frontotemporale con inclusioni

ubiquitina-positive.

Sono stati descritti anche casi di FTD ereditari dovuti a mutazioni nel gene *VCP* (Valosin-containing protein) in 9p13.3 caratterizzati da manifestazioni scheletriche simili alle forme non sindromiche di osteodistrofia di Paget, associate a miopia e demenza frontotemporale (Watts GD, 2004). Inoltre è stata descritta una famiglia con patologia legata al cromosoma 3, causata da mutazioni nel gene *CHMP2B* (Charged multivesicular body protein 2b) in 3p11.2 caratterizzata da inclusioni ubiquitina-positive e patologia tau sporadica (Yancopoulos D, 2003), nonché mutazioni nel gene *PSEN1* (Presenilina 1) in 14q24.3, implicate nell'insorgenza dell'Alzheimer ad esordio precoce, ma il cui effetto nello sviluppo di FTD non è chiaro (Raux G, 2000).

Oltre alle mutazioni patogenetiche, sono stati descritti anche diversi polimorfismi sia in *MAPT* che in *GRN*. Altri polimorfismi in altri geni noti sembrano svolgere un ruolo protettivo o predisponente alla patologia, ma non è stato sempre possibile confermare i risultati. Tra questi, un polimorfismo descritto in letteratura nel gene *MCP-1* (A-2518G) sembra svolgere un ruolo protettivo, mentre i polimorfismi G894T (Glu298Asp) in *NOS3* e C276T in *NOS1* aumentano il rischio di sviluppare FTD (Galimberti D, 2009; Venturelli E, 2008; 2009).

Nonostante siano state identificate mutazioni come causa di FTD, rimangono irrisolti alcuni dubbi sul ruolo di tau nelle taupatie neurodegenerative: come la disfunzione della proteina porti alla formazione di inclusioni, che ruolo svolga l'iperfosforilazione nell'aggregazione e come la formazione di inclusioni si correli alla perdita neuronale. Non esiste nemmeno una chiara correlazione tra la manifestazione clinica e la posizione della mutazione in *MAPT* ed anche all'interno della stessa famiglia i sintomi possono variare molto, suggerendo il coinvolgimento di altri fattori ambientali e/o genetici non ancora identificati (Rademakers R, 2004).

## 6.2 Le mutazioni in *MAPT*

Nel 1998, tre gruppi di ricerca hanno identificato mutazioni in *MAPT* in otto famiglie con FTD (Hutton M; Poorkaj P; Spillantini MG, 1998) e sono state identificate fino ad oggi un totale di 45 differenti mutazioni patogenetiche in famiglie provenienti da Europa, Giappone, Stati Uniti e Australia. La modalità di trasmissione è meno chiara in alcune famiglie, a causa della mancanza di informazioni sulla storia familiare e la possibilità di non-paternità (Murrell JR, 1999). È stata descritta anche penetranza incompleta per la mutazione L315R (van Herpen E, 2003). Alcune famiglie con mutazioni N279K e P301L sono numerose, con più di 20 membri affetti nell'arco di più generazioni (van Swieten JC, 1999), mentre altre famiglie sono costituite da pochi membri affetti e talvolta una mutazione è stata identificata unicamente nel probando (Hogg M, 1998). Questo potrebbe riflettere il fatto che i parenti colpiti nelle

generazioni precedenti hanno avuto altre diagnosi invece di FTD, tra cui la sclerosi multipla e il morbo di Parkinson. Alcune mutazioni sono state trovate in tutto il mondo, mentre altre sono state descritte in singole famiglie e le mutazioni introniche sono state riscontrate quasi esclusivamente al di fuori dell'Europa continentale (van Swieten JC, 2007).

La mutazione P301L sembra essere la mutazione più diffusa, con più di 20 famiglie colpite in Stati Uniti, Francia, Paesi Bassi, Giappone, Italia e Polonia, ma non è chiaro se questa alta frequenza possa essere spiegata da un antenato comune (van Swieten JC, 2007).

L'analisi degli aplotipi ha mostrato che le mutazioni N279K e R406W si sono verificate come eventi indipendenti in diverse famiglie (Rademakers R, 2003; Reed LA, 1998), al contrario tutte le famiglie con la mutazione intronica +16 condividono un aplotipo comune, anche se eventi di ricombinazione hanno portato in alcuni casi ad una dimensione ridotta di alleli condivisi (Pickering-Brown SM, 2004).

La frequenza delle mutazioni in *MAPT* varia tra i diversi studi (van Swieten JC, 2007), infatti l'elevata prevalenza di individui con una diagnosi clinica di FTD nei Paesi Bassi (14%) e nel Nord Ovest della Gran Bretagna (10%) contrasta con quella molto più bassa negli Stati Uniti (6%) e altrove (0%) (Fabre SF, 2001; Zekanowski C, 2003; Stanford PM, 2004). La frequenza è ovviamente maggiore nei casi familiari di FTD, ma anche in questo caso varia considerevolmente tra gli Stati Uniti (8%) e l'Europa (20%-30%). Non è chiaro tuttavia se questa variazione geografica rifletta vere differenze di prevalenza tra specifiche popolazioni o sia piuttosto il risultato di diverse metodiche di studio.

### 6.3 Età di esordio

L'età di insorgenza è altamente variabile e oscilla da 20 a 70 anni, con una media di 50 anni. La presentazione clinica è correlata in qualche misura con il tipo o la posizione delle mutazioni all'interno del gene *MAPT*, tuttavia la variabilità inter- ed intra-familiare nell'età di esordio può essere notevole per alcune mutazioni, mentre per altre è notevolmente simile anche in continenti diversi, nonostante il diverso assetto genetico ed ambientale (Bird TD, 1999; Delisle MB, 1999; Kodama K, 2000).

L'età di esordio per la mutazione P301L e diverse altre è di solito tra 45 e 65 anni. La demenza può occasionalmente presentarsi tra 65 e 70 anni di età, ma raramente più tardi, come avviene per le mutazioni R5H e I260V (van Swieten JC, 1999; Hayashi S, 2002). Le mutazioni introniche mostrano la stessa distribuzione nell'età di esordio, anche se in alcuni casi hanno un esordio più precoce, intorno a 40 anni (Pickering-Brown SM, 2002)

I sintomi clinici si possono sviluppare anche tra i 20 e i 30 anni in pazienti con mutazioni P301S, L315R, G335V e G335S (Bugiani O, 1999, van Herpen E, 2003; Sperfeld AD, 1999; Spina S, 2007), o tra i 30 e i 44 anni nei pazienti con mutazioni L266V e N279K (Hogg M,

2003; Wszolek ZK, 1992).

Lo stato di salute di un paziente di 82 anni con la mutazione L315R ha suggerito però che i fattori genetici o ambientali possano giocare un ruolo nel determinare l'età di esordio (van Herpen E, 2003).

La durata della malattia è in media tra 6 e 10 anni, ma la mutazione R406W è un'eccezione, in quanto è caratterizzata da un lento tasso di progressione della malattia fino a 25 anni (van Swieten JC, 1999). I pazienti con età di insorgenza precoce spesso mostrano una progressione della malattia più aggressiva, portando al decesso entro 5 anni (Saito Y, 2002; Sperfeld AD, 1999).

#### 6.4 Presentazione clinica

La FTD è caratterizzata clinicamente da gradualmente e progressivi cambiamenti in comportamento, personalità e/o linguaggio con relativa conservazione della memoria e delle capacità spaziali all'inizio della malattia. Si può avere disinibizione, apatia, perdita di iniziativa e comportamento antisociale come caratteristiche principali. Il comportamento ossessivo-compulsivo e/o psicotico o la presenza di illusioni paranoiche o allucinazioni potrebbero inizialmente portare alla diagnosi di un disturbo psichiatrico (van Swieten JC, 2007). I pazienti potrebbero mostrare problemi con la pianificazione, soffrire di perdita di concentrazione e sviluppare deficit di giudizio e perdita di intuito tali da danneggiarne la vita sociale e professionale. Altre caratteristiche cliniche comuni sono l'aumento di appetito, l'iperoralità e il comportamento stereotipato e perseverante. I pazienti sviluppano precocemente difficoltà nel linguaggio, come problemi nel trovare le parole cosicché vengono utilizzate spesso frasi e parole stereotipate (Wszolek ZK, 1992). A volte sono osservati parafasia semantica e non corretta comprensione del linguaggio (Pickering-Brown SM, 2006), anche se non è mai stata riportata una vera demenza semantica. La povertà di discorso porta al mutismo entro 5 anni in tutti i pazienti, ad eccezione di alcuni con la mutazione R406W che mantengono a lungo le competenze linguistiche (van Swieten JC, 1999). Crisi epilettiche parziali o generalizzate sono una specifica caratteristica di alcuni pazienti con la mutazione P301S, mentre è stato osservato ritardo mentale in un paziente con la mutazione intronica +11 (Sperfeld AD, 1999; Miyamoto K, 2001).

Il parkinsonismo è la presentazione clinica dominante in alcuni pazienti con la mutazione N279K o mutazioni introniche (Iseki E, 2001; Pickering-Brown SM, 2002), ma può verificarsi anche in altri casi (Walker RH, 2002). Paralisi dello sguardo verticale, movimenti oculari saccadici e rigidità assiale sono sintomi precoci nei pazienti con mutazione  $\Delta$ N296 e S305N e potrebbero far propendere per una diagnosi di paralisi sopranucleare progressiva (Pastor P,

2001; Stanford PM, 2000). Con il progredire della patologia, i pazienti mostrano gravi deficit comportamentali, linguistici e di memoria, distrazione ed altri deficit cognitivi, finché peggiorano progressivamente fino a diventare muti, allettati e completamente dipendenti per tutte le attività. Le funzioni cognitive possono essere compromesse da decenni prima della presentazione della demenza, in quanto i portatori asintomatici della mutazione mostrano ridotte fluidità verbale, attenzione e velocità motoria già tra i venti e i trent'anni (Ferman TJ, 2003; Geschwind DH, 2001).

### 6.5 Indagini diagnostiche

La diagnosi di FTD può essere difficoltosa, dal momento che questa patologia condivide caratteristiche importanti con altre cause di demenza più comuni. Non esiste un singolo test specifico da utilizzare nella routine diagnostica, ma è necessario raccogliere la storia familiare e clinica del paziente, oltre che applicare specifici test neuropsicologici. Anche il neuroimaging può essere utile nella diagnosi di FTD, dal momento che l'atrofia frontotemporale è la caratteristica neuroradiologica più comune. Pazienti con alcune mutazioni mostrano un pattern di atrofia a prevalenza temporale, spesso asimmetrico e, occasionalmente, mostrano anche atrofia ippocampale. L'atrofia cerebrale diffusa è un evento comune in altri pazienti, specialmente quelli con mutazioni introni che (van Swieten JC, 2007). La SPECT (Single-Photon Emission Computer Tomography) mostra ipoperfusione della parte anteriore del cervello precoce nella malattia, anche in pazienti con normale morfologia del cervello mentre il metabolismo del glucosio osservato tramite PET (Positron Emission Tomography) è ridotto nei lobi frontali e temporali del cervello (Nasreddine ZS, 1999).

### 6.6 Trattamento terapeutico

Il trattamento farmacologico dei pazienti è attualmente mirato al trattamento dei sintomi, ma non esistono farmaci o cure approvate per questa patologia. Recentemente è stato dimostrato che il paclitaxel, un farmaco antitumorale che lega i microtubuli, sarebbe in grado di compensare la perdita della funzione di tau in un modello murino transgenico di tauopatia (Zhang B, 2005). Un altro approccio terapeutico è basato sulla somministrazione di Lito, un inibitore della chinasi GSK3 $\beta$  che sarebbe in grado di modulare l'iperfosforilazione di tau e la conseguente neurodegenerazione (Alvarez G, 1999). Ciò è stato dimostrato sia *in vitro* in cellule neuronali che *in vivo* in modelli animali transgenici per tau mutata che overesprimono tau 3R (King T, 2001; Noble W, 2005, Nakashima H, 2005).

Tuttavia, gli NFT sembrano avere una struttura stabile e di conseguenza i trattamenti agiscono su tau solubile iperfosforilata, ma non sulla proteina aggregata (Oddo S, 2006).

*Scopo*



Esistono prove crescenti che tau sia una proteina multifunzionale, data la sua localizzazione nel nucleo interfascico e lungo i cromosomi in mitosi e la sua capacità di legare il DNA.

Ad oggi sono state descritte 44 mutazioni nel gene *MAPT* che riducono l'affinità di legame di tau ai microtubuli, causano l'iperfosforilazione della proteina o modificano il fisiologico rapporto tra isoforme proteiche, con conseguenti alterazioni citoscheletriche e depositi intracellulari di proteina.

Dati recenti presenti in letteratura hanno suggerito un possibile ruolo della proteina tau anche nella stabilità cromosomica (Rossi G, 2008). In pazienti con mutazione P301L in *MAPT* ed affetti da demenza frontotemporale (FTD) è stata infatti riscontrata un'alta fragilità cromosomica, rappresentata da rotture e da lesioni acromatiche distribuite su tutti i cromosomi, aneuploidie e difetti del fuso mitotico.

Per verificare se tali risultati fossero dovuti unicamente alla mutazione in esame, si è deciso quindi di ampliare l'analisi a pazienti con mutazioni diverse arruolati presso il Dipartimento di Neuropatologia dell'Istituto Carlo Besta di Milano diretto dal Prof. Fabrizio Tagliavini. A tal scopo sono stati analizzati linfociti periferici e fibroblasti attraverso tecniche di citogenetica classica (analisi del cariotipo) e molecolare (array-CGH) per accertare che le mutazioni nel gene *MAPT* possano provocare una patologia nucleare in tessuti non-neurali oltre alla ben consolidata patologia citoscheletrica del sistema nervoso.

Inoltre, per verificare se l'instabilità cromosomica osservata possa essere dovuta al coinvolgimento della proteina tau in meccanismi di riparo del DNA, sono stati trattati linfoblasti di tre pazienti con mutazione P301L con agenti genotossici in grado di produrre lesioni nel DNA a singolo e doppio filamento.

## *Materiali e metodi*

## 1. COLLABORAZIONE

Il presente progetto di ricerca è stato svolto in collaborazione con l'Unità Operativa di Neuropatologia dell'Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano diretto dal Prof. F. Tagliavini.

Tutti i pazienti sono stati diagnosticati e arruolati presso l'Istituto dallo staff di neurologi dell'Unità Operativa, che si è occupato anche dei prelievi di sangue periferico e delle biopsie cutanee.

Il sequenziamento per la ricerca delle mutazioni è stato effettuato dalla Dottoressa G. Rossi, lo studio del loro effetto, la coltura dei fibroblasti ed i trattamenti dei linfoblasti sono stati effettuati dalle Dottoresse G. Rossi ed E. Piccoli.

L'analisi array-CGH è stata effettuata dalla Dottoressa S. Redaelli del Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca.

La sottoscritta si è occupata dell'analisi citogenetica delle cellule somatiche dei pazienti e dei controlli, del mantenimento in coltura dei fibroblasti e dell'analisi dei dati ottenuti dall'array-CGH. L'attività svolta è stata supervisionata e coordinata dalla Prof.ssa Leda Dalprà.

## 2. PAZIENTI

Sono stati arruolati in totale 17 pazienti con diverse mutazioni del gene *MAPT* e diverso fenotipo clinico, come riassunto nella seguente tabella:

PAZ	MUTAZ	ETÀ ESORDIO	FENOTIPO CLINICO	LINFOCITI PERIFERICI	FIBRO BLASTI	LINFO BLASTI	a-CGH	
							SP	FIBR
DSG ♀	P301L	49	FTD-bv	✓	✓	✓	✓	✓
GR ♀	P301L	49	FTD-bv	✗	✓	✓	✗	✗
GM ♀	P301L	47	FTD-bv	✗	✗	✓	✗	✗
GS ♂	P301L	51	presintomatico	✓	✗	✗	✗	✗
RA ♀	P301L	43	FTD-bv	✓	✓	✗	✓	✓
DI ♀	P301L	55	FTD-bv	✓	✓	✗	✗	✓
CN ♂	ΔN296	36	PSP	(	(	(	(	(
RoA ☒	I10+3	58	FTD-bv	(	(	(	(	(
TE ☒	I10+16	46	FTD-bv	(	(	(	(	(
IN ☒	G335S	22	FTD-bv	✓	✓	✗	✗	✗
GG ♀	V363I	55	FTD-PNFA	✓	✓	✗	✓	✓
MMC ♀	V363I	53	PCA	✓	✗	✗	✗	✗
EP ♂	P364S*	50	FTD-bv	✓	✓	✗	✓	✓
ES ♂	P364S*	18	presintomatico	✓	✗	✗	✗	✗
DM ♀	G366R*	57	FTD-bv	✓	✓	✗	✓	✓
CA ♂	G389R	40	CBD	✗	✓	✗	✓	✓
CG ♂	D418N*	60	Atassia con CI	✓	✓	✗	✗	✗

Legenda. \*mutazioni non descritte in letteratura; FTD-bv: Demenza Frontotemporale, variante comportamentale; PSP: Paralisi Progressiva Soprannucleare; PNFA: Afasia Progressiva Non-Fluente; PCA: Atrofia Corticale Posteriore; CBD: Degenerazione CorticoBasale; CI: Decadimento Cognitivo; ✓: disponibile; ✗: non disponibile

## 3. LINFOCITI PERIFERICI

È stato prelevato il sangue periferico a 13 dei 17 pazienti arruolati, come mostrato in tabella, di età compresa tra 22 e 60 anni (media±deviazione standard: 46±13). Sono stati inoltre considerati come controlli 78 soggetti sani di età compresa tra 24 e 62 anni (media±deviazione standard: 37±7). È stata allestita una coltura per ogni paziente e per ogni controllo seminando sterilmente 300 µl di sangue intero in provette a becco di clarino con 3 ml di terreno specifico (Synchroset, Celbio) secondo le procedure in uso nel Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale San Gerardo di Monza. Grazie alla presenza di

PHA (fitoemoagglutinina) è stato possibile indurre attività mitotica nei linfociti T che, dopo tre giorni di incubazione a 37° C, sono stati bloccati in metafase con l'aggiunta di Colcemid (Roche) per un'ora, un inibitore della formazione del fuso mitotico. Le fasi successive hanno previsto il trattamento ipotonico con cloruro di potassio 0.075M (Carlo Erba) per 7 minuti a temperatura ambiente, la lisi dei globuli rossi in acido acetico acquoso e la fissazione dei globuli bianchi prima con alcol metilico (Carlo Erba) e successivamente con fissativo, una soluzione composta da alcol metilico ed acido acetico glaciale in proporzione 3:1. I vetrini sono stati poi colorati in una soluzione di mostarda di Quinacrina che si lega in modo stabile a zone di DNA ricche in A e T ed osservati al microscopio a fluorescenza (Leica). Le metafasi sono state fotografate utilizzando un obiettivo ad immersione 100X e successivamente analizzate attraverso il programma CromoWin® (Tesi Imaging) per la ricostruzione del cariotipo, descritto secondo le linee guida dell'ISCN 2009 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature).

#### **4. FIBROBLASTI**

Sono state effettuate biopsie cutanee a un totale di 11 pazienti con diverse mutazioni in *MAPT*. La coltura primaria è stata allestita all'Istituto Neurologico Carlo Besta e da noi mantenuta per il preparato cromosomico in terreno RPMI 1640 (Euroclone) addizionato con siero fetale (FCS, International PBI) al 20% e L-glutamina (Invitrogen) e tripsinizzata periodicamente (Euroclone).

Le cellule sono state bloccate in metafase con l'aggiunta di Colcemid per un tempo variabile da 4 ore a overnight ed allestite secondo le procedure in uso nel Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale San Gerardo di Monza. Brevemente, le cellule sono state raccolte tramite tripsinizzazione e trattate con soluzione ipotonica composta da cloruro di potassio 0.075M e sodio citrato in proporzione 1:1 per 20 minuti a 37° C e con soluzione fissativa per 30 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati poi colorati in una soluzione di mostarda di Quinacrina ed osservati al microscopio a fluorescenza. Le metafasi sono state fotografate utilizzando un obiettivo ad immersione 100X e successivamente analizzate attraverso il programma CromoWin® per la ricostruzione del cariotipo.

#### **5. LINFOBLASTI**

L'allestimento ed il trattamento dei linfoblasti sono stati effettuati all'Istituto Neurologico Carlo Besta, mentre sono state valutate nel Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale San Gerardo le rotture cromosomiche e cromatiniche indotte dai trattamenti.

Inizialmente sono state allestite otto prove parallele utilizzando per linfoblasti di controllo diverse concentrazioni di Colcemid (0.1 o 0.2 µg/ml) con tempi di incubazione diversi (15',

30', 1h, 2h) per valutare quale trattamento garantisse il maggior numero di metafasi e la migliore qualità delle stesse. Per tutte le prove è stato eseguito il medesimo protocollo di allestimento, in modo che l'unica variabile fosse l'arresto del ciclo cellulare. Il trattamento migliore è stato ottenuto somministrando Colcemid alla concentrazione di 0.1 µg/ml per 1 ora, dal momento che sono state osservate metafasi di buona qualità e non immerse nel citoplasma. Successivamente sono state allestite diverse prove parallele utilizzando linfoblasti di controllo per valutare le rotture indotte da varie concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mM per 30') e bleomicina (0, 1, 5, 30, 100 µg/ml per 90'). Sono stati poi allestiti i medesimi trattamenti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e bleomicina per le pazienti DSG, GR e GM.

## 6. ARRAY-CGH

Il cariotipo molecolare è stato eseguito attraverso l'ibridazione genomica-comparativa su *array* (array-CGH) utilizzando microarray *Human Genome kit 4x44K* o *8x60K* (Agilent Technologies). Entrambi i formati utilizzati contengono sonde oligonucleotidiche (60-mer) distribuite in regioni codificanti ed intergeniche dell'intero genoma disegnate sulla versione del Genoma Umano hg18, ma differiscono per la quantità di sonde, infatti il kit 44K ne contiene circa 44000 con risoluzione spaziale media di circa 130 Kb, mentre il secondo circa 60000 con risoluzione spaziale media di 41,5 Kb. L'analisi è stata effettuata dalla Dottoressa Serena Redaelli seguendo il protocollo fornito dal produttore.

Questa tecnica prevede l'ibridazione competitiva del DNA da testare e di un DNA normale di riferimento (Promega), marcati con fluorocromi diversi, per il legame alle sonde oligonucleotidiche.

Gli array sono stati scansionati alla risoluzione di 2 µm attraverso lo scanner dedicato e analizzati utilizzando i software *Feature Extraction v10.5* che estrapola i dati dell'emissione di fluorescenza di ogni singola sonda convertendoli in valori numerici e l'algoritmo *ADM2 (Aberration Detection Method 2)* di *DNA Analytics v4.0* che fornisce informazioni sulla variazione del numero di copie (CNV, Copy Number Variation) dopo che è stata impostata la soglia (threshold) e la media minima assoluta del rapporto tra le emissioni di fluorescenza (log<sub>2</sub> ratio). La presenza di CNV viene segnalata qualora intervalli di tre o più sonde adiacenti si discostino in positivo (gain) o in negativo (loss) dal valore del log<sub>2</sub> ratio.

Il livello di mosaicismo viene espresso in percentuale mediante l'utilizzo della seguente formula: % =  $(|2^{\log_2 \text{ratio}} - 1|) / 0,5 \times 100$ .

## 7. SOLUZIONI

- CLORURO DI POTASSIO: sciogliere 0.56 g di KCl in 100 mL di acqua sterile
- ACIDO ACETICO ACQUOSO: aggiungere a 92 mL di acqua sterile 5 mL di acido acetico glaciale e 3 mL di alcol metilico
- FISSATIVO: soluzione di alcol metilico ed acido acetico in proporzione 3:1
- MOSTARDA DI QUINACRINA: sciogliere 5 mg di soluzione madre di quinacrina idrocloruro in 100 mL di acqua sterile e conservare a +4°C al buio
- TAMPONE McILVAINE: sciogliere 3.8 g di acido citrico monoidrato e 29.15 g di fosfato bisodico diidrato in 1 litro di acqua sterile
- SODIO CITRATO: sciogliere 1 g di sodio citrato tribasico biidrato in 100 mL di acqua sterile
- RPMI 1640+20%FCS: aggiungere a 100 mL di terreno RPMI 1640 25 mL di siero fetale ed 1 mL di L-glutammina 200 mM
- FCS+ANTIBIOTICI: aggiungere a 100 mL di siero 1 mL di penicillina ( $2 \times 10^5$  UI/mL) e 500  $\mu$ L di streptomina ( $2 \times 10^5$  UI/mL) in modo da non permettere la crescita batterica

*Risultati*



Dati recenti presenti in letteratura hanno suggerito un possibile ruolo della proteina tau nell'organizzazione della cromatina (Rossi G, 2008). In pazienti con mutazione P301L in *MAPT* ed affetti da demenza frontotemporale (FTD) è stata infatti riscontrata un'alta fragilità cromosomica, rappresentata da breaks e gaps distribuiti su tutti i cromosomi.

Per verificare se i risultati ottenuti fossero dovuti unicamente alla mutazione in esame, si è deciso di ampliare l'analisi a pazienti con mutazioni diverse arruolati presso il Dipartimento di Neuropatologia dell'Istituto Carlo Besta di Milano diretto dal Prof. Fabrizio Tagliavini.

## 1. LINFOCITI PERIFERICI

In seguito a coltura di sangue intero ed allestimento per il preparato cromosomico secondo le procedure in uso nel Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale San Gerardo, sono state analizzate in totale 1302 metafasi ottenute da 13 pazienti e 1589 metafasi da 78 controlli sani pervenuti al Laboratorio di Genetica Medica per l'analisi del cariotipo in seguito a problemi riproduttivi. Per la paziente DSG con mutazione P301L è stato possibile analizzare 5 prelievi effettuati in diversi periodi nell'arco di tre anni.

Sono state quindi confrontate attraverso il test statistico *t* di Student le frequenze delle metafasi con lesioni strutturali (rottture o *breaks*, lesioni acromatiche o *gaps*, traslocazioni, delezioni, inversioni, riarrangiamenti) e perdite/guadagni clonali (presenti in più di tre metafasi) dei pazienti e dei controlli, riportate nella tabella sottostante nella colonna % cellule con lesioni.

PAZIENTE	MUTAZIONE	ETÀ ESORDIO	N. METAFASI	% CELLULE CON LESIONI
DSG ♀	P301L	49	252 <sup>1</sup>	33.3
DI ♀	P301L	55	50	30
RA ♀	P301L	43	53	26.4
GS ♂	P301L	presint (51)	100	25
GG ♀	V363I	55	100	28
MMC ♀	V363I	54	100	23
IN ♂	G335S	22	100	1
CN ♂	ΔN296	36	50	10
CG ♂	D418N	60	99	21
DM ♀	G366R <sup>3</sup>	57	100	24
TE ♂	I10+16 C-T <sup>3</sup>	46	100	14
EP ♂	P364S <sup>3</sup>	50	100	27
ES <sup>2</sup> ♂	P364S <sup>3</sup>	presint (18)	98	19.4

1- metafasi ottenute da 5 diversi prelievi effettuati nell'arco di tre anni

2- figlio di EP

3- mutazioni non descritte in letteratura, delle quali si sta studiando l'effetto sulla proteina tau

SESSO CONTROLLI	RANGE ETÀ	N. METAFASI	RANGE % CELLULE CON LESIONI
♂ (n. 37)	20-62	768	0 - 31.25
♀ (n. 41)	24-62	821	6 - 31.25

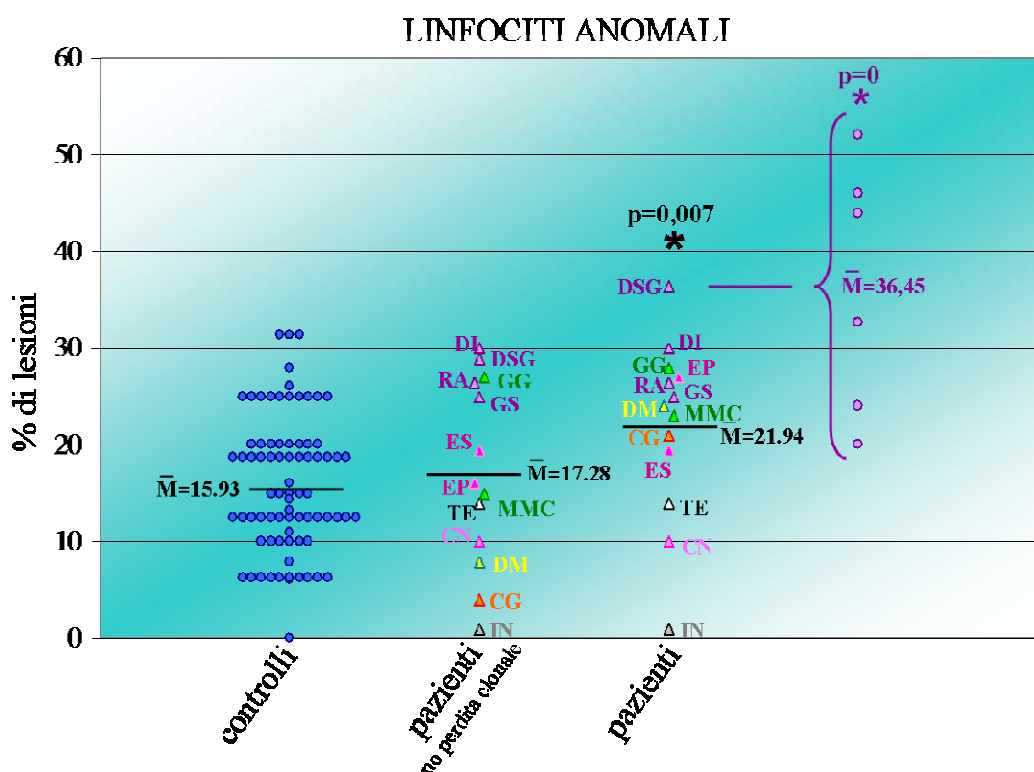


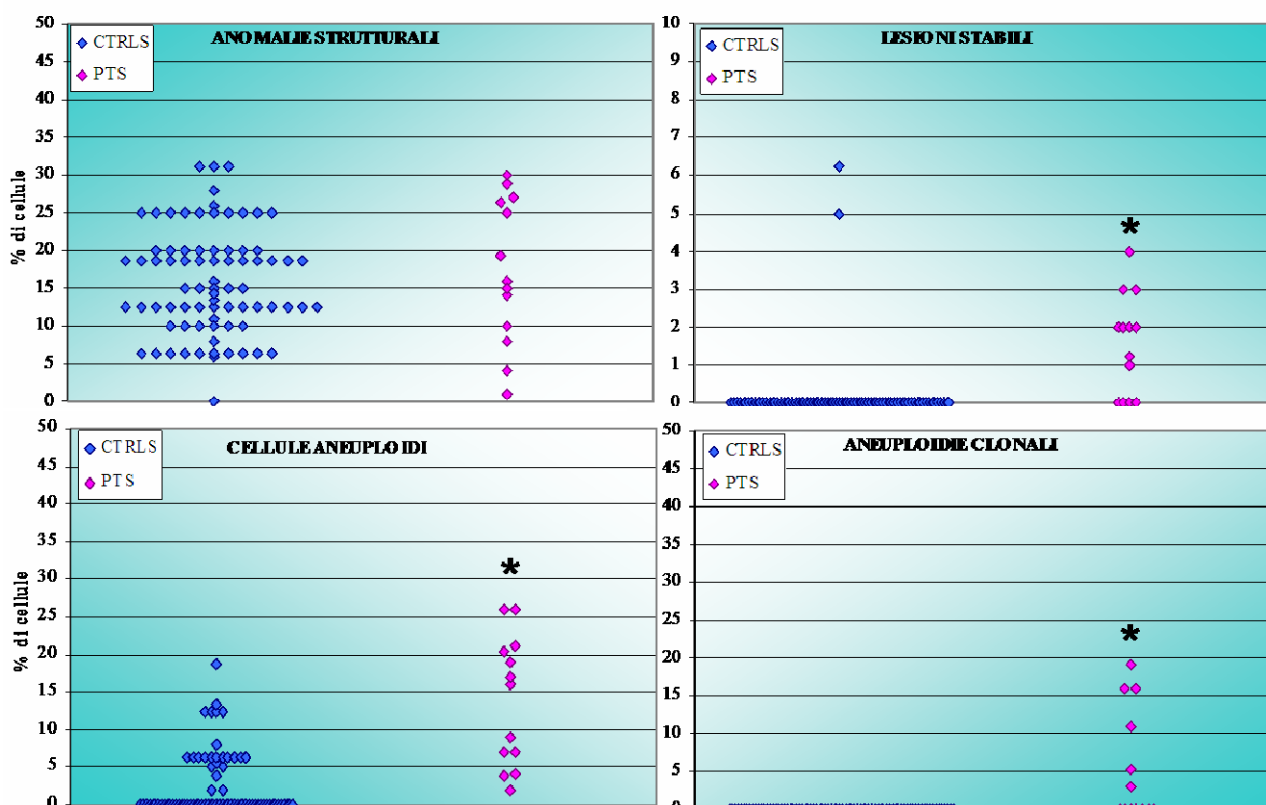
Figura 24. Distribuzione della percentuale di linfociti con lesioni in controlli e pazienti

Come si può evincere dal grafico (Figura 24), è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nelle frequenze di linfociti con lesioni stabili tra pazienti e controlli (\* $p=0.007$ ), ancora più marcata tra la paziente DSG e controlli (\* $p=0$ ). Tuttavia, se alla percentuale delle lesioni dei pazienti vengono sottratte le aneuploidie clonali che non sono riscontrate nei controlli non si ha differenza significativa (colonna centrale, figura 24). Le perdite clonali in ogni caso potrebbero essere ricondotte al ruolo di tau nell'organizzazione dei microtubuli e di conseguenza del fuso mitotico e, in quanto mutata, malfunzionante. Rispetto ai controlli, i pazienti hanno mostrato alta fragilità cromosomica distribuita su tutti i cromosomi, difetti del fuso mitotico e della condensazione (ad esempio fibre e *bridge* cromatinici) e nuclei anomali, in accordo con i risultati già presentati in letteratura (Rossi G, 2008). Nei pazienti MMC, DSG, RA, DM e CG, oltre alla perdita casuale o clonale di cromosomi, ne è stato osservato anche l'acquisto casuale o clonale che non è stato osservato nei controlli. Per alcuni pazienti è stata osservata un'alta percentuale di aneuploidie clonali. Due esempi significativi sono il paziente CG, per il quale è stata osservata la perdita clonale dei cromosomi 18, 19, 20, 21, 22, Y, ma anche l'acquisto clonale del cromosoma Y, e la paziente DM per la quale è stata osservata la perdita clonale dei

cromosomi 8, 14, 18, 19 e X. Va sottolineato che nel caso del paziente CG le aneuploidie clonali riguardano cromosomi di piccole dimensioni, mentre nel caso della paziente DM sono coinvolti anche cromosomi di dimensioni maggiore come l'8 e la X.

Dalla figura ... risulta evidente la bassa percentuale di lesioni osservate nel paziente IN (1%), accompagnata tuttavia da un'elevata frequenza di separazione prematura dei cromatidi (*pcs*, *premature chromatid separation*) e dalla presenza di nuclei e cromosomi con fibre cromatiniche.

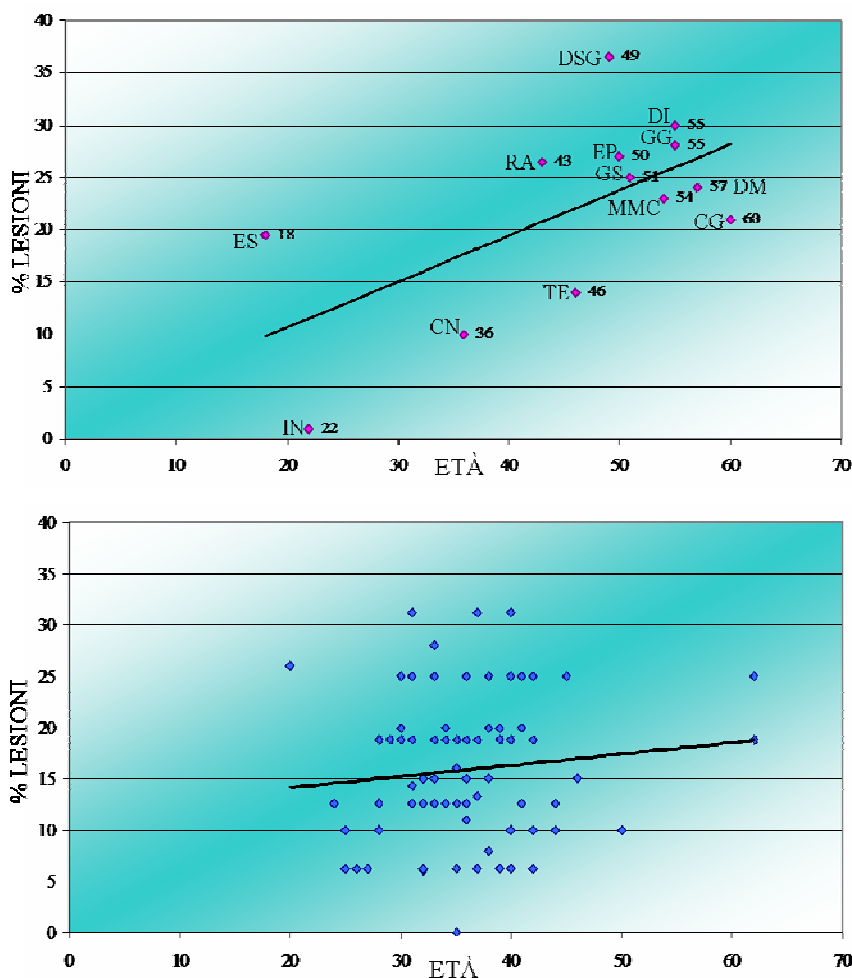
Nei grafici seguenti vengono riportate le percentuali di anomalie strutturali (rotture o *breaks*, *gaps*, traslocazioni, delezioni, inversioni, riarrangiamenti), di lesioni stabili (anomalie strutturali con l'esclusione dei *gaps*), di cellule aneuploidi (perdite e guadagni di cromosomi osservati in una o più metafasi) e di cellule con aneuploidie clonali (perdite e guadagni di cromosomi osservati in più di tre metafasi) per i controlli (blu) e per i pazienti (rosa).



Come è possibile notare, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nel numero di anomalie strutturali, mentre considerando le lesioni stabili, le cellule aneuploidi e le aneuploidie clonali si ottiene un p-value pari a 0.

Risulta evidente che i controlli non presentano aneuploidie clonali e lesioni stabili, fatta eccezione per due soggetti in cui sono state osservate una traslocazione ed una inversione (la percentuale risulta elevata dal momento che vengono considerate solo 16 metafasi).

Nelle figure seguenti è invece riportata la distribuzione delle lesioni in base all'età per pazienti e controlli:



Come si può osservare, i pazienti mostrano una netta tendenza all'aumento delle lesioni con l'aumentare dell'età, probabilmente dovuto all'accumulo di errori causati dalla disfunzione della proteina mutata, mentre i controlli mostrano frequenze più simili nelle fasce di età prese in considerazione, che tuttavia non coincidono con quelle dei pazienti.

Se non vengono considerati i pazienti più giovani (IN, ES e CN), si assiste ad una distribuzione delle frequenze di cellule con lesioni molto simile a quella osservata nei controlli. Va comunque sottolineata la grande differenza nella percentuale di lesioni tra i due soggetti più giovani, IN (età 22 anni, mutazione G335S) ed ES (18 anni, mutazione P364S): quest'ultimo, pur essendo asintomatico, mostra un'elevata percentuale di lesioni rispetto a IN che risulta affetto da demenza frontotemporale.

Di seguito vengono mostrati alcuni esempi delle anomalie osservate nei pazienti.

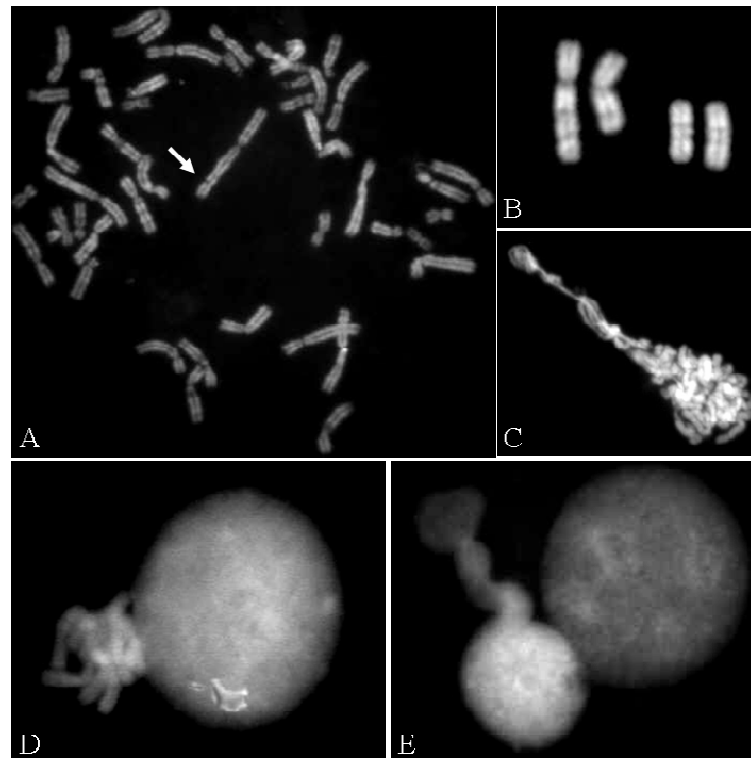


Figura 25: A:esempio di metafase con ctb2q indicato dalla freccia (GG); B: cromosoma 10 normale, del10(q), 2 frammenti acentrici 10q (DI); C: cromosomi decondensati con membrana nucleare rotta (RA); D,E: esempi di nuclei anomali (DSG, GG)

È stata poi analizzata la distribuzione dei punti di rottura cromosomici (verde) e cromatidici (viola) per verificare eventuali "hot spot" di fragilità che possano essere correlati alla patologia. Come si può osservare in Figura 26, appare evidente che sono presenti delezioni unicamente nei pazienti (rappresentati sul lato destro dei cromosomi) e che le rotture si distribuiscono in tutti i cromosomi senza un'apparente concentrazione in punti specifici. Tuttavia, per alcuni cromosomi (18, 20, 21, Y), sono presenti rotture unicamente nei pazienti e non nei controlli.

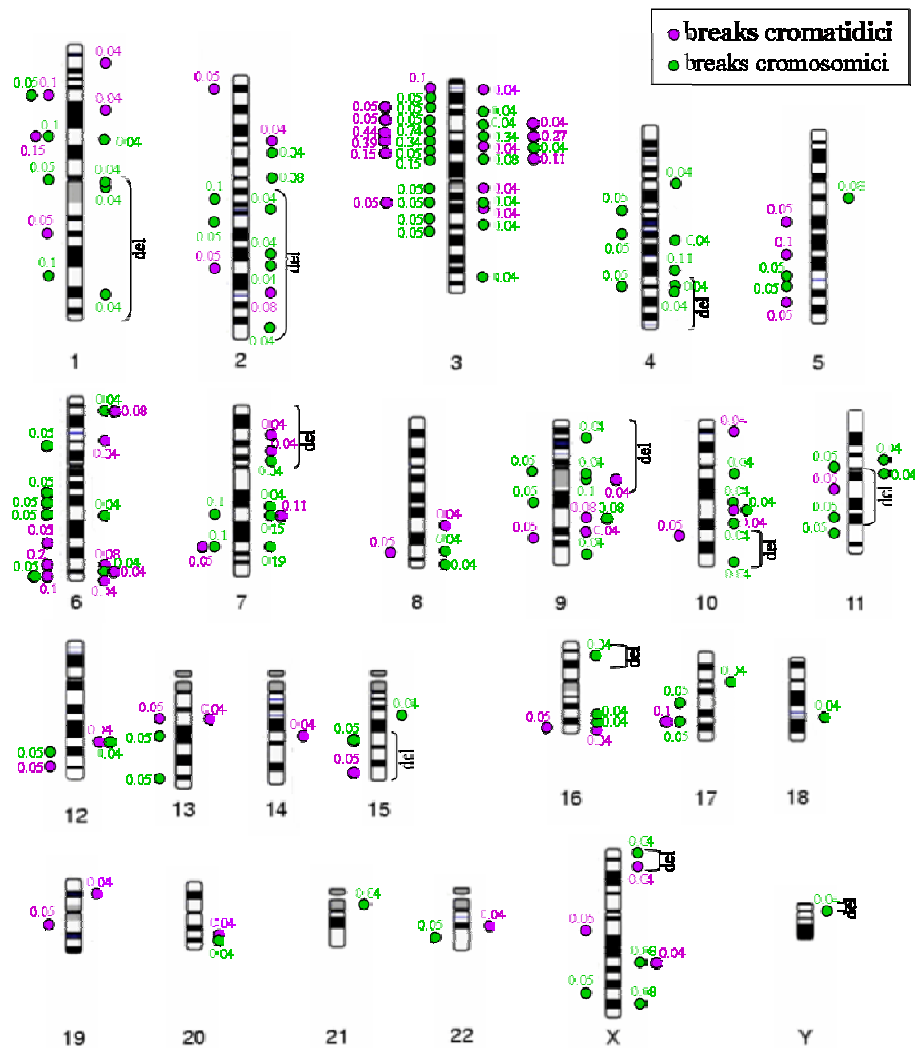


Figura 26. Confronto della distribuzione delle rotture cromosomiche e cromatidiche in 2024 cromosomi omologhi di 57 controlli (sinistra) e 2606 cromosomi omologhi di 13 pazienti (destra)

Il quadro che si ottiene dalla figura 26 è piuttosto complesso. Si è quindi deciso di considerare unicamente le rotture cromosomiche (che avvengono su entrambi i filamenti di DNA, mostrate in verde) e di scartare i siti di rottura condivisi da controlli e pazienti. I siti non condivisi sono stati successivamente confrontati con i siti fragili descritti in letteratura (Giardino D, 2009) come mostrato nella figura 27.

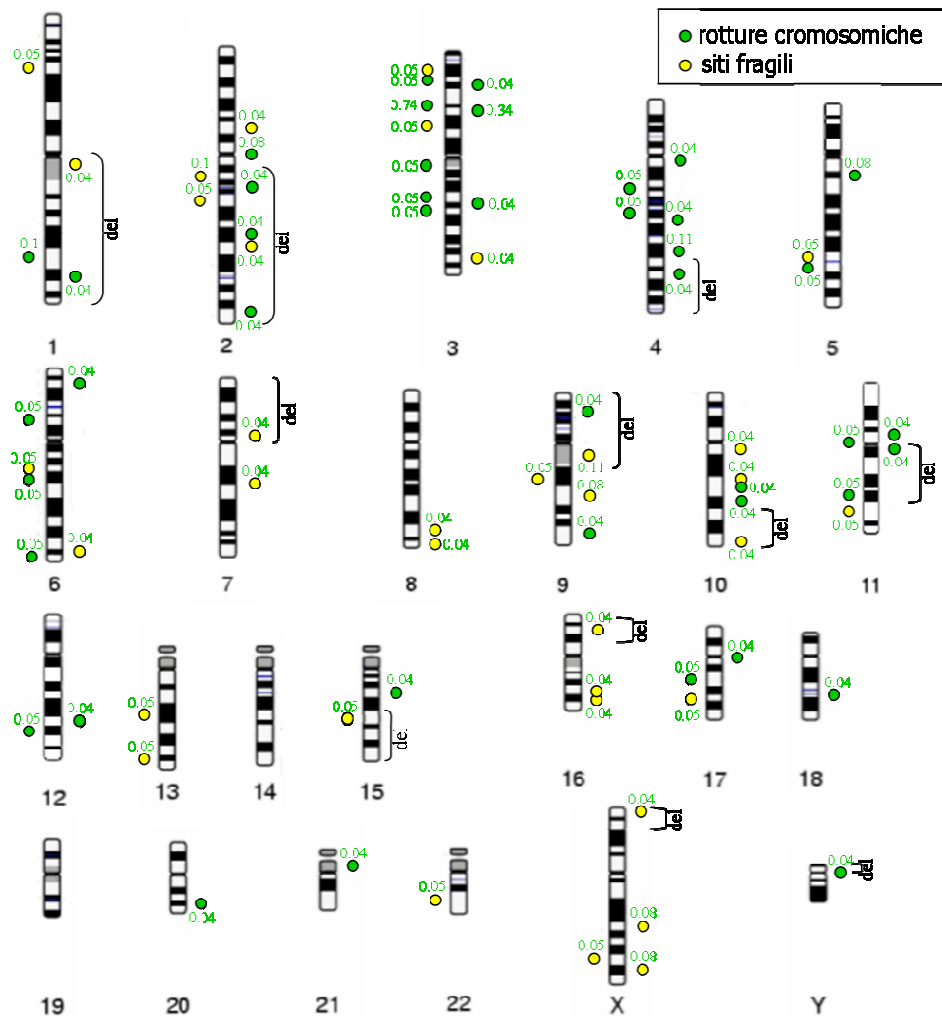


Figura 27. Analisi della distribuzione dei siti di rottura cromosomica (in verde) osservati nei controlli (a sinistra dei cromosomi) e nei pazienti (a destra) e confronto con i siti fragili descritti in letteratura.

Quello che emerge dalla figura 27 è che i controlli mostrano 31 siti di rottura sparsi sui cromosomi, 15 dei quali (pari al 48.4%) corrispondono a siti fragili, mentre i pazienti mostrano 47 siti di rottura, 20 dei quali (pari al 42.5%) corrispondono a siti fragili.

Valutando la posizione, è possibile osservare che si trovano entro un terzo del cromosoma rispetto al centromero 8 siti nei controlli (25.8%) e 13 nei pazienti (27.7%).

Solo per il cromosoma 22 è stata osservata una rottura cromosomica nei controlli e non nei pazienti, mentre vale il contrario per i cromosomi 7, 8, 18, 20, 21 e Y.

Inoltre, i cromosomi 2, 4, 9, 10, 16 e X mostrano un maggior numero di siti di rottura cromosomica nei pazienti rispetto ai controlli.

## 2. FIBROBLASTI

È stato possibile analizzare le biopsie cutanee effettuate a pazienti con mutazione P301L (DSG, GR, RA, DI), V363I (GG), G389R (CA), G335S (IN), I10+3 (RoA), D418N (CG), P364S

(EP) e G366R (DM). I fibroblasti ottenuti da tali biopsie sono stati mantenuti in coltura in terreno RPMI 1640 + 20% FCS e tripsinizzati periodicamente. In seguito al trattamento con Colcemid per 4 ore, sono stati allestiti i preparati cromosomici da fibroblasti a diversi passaggi di coltura per tutti i pazienti ed analizzate un totale di 1177 metafasi. Per alcune metafasi non è stato possibile ricostruire il cariotipo a causa della scarsa qualità che ha permesso unicamente la valutazione di aberrazioni numeriche. È stato inoltre possibile analizzare un totale di 914 metafasi ottenute da fibroblasti di 17 soggetti di età compresa tra 2 e 71 anni come controllo.

Nei seguenti grafici vengono riassunti i dati ottenuti considerando gli stessi parametri applicati ai linfociti periferici ed analizzati statisticamente utilizzando il test *t* di Student.



A differenza di ciò che è stato osservato nei linfociti, nel caso dei fibroblasti non si ha differenza statisticamente significativa unicamente considerando le aneuploidie clonali che risultano distribuite in modo simile, con valori molto elevati unicamente nella paziente DM ai passaggi 3 e 6, dovuti alla presenza di trisomia del cromosoma 10.

Nella tabella seguente vengono riportati dati nel dettaglio:

<i>Anom. strutt.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Media</i>	<i>Lesioni stabili</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Media</i>
<i>Ctrl</i> s	0	8.5 (FA)	2.4	<i>Ctrl</i> s	0	4.2 (FA)	0.54
<i>Pts</i>	0	26.7 (IN)	7	<i>Pts</i>	0	18.2 (RA)	3.6
<i>Aneuploidie</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Media</i>	<i>An. clonali</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Media</i>
<i>Ctrl</i> s	5.9 (ZF)	40 (BV)	16	<i>Ctrl</i> s	0	24 (BA)	6
<i>Pts</i>	2.7 (CA)	90,6 (DM)	36.2	<i>Pts</i>	0	88.2 (DM)	13.4



Sono stati osservati nei pazienti traslocazioni, perdite e trisomie clonali, cromosomi derivativi e la separazione prematura dei cromatidi fratelli (pcs).

I fibroblasti del paziente CA al quarto passaggio di coltura non hanno presentato significative anomalie di numero o struttura, lasciando supporre che la mutazione G389R non comporti gravi conseguenze nella stabilizzazione cromatinica.

Per la paziente DM è stata osservata la trisomia del cromosoma 10 nel 71.7% delle metafasi ottenute dal terzo passaggio di coltura e nell'82.3% dal sesto passaggio e l'inversione del cromosoma 12 rispettivamente nel 9.4% e 7.8% delle cellule.

In alcuni casi (GR, DSG, RA, DM, CG) sono state inoltre riscontrate diverse fibre cromatiniche che fuoriuscivano da cromosomi o da nuclei, "bridge" cromatinici, cromosomi decondensati e anomalie nel fuso mitotico associate a cromosomi disallineati.

Questi risultati supportano ulteriormente il coinvolgimento della proteina tau nell'organizzazione cromatinica e nella stabilità cromosomica.

Di seguito vengono mostrati alcuni esempi delle anomalie osservate nei pazienti.

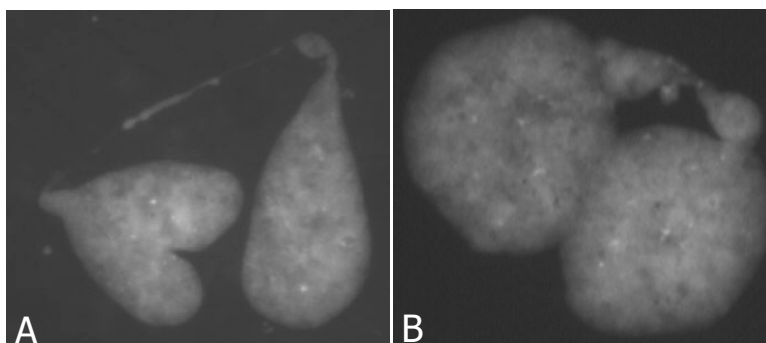


Figura 28: nuclei anomali e fibra cromatinica (A) e bridge cromatinico (B) osservati nei fibroblasti p8 della paziente RA

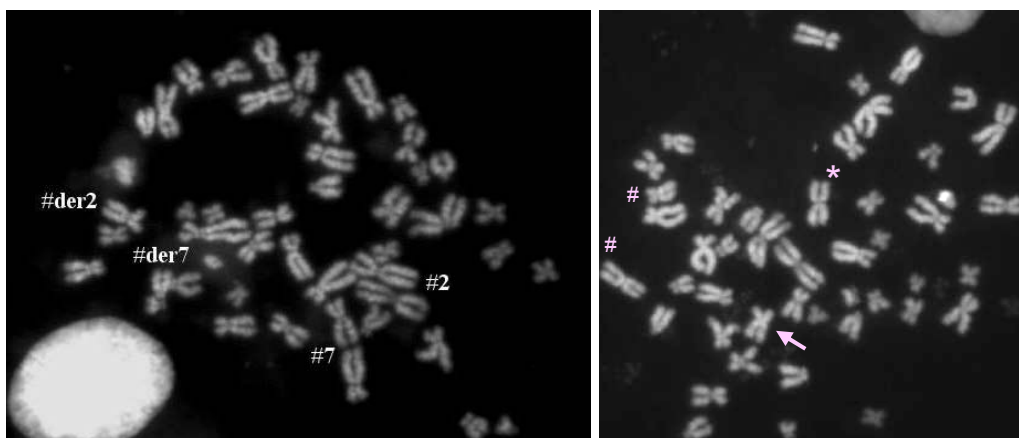


Figura 29: esempi di traslocazioni osservate nei pazienti. A sinistra:  $t(2;7)(q11.2;q22)$  osservata nel 12.2% delle cellule di DI al p2; a destra  $t(3cen;10cen)$  indicata dalla freccia, cromosoma derivativo (\*) e cromosomi 3 e 10 normali (#) osservati nel 17.8% delle cellule di IN p4.

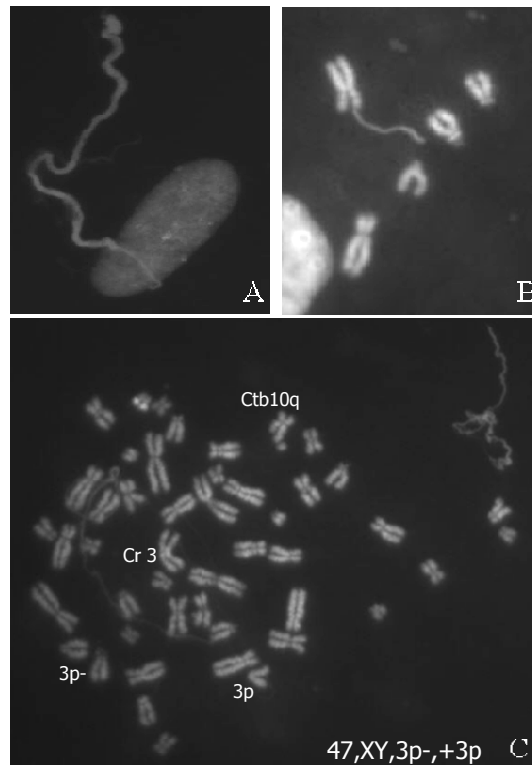


Figura 30: in A nucleo con fibra cromatinica (fibroblasti p4, EP); in B cromosoma con fibra (fibroblasti p9, DSG); in C metafase con fibre, rottura cromatidica del cromosoma 10 (ctb10q), delezione del cromosoma 3p (3p-) e guadagno del 3p (fibroblasti p4 EP)

Nella tabella seguente vengono riassunti i dati ottenuti dall'analisi dei fibroblasti di pazienti e controlli.

Legenda:

*Random loss/gain*: perdita/guadagno casuale di cromosomi

*del*: delezione

*t*: traslocazione

*der*: cromosoma derivativo

*pcs*: separazione prematura dei cromatidi

*mar*: cromosoma marcatore

*min*, *dmin*: frammento acentrico minuto, doppio frammento acentrico minuto

*inv*: inversione

*ace*: frammento acentrico

*rea*: riarrangiamento

PAZIENTI			ANOMALIE NUMERICHE				ANOMALIE STRUTTURALI		
Paziente	Pass.	N. Meta	% Random Loss	% Random Gain	% Anomalie Clonali		Tipo	% Breaks	% Gaps
<b>GR (P301L)</b>	p9	27	40.7	7.4	/		fibre	/	/
	p11	9	66.7	/	/		/	/	/
<b>DSG (P301L)</b>	p7	61	21.3	8.2	+21 -7 -13 -19 -21	3.3 3.3 3.3 3.3 8.2	del10 t(X;14),derX,der14 del5p	3.3	/
	p9	96	25	7.3	-16 -X	2.1 2.1	fibre	3.1	/
	p10	54	24.1	9.2	-20	3.7	t(16p;20q) pcs (2 meta)	7.4	/
<b>RA (P301L)</b>	p4	53	9.4	/	-19	7.5	mar	7.5	5.7
	p7	44	15.9	6.8	-19 -20 -21 -22	4.5 6.8 4.5 11.4	dmin,min (3 meta) der(1),der(15) t(14p;18q) mar inv(1p;1q) t(1q;5p) del7q ring del5q+ace	/	/
	p8	52	42.3	1.9	-5 -7 -9 -18 -20 -21 -22	3.8 9.6 3.8 9.6 7.7 7.7 9.6	del1q del6q fibre	/	/
	p12	27	29.6	3.7	/	/	pcs	3.7	/
	<b>DI (P301L)</b>	p2	49	20.4	/	t(2;7) -16	12.2 6.1	rea6	/
<b>IN (G335S)</b>	p4	45	15.5	13.3	t(3;10) -21	17.8 4.4	rea(1)	2.2	4.4

<b>RoA (I10+3)</b>	p?	52	5.7	5.7	<b>-19</b> <b>-22</b>	9.61 3.8	del(1q)+ace	1.9	3.8
<b>GG (V363I)</b>	p3	11	18.2	/	/	/	/	/	/
	p4	46	6.5	/	<b>-13</b> <b>-20</b> <b>-22</b>	4.3 6.5 4.3	/	/	/
	p6	89	7.9	7.9	<b>-17</b> <b>-22</b>	2.2 3.4	del20p,del7q del3q	2.2	3.4
	p8	50	12	8	<b>-7</b>	4	del12q + ace	4	/
	p9	37	24.3	16.2	/	/	pcs (1 meta)	/	/
<b>CA (G389R)</b>	p4	74	2.7	/	/	/	pcs (1 meta)	/	/
<b>CG (D418N)</b>	p?	61	16.4	9.8	/	/	<b>1ph (100%)</b> fibre; min	1.6	/
	p6	52	1.9	/	<b>-Y</b>	7.7%	<b>1ph (100%)</b> pcs (3 meta)	3.8	1.9
<b>DM (G366R)</b>	p3	53	13.2	1.9	<b>+10</b> <b>inv12</b> <b>-14</b> <b>-17</b> <b>-19</b> <b>-20</b> <b>-22</b>	71.7 9.4 5.6 7.5 5.6 9.4 3.8	t(5;X) fibre	7.5	/
	p6	51	3.9	/	<b>+10</b> <b>inv12</b> <b>-12</b> <b>-13</b> <b>-16</b> <b>-21</b>	86.3 7.8 3.9 3.9 3.9 3.9	2 ace (1 meta)	3.9	/
<b>EP (P364S)</b>	p4	51	7.8	2	<b>-22</b>	7.8	fibre	2	/
	p7	16	6.2	/	<b>-10</b> <b>-16</b>	12.5 12.5	/	6.2	/
	p8	17	23.5	/	/	/	/	/	/

CONTROLLI			ANOMALIE NUMERICHE				ANOMALIE STRUTTURALI		
<i>Controllo</i>	<i>Pass.</i>	<i>N. Meta</i>	<i>% Random Loss</i>	<i>% Random Gain</i>	<i>% Anomalie Clonali</i>		<i>Tipo</i>	<i>% Breaks</i>	<i>% Gaps</i>
<b>ZF</b>	p8	68	2.9	/	<b>-22</b>	2.9	t(9 ;14) pcs	1.5	4.4
	p12	49	6.1	/	/	/	pcs	/	/
<b>UF</b>	p3	64	6.2	3.1	<b>-20</b>	4.7	/	/	/
<b>GM</b>	p?	50	6	/	/	/	/	/	/
<b>M</b>	p4	50	6	/	/	/		/	/
<b>LL</b>	p8	52	3.8	/	<b>-20</b>	3.8		1.9	/
<b>G</b>	p+2	50	6	/	<b>-15</b>	4	pcs	/	/
					<b>-22</b>	4			
<b>RM</b>	p6	48	8.3	/	/	/		2.1	/
<b>LM</b>	p6	53	5.6	/	<b>-19</b>	3.8		/	/
					<b>-20</b>	3.8			
<b>FA</b>	p6	47	8.5	/	<b>-X</b>	4.2	del10q t(1;11)	6.4%	/
					<b>-18</b>	4.2			
					<b>-19</b>	4.2			
					<b>-21</b>	4.2			
<b>FG</b>	p6	45		/	<b>-20</b>			/	/
<b>CE</b>	p7	50	6%	/	/	/		/	/
<b>BA</b>	p7	39	20.5%	/	/	/		/	/
<b>BB</b>	p6	49	4.1%	2%	/	/		/	/
<b>BV</b>	p5	50	18%	/	<b>-19</b>	4%	t(11q;Yp) del5 ace	2%	/
					<b>-20</b>	6%			
					<b>-21</b>	10%			
					<b>-22</b>	10%			
					<b>-Y</b>	4%			
<b>BA</b>	p4	50	6%	/	<b>-10</b>	4%	ace	4%	2%
					<b>-16</b>	8%			
					<b>-18</b>	4%			
					<b>-19</b>	4%			
					<b>-21</b>	4%			
					<b>-22</b>	8%			
<b>DN</b>	p12	50	32%	2%				2%	2%
<b>SJ</b>	p4	50	20%	2%	<b>-16/-20</b> <b>-22</b>	4% 6%	pcs (2 meta)	4%	2%

### 3. LINFOBLASTI

Per valutare se la proteina tau sia coinvolta in meccanismi di riparo del DNA, abbiamo deciso di trattare i linfoblasti di tre pazienti con mutazione P301L (GR, GM, DSG) con le sostanze genotossiche  $H_2O_2$  e bleomicina.

L'  $H_2O_2$  è un agente ossidante che reagisce con le basi azotate e con lo scheletro di ribosiofosfato del DNA, inducendo la rottura a singolo filamento riparata attraverso l'attivazione degli enzimi catalasi o glutatione perossidasi o dei citocromi mitocondriali (Anderson D, 1999). La bleomicina invece è un chemioterapico radiomimetico che attacca i gruppi desossiribosio in entrambi i filamenti di DNA inducendo rotture e conseguente apoptosi. In questo caso il riparo del danno al DNA avviene attraverso l'attivazione dell'enzima DNA polimerasi (Lee R, 2004)

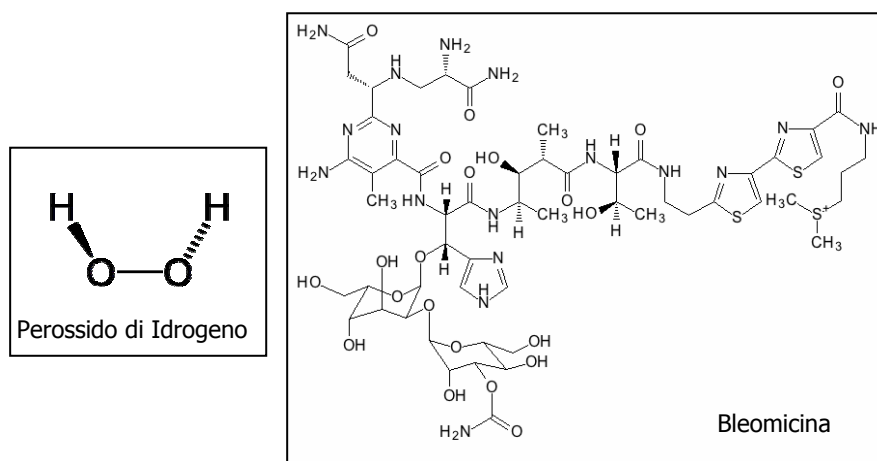


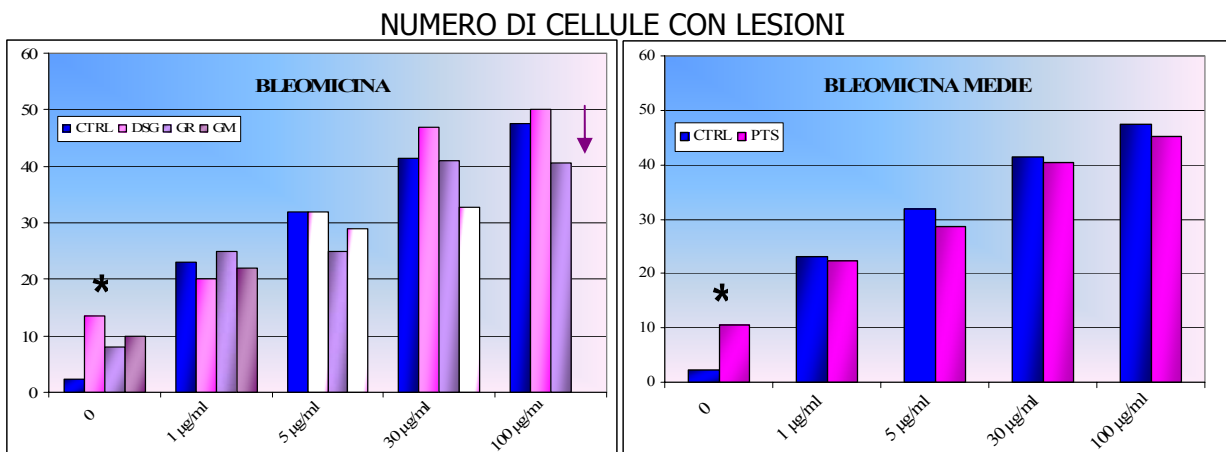
Figura 31. Struttura chimica di Perossido di Idrogeno e Bleomicina

È stata quindi messa a punto la metodica di trattamento ed analisi di tali cellule al fine di ottenere la migliore qualità delle metafasi per valutare le rotture cromosomiche indotte dalle sostanze utilizzate.

Sono state considerate 50 metafasi per ogni trattamento con  $H_2O_2$  (concentrazioni 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mM per 30 minuti) e bleomicina (0, 1, 5, 30, 100  $\mu\text{g/ml}$  per 90 minuti) nei controlli, mentre per le pazienti non è sempre stato possibile ottenere tale numero, soprattutto alle dosi elevate dei trattamenti. È stato inoltre valutato l'indice mitotico (numero di metafasi/1000 nuclei) per ogni trattamento per verificare un eventuale blocco del ciclo cellulare.

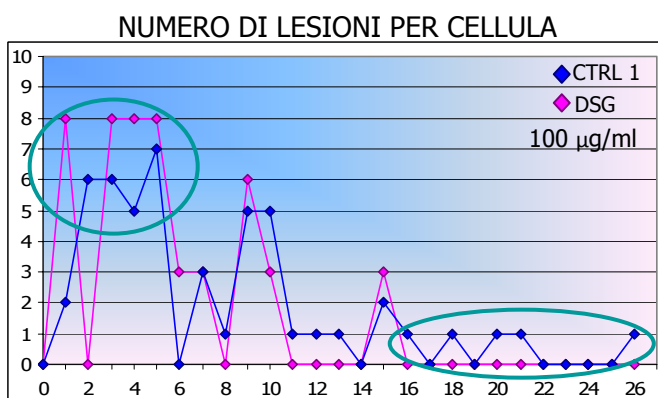
#### 3.1 Bleomicina

Nei grafici di seguito viene riportato sull'asse delle ordinate il numero di cellule con lesioni, mentre sull'asse delle ascisse la concentrazione del trattamento. Sono stati analizzati un controllo (CTRL1) e tre pazienti con mutazione P301L (DSG, GR, GM).



Confrontando il numero di cellule con lesioni, è stata osservata una differenza significativa solo nelle cellule non trattate (bleomicina 0 µg/ml), mentre per le dosi più alte dei trattamenti è stato riscontrato un minor numero di cellule con lesioni nelle pazienti, probabilmente spiegabile con aumento di morte cellulare e/o blocco del ciclo cellulare. Risulta evidente dal grafico che per la paziente GM non è stato possibile ottenere un numero sufficiente di metafasi da analizzare alla dose più alta del trattamento con bleomicina come indicato dalla freccia, probabilmente per una maggiore suscettibilità all'agente utilizzato in termini di blocco mitotico.

Nei grafici di seguito riportati viene mostrato per il controllo e solo per la paziente DSG sull'asse delle ordinate il numero di cellule, mentre sull'asse delle ascisse il numero di lesioni per cellula osservate nel trattamento con la dose più elevata (bleomicina 100 µg/ml). La stessa tendenza è stata osservata per la paziente GR, mentre per la paziente GM non è stato possibile ottenere un numero sufficiente di metafasi analizzabili.



Come è possibile notare, nelle pazienti sono presenti un maggior numero di cellule con poche lesioni, probabilmente a causa dell'aumento nel numero di metafasi non valutabili perché composte da frammenti cromatinici non organizzati in cromosomi, mostrate in figura 32.

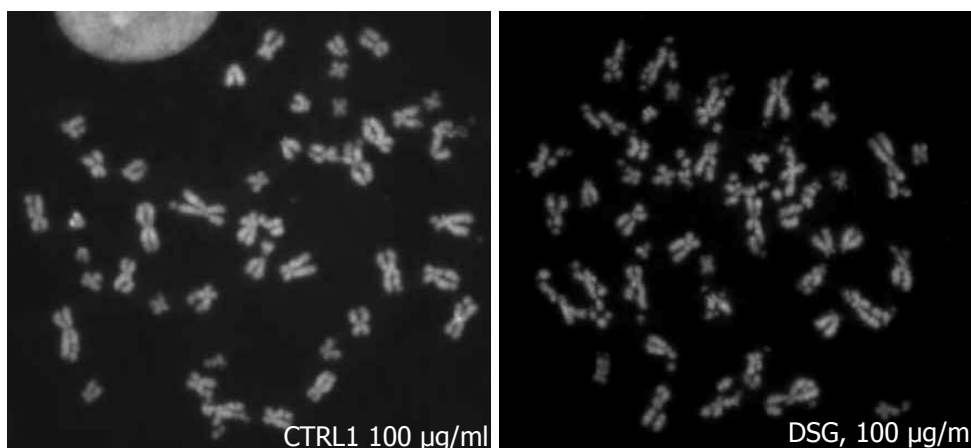
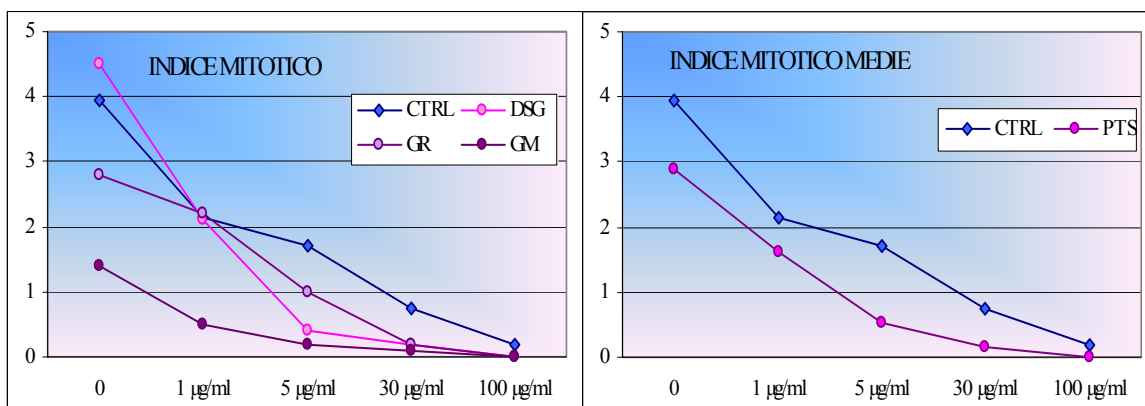


Figura 32. Confronto tra metafasi osservate nel controllo e in DSG alla concentrazione più elevata del trattamento con bleomicina.

Come atteso si è osservata anche una tendenza alla diminuzione dell'indice mitotico, più evidente nei pazienti, con un minimo corrispondente al trattamento più elevato sia nelle pazienti che nel controllo (IM<0.1 nella paziente GM, mentre nel controllo IM=0.2). Risulta evidente il basso indice mitotico osservato per la paziente GM che spiega il perché non siano state osservate un numero sufficiente di metafasi per l'analisi della concentrazione più alta di trattamento.



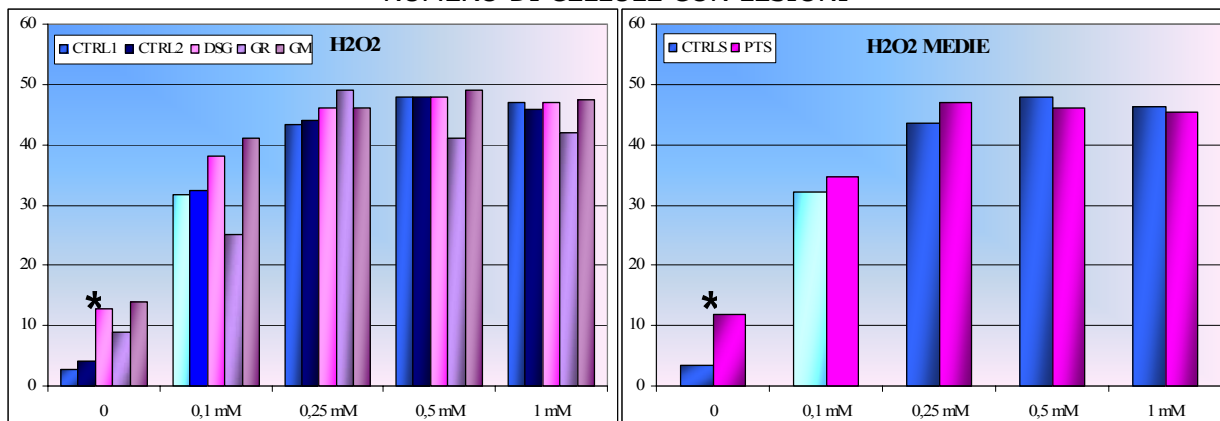
### 3.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Nei grafici di seguito viene riportato sull'asse delle ordinate il numero di cellule con lesioni, mentre sull'asse delle ascisse la concentrazione del trattamento. Sono stati analizzati due controlli (CTRL1, CTRL2) e tre pazienti con mutazione P301L (DSG, GR, GM).

Anche con questo agente, confrontando il numero di cellule con lesioni è stata osservata una differenza significativa solo nelle cellule non trattate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0 mM), ma a differenza della bleomicina il numero di cellule con lesioni è simile tra controlli e pazienti per i trattamenti alle dosi elevate di 0.5 mM e 1 mM. Le pazienti DSG e GM mostrano un numero di cellule con lesioni simile, mentre la paziente GR si discosta da questa tendenza.

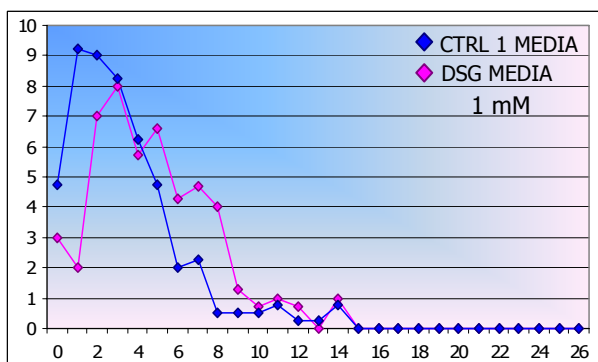


NUMERO DI CELLULE CON LESIONI



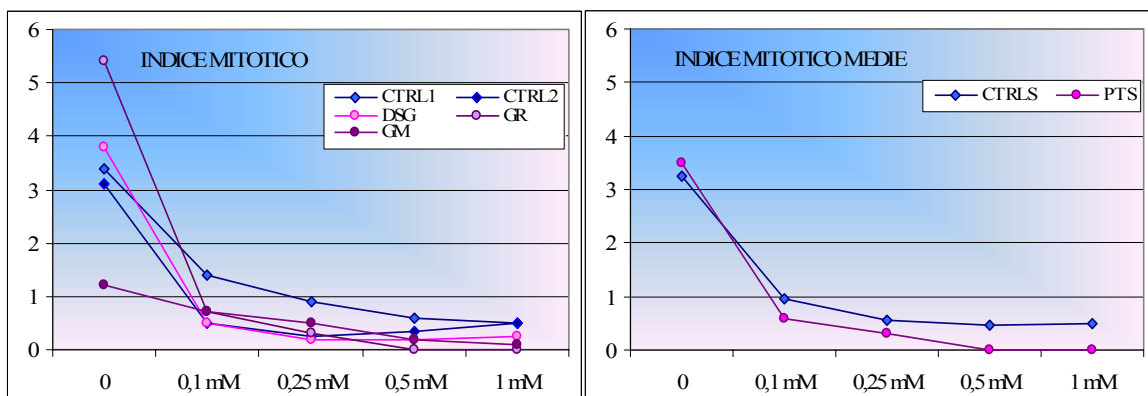
Nei grafici di seguito viene mostrato per il controllo 1 e per la paziente DSG sull'asse delle ordinate il numero di lesioni, mentre sull'asse delle ordinate il numero di cellule.

NUMERO DI LESIONI PER CELLULA



Come è possibile notare, per la dose più alta del trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> il controllo mostra una distribuzione di lesioni con picco tra 1 e 3, mentre la paziente DSG mostra un numero maggiore di cellule con numero di lesioni compreso tra 2 e 8. Non si osservano inoltre, a differenza della bleomicina, cellule con più di 14 lesioni.

Come atteso, anche con questo agente genotossico si è osservata una tendenza alla diminuzione dell'indice mitotico con un minimo corrispondente al trattamento più elevato (IM<0.1 nella paziente GR, mentre nei controlli IM=0.5). Anche per questo trattamento risulta evidente il basso indice mitotico osservato per la paziente GM.



#### 4. array-CGH

Per avere informazioni più approfondite a livello dell'intero genoma è stata utilizzata la tecnica dell'array-CGH che prevede una competizione di un DNA di riferimento e del DNA in esame, entrambi marcati con fluorocromi diversi, per l'ibridazione ad un supporto su cui sono spottate sonde che coprono l'intera sequenza del genoma.

È stato estratto il DNA da fibroblasti a diversi passaggi di coltura di sette pazienti con diverse mutazioni e da sangue periferico di sei pazienti come riassunto nella seguente tabella:

<b>PAZIENTE</b>	<b>MUTAZIONE</b>	<b>SANGUE PERIFERICO</b>	<b>FIBROBLASTI</b>
RA	P301L	✓	p4, p8
DSG	P301L	✓	p3, p7
DI	P301L	non disponibile	p2
CA	G389R	✓	p4
GG	V363I	✓	p4, p10
DM	G366R	✓	p3, p6
EP	P364S	✓	p3, p7

La tecnica utilizzata permette di visualizzare variazioni nel numero di copie (Copy Number Variations, CNVs) in perdita (loss, rappresentato in verde) o in guadagno (gain, rappresentato in rosso).

L'analisi prevede la verifica della presenza di geni noti all'interno delle CNV attraverso l'utilizzo di UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) e della sovrapposizione a CNV descritte nel Database of Genomic Variants che raccoglie le CNV polimorfiche (<http://projects.tcag.ca/variation>) o a quelle descritte nel database DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources, <http://decipher.sanger.ac.uk>) che raccoglie anomalie cromosomiche submicroscopiche (microdelezioni e duplicazioni) di più di 6000 pazienti, per lo più pediatrici, dei quali vengono fornite anche le caratteristiche cliniche e fenotipiche. Questo database viene utilizzato per determinare se le CNV riscontrate in un paziente possano avere un significato clinico. Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti.

##### 4.1 PAZIENTE RA

Per questa paziente con mutazione P301L è stato possibile analizzare DNA estratto da sangue periferico (sp) e da fibroblasti al quarto ed ottavo passaggio di coltura (p4, p8), utilizzando due diversi formati di array che differiscono per il numero di sonde spottate sul supporto (60K per il sangue e 44K per i fibroblasti).

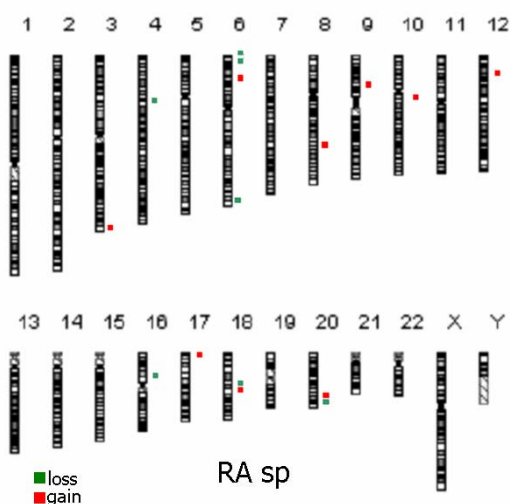
Sono state osservate in totale 20 CNV, 16 delle quali (pari al 84.2%) sono state osservate nel sangue periferico, mentre 5 (26.3%) nei fibroblasti.

Non si possono trarre informazioni dalle seguenti 6 CNV riscontrate nel sangue periferico dal

momento che si trovano in regioni non coperte dal formato dell'array utilizzato per i fibroblasti:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p4 (44K)	FIBROBLASTI p8 (44K)
4q13.1; 4 sonde; 382.6Kb	Loss eteroz mosaico 36%	No sonde nella regione	No sonde nella regione
6p25.1; 3 sonde; 105.9Kb	Loss eteroz mosaico 51%	No sonde nella regione	No sonde nella regione
6p22.3; 3 sonde; 203.8Kb	Gain, duplicazione non mosaico	No sonde nella regione	No sonde nella regione
10q11.21-q11.22; 3 sonde; 1010Kb	Gain, 4 copie non mosaico	No sonde nella regione	No sonde nella regione
12p12.1; 3 sonde; 263.1Kb	Gain, duplicazione non mosaico	No sonde nella regione	No sonde nella regione
16p11.2; 5 sonde; 980Kb	Loss eteroz mosaico 94%	No sonde nella regione	No sonde nella regione

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nel sangue come mostrato nell'immagine e riassunto nella tabella:



POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)
6q25.1; 4 sonde; 291.9Kb	Loss eteroz mosaico 52%
8q22.3; 15 sonde; 673.2Kb	Gain, duplicazione mosaico 57%
9p13.3; 5 sonde; 195.3Kb	Gain, duplicazione non mosaico
18q12.3; 3 sonde; 204.5Kb	Gain, duplicazione mosaico 73%
20q11.21; 7 sonde; 185Kb	Gain, duplicazione mosaico 89%
20q13.2; 3 sonde; 121.6Kb	Loss eteroz mosaico 35%

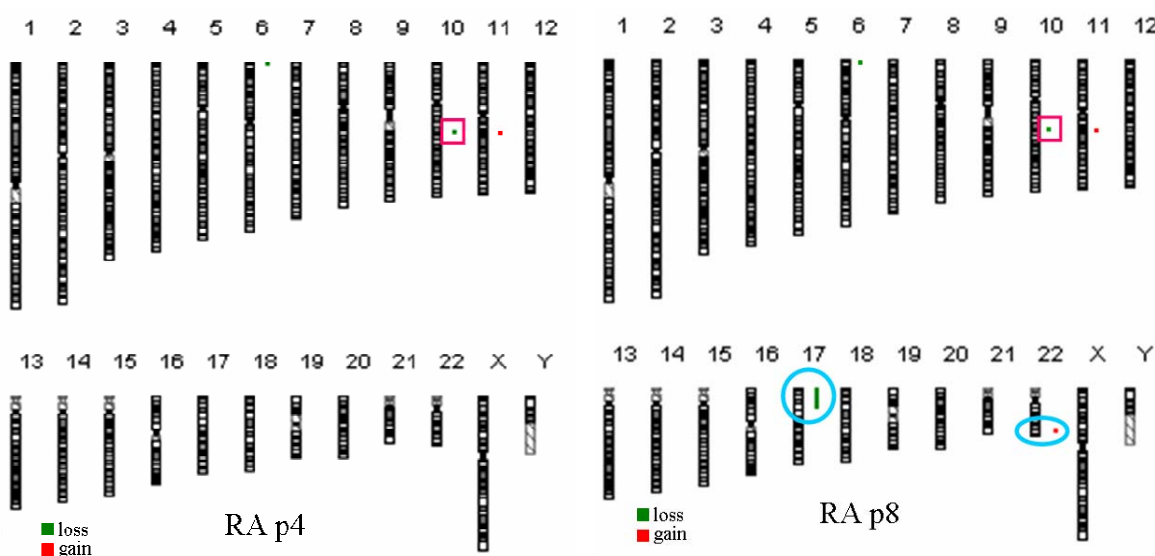
Nell'analisi del DNA estratto da sangue periferico dalla paziente RA sono state osservate 16 CNV, 7 perdite e 9 guadagni, di grandezza variabile da 32 Kb a 1010 Kb e 11 contengono geni noti. Tra queste, 9 si sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto si suppone che non abbiano effetto patologico. Se consideriamo i geni contenuti nelle CNV, potrebbero essere interessanti i seguenti:

- gain *FAM21C-FAM21B* (10q11.2) che codificano per componenti del complesso WASH che attiva il complesso Arp2/3 inducendo la polimerizzazione dell'actina (Gomez TS, 2009).
- gain *PTPN20A* (Protein Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor-type, 20A, 10q11.2, MIM \*610630) che codifica per una proteina che si trova nel nucleo e colocalizza con il Centro di Organizzazione dei Microtubuli (Fodero-Tavoletti MT, 2005).
- gain *GPRIN2* (G Protein-Regulated Inducer of Neurite outgrowth 2, 10q11.2, MIM \*611240)

che codifica per una proteina cerebrale coinvolta nella formazione e nell'allungamento dei neuriti (Chen LT, 1999).

- gain *KIF3B* (Kinesin Family member 3B, 20q11.21, MIM \*603754) che codifica per una chinesina, un "motore molecolare" coinvolto nel trasporto di proteine e lipidi lungo i microtubuli. La proteina è coinvolta anche nel trasferimento dei cromosomi ai poli del fuso mitotico e nel movimento dei cromosomi (Yamazaki H, 1995).
- loss *TSHZ2* (Teashirt homolog 2, 20q13.2) che codifica per una proteina espressa nel cervello che risulta molto ridotta nei soggetti affetti da Alzheimer (Gocke CB, 2005).

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nei passaggi dei fibroblasti analizzati come riassunto nella tabella:



POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	FIBROBLASTI p4 (44K)	FIBROBLASTI p8 (44K)
10q21.3; 7 sonde; 70Kb	Loss eteroz mosaico 98%	Loss eteroz mosaico 49%
11q13.2; 8 sonde; 411.1Kb	Gain, duplicazione mosaico 77%	Gain, duplicazione mosaico 75%
17p13.3; 6 sonde; 120.5Kb	Loss eteroz mosaico 61%	Loss eteroz mosaico 53% (validato con FISH)
17p13.3-p11.2; 613 sonde; 21.9Mb	-	Loss eteroz mosaico 53% (validato con FISH)
22q13.31; 8 sonde; 277.1Kb	-	Gain, duplicazione non mosaico

Tre CNV sono comuni ad entrambi i passaggi, ma nei fibroblasti p8 è stata osservata la duplicazione in 22q13, ma soprattutto la perdita del braccio corto del cromosoma 17, facendo ipotizzare una selezione operata *in vitro*.

Per validare il mosaicismo per la perdita del 17p ed escludere che fosse un falso positivo è stata applicata la tecnica FISH utilizzando sonde localizzate in 17p13.3 (rosso) e 17p11.2

(verde). La perdita di tale regione è stata osservata come presenza di un singolo segnale per ogni sonda nel 30% delle cellule analizzate all'ottavo passaggio di coltura come mostrato in figura 33

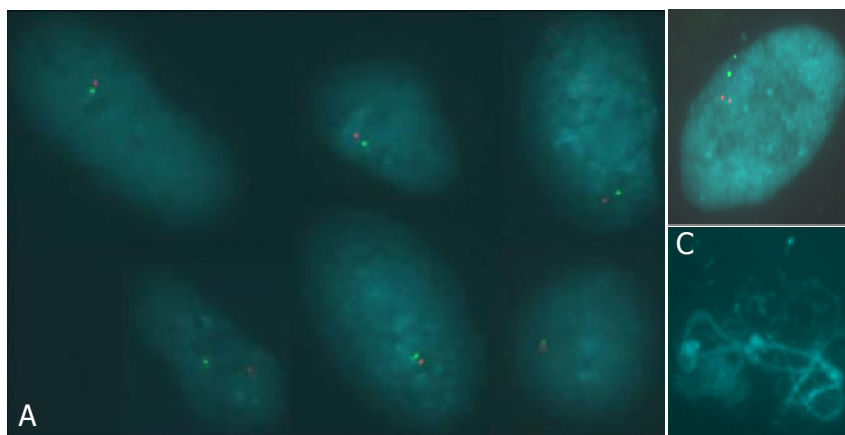


Figura 33: nuclei con 17p deleto (un segnale per sonda) in A, nucleo normale (due segnali per sonda) in B e fibra cromatinica in C. Tutte le immagini sono relative ai fibroblasti p8 della paziente RA

Tra i geni presenti nelle CNV osservate nei fibroblasti della paziente RA risultano interessanti:

- gain *LMLN* (Leishmanolysin-like, 3q29, MIM \*609380) che codifica per una metalloproteasi coinvolta in numerosi aspetti della mitosi, tra i quali l'assemblaggio del fuso mitotico, il controllo della membrana nucleare e l'architettura cromosomica (McHugh B, 2004).
- loss *RUFY2* (RUn And FYve Domains-Containing Protein 2, 10q21, MIM \*610328) che si trova in una regione correlata a malattia di Alzheimer ad esordio tardivo (AD6; MIM #605526) ed elevati livelli plasmatici di  $\beta$  amiloide (Bertram L, 2000). Tale CNV è presente in perdita anche nella paziente DSG.

Di seguito vengono invece mostrate le CNV condivise tra i tessuti:

<b>POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE</b>	<b>S.P. (60K)</b>	<b>FIBROBLASTI p4 (44K)</b>	<b>FIBROBLASTI p8 (44K)</b>
3q29; 5 sonde; 125.9Kb	Gain, duplicazione non mosaico	Gain, duplicazione mosaico 83%	-
6p25.3; 2 sonde; 32.7Kb	Loss eteroz non mosaico	Loss eteroz non mosaico	Loss eteroz non mosaico
17p13.3; 6 sonde; 120.5Kb	Gain, duplicazione non mosaico	Loss eteroz mosaico 61%	Loss eteroz mosaico 53%
17p13.3-p11.2; 613 sonde; 21.9Mb	-	-	Loss eteroz mosaico 53%
18q12.3; 4 sonde; 234Kb	Loss eteroz mosaico 41%	-	Loss eteroz mosaico 52%

Come è possibile notare, l'unica CNV presente nei tre tessuti analizzati, pertanto costitutiva e non acquisita, è nella regione 6p25.3 in cui è contenuto il gene *DUSP22* (Dual Specificity Phosphatase 22, 6p25.3) che codifica per una proteina che defosforila e disattiva p38 e la chinasi SAPK/JNK attivando il pathway di Jnk (Shen Y, 2001).

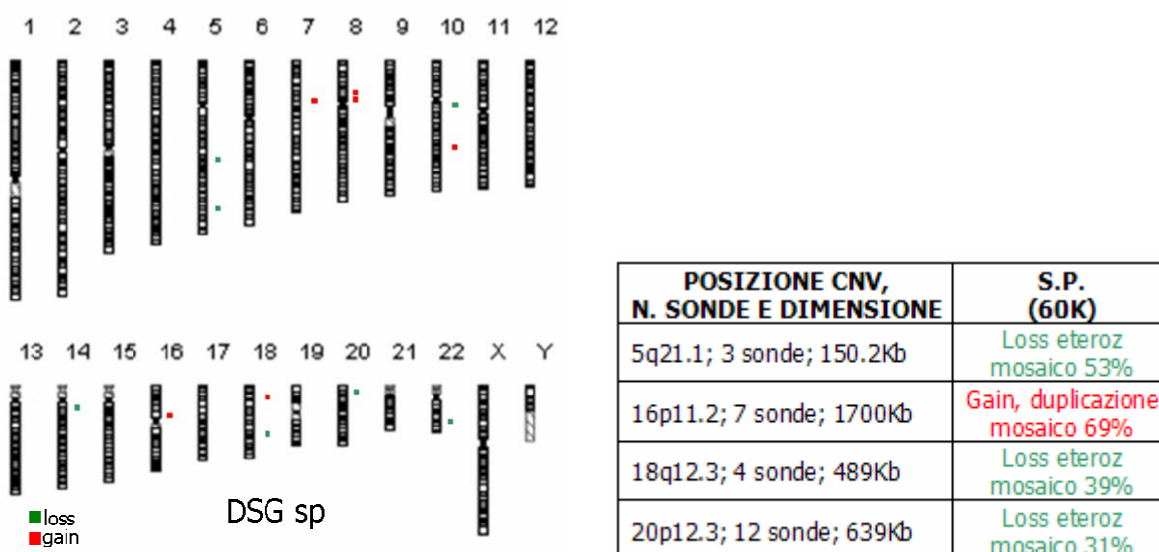
Riassumendo, delle 20 CNV osservate, 6 (pari al 30%) sono da scartare perché non presenti in entrambi i formati utilizzati per l'array-CGH, 13 (pari al 65%) sembrano acquisite, mentre una sola (pari al 5%) è costituzionale.

#### 4.2 PAZIENTE DSG

Per questa paziente con mutazione P301L è stato possibile analizzare DNA estratto da sangue periferico (sp) e da fibroblasti al terzo e settimo passaggio di coltura (p3, p7), utilizzando il formato 60K.

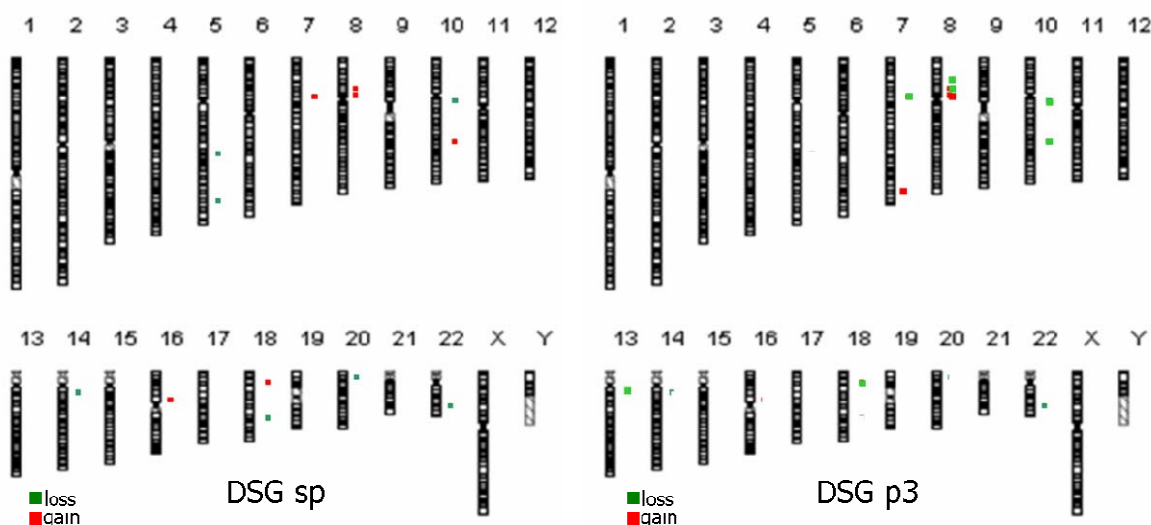
Sono state osservate in totale 17 CNV, 13 delle quali (pari al 76.5%) sono state osservate nel sangue periferico e 13 in almeno uno dei passaggi di coltura dei fibroblasti.

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nel sangue:



Nell'analisi del DNA estratto da sangue periferico dalla paziente DSG sono state osservate 13 CNV, 7 perdite e 6 guadagni, di grandezza variabile da 53 Kb a 1700 Kb e 11 contengono geni noti. Tra queste, 8 si sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto si suppone che non abbiano effetto patologico, mentre le CNV dei cromosomi 7 e 8 non si sovrappongono ad alcuna descritta.

Le seguenti CNV sono state invece osservate unicamente nei fibroblasti analizzati:



POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	FIBROBLASTI p3 (60K)	FIBROBLASTI p7 (60K)
7q31.31; 9 sonde; 324Kb	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione non mosaico
8p12; 3 sonde; 34.7Kb	Loss eteroz non mosaico	Loss eteroz non mosaico
10q21.3; 3 sonde; 70Kb	Loss eteroz non mosaico	Loss eteroz non mosaico
13q12.11; 7 sonde; 163.5Kb	Loss eteroz mosaico 86%	Loss eteroz mosaico 79%

Tutte le CNV sono comuni ad entrambi i passaggi e tra i geni coinvolti risultano interessanti:

- loss *RUFY2* (RUn And FYve Domains-Containing Protein 2, 10q21, MIM \*610328) già descritto per la paziente RA.
- loss *MPHOSPH8* (13q12.11) codifica per una proteina associata alla divisione mitotica che viene fosforilata durante questa fase del ciclo cellulare.

Di seguito vengono invece mostrate le CNV condivise tra almeno due tessuti:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p3 (60K)	FIBROBLASTI p7 (60K)
5q33.1; 6 sonde; 292.3Kb	Loss eteroz mosaico 45%	-	Gain duplicazione (3 copie) mosaico 60%
10q11.2; 6 sonde; 1400Kb	Loss eteroz mosaico 29%	-	Gain duplicazione mosaico 81%
14q11.2; 10 sonde; 494.6Kb	Loss eteroz mosaico 58%	-	Gain duplicazione mosaico 71%

Le CNV condivise tra tutti i tessuti e pertanto definibili costituzionali sono le seguenti:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p3 (60K)	FIBROBLASTI p7 (60K)
7p14.1; 3 sonde; 55.9Kb	Gain duplicazione mosaico 83%	Loss eteroz non mosaico	Loss eteroz non mosaico
8p12; 4 sonde; 130Kb	Gain duplicazione non mosaico	Loss eteroz; 70% mosaico	Loss eteroz 75% mosaico
8p11.23-p11.22; 4 sonde; 127.3Kb	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione non mosaico
10q23.2; 4 sonde; 161.7Kb	Gain duplicazione mosaico 42%	Loss eteroz non mosaico	Loss eteroz non mosaico
18p11.21; 8 sonde; 183.7Kb	Gain duplicazione mosaico 50%	Loss eteroz mosaico 92%	Loss eteroz mosaico 87%
22q13.1; 3 sonde; 53.8Kb	Loss omoz non mosaico	Loss omoz non mosaico	Loss omoz non mosaico

Solo la CNV in gain nella regione 8p11.23 e la CNV in loss in 22q13.1 mostrano lo stesso comportamento nei tre tessuti analizzati.

Se consideriamo i geni contenuti nelle CNV, potrebbero essere interessanti i seguenti:

- *CDC2L5* (Cell Division Cycle 2-like 5, 7p14.1, MIM \*603309) che codifica per una proteina della famiglia delle serina/treonina chinasi ciclina-dipendente che svolgono un ruolo fondamentale nel controllo del ciclo cellulare e nelle dinamiche del citoscheletro neurale. Tale proteina potrebbe quindi controllare il ciclo cellulare mitotico (Lapidot-Lifson Y, 1992).
- gain *ADAM5P* e *tMDC* (8p11.23) che codificano per una proteina non dotata di attività catalitica e simile alle metalloproteasi. Potrebbe essere il prodotto di uno pseudogene. Tale CNV è stata osservata anche nel paziente EP, ma in perdita.
- *TUBB6* (18p11.21) che codifica per la catena  $\beta 6$  della tubulina, il principale costituente dei microtubuli.
- *AFG3L2* (18p11.21, MIM \*604581) che codifica per una proteina mitocondriale simile alla paraplegina. Mutazioni in questo gene causano atassia spino cerebellare di tipo 28 (MIM #610246), ma potrebbe essere il gene candidato per altre patologie neurodegenerative (Banfi S, 1999).
- *SPIRE1* (18p11.21, MIM \*609216) che codifica per una proteina coinvolta nell'organizzazione dell'actina e nel trasporto di vescicole (Quinlan ME, 2005).
- *CEP76* (18p11.21) che codifica per una proteina del centrosoma coinvolta nella regolazione della duplicazione dei centrioli richiesta per prevenirne la reduplicazione (Tsang WY, 2009).

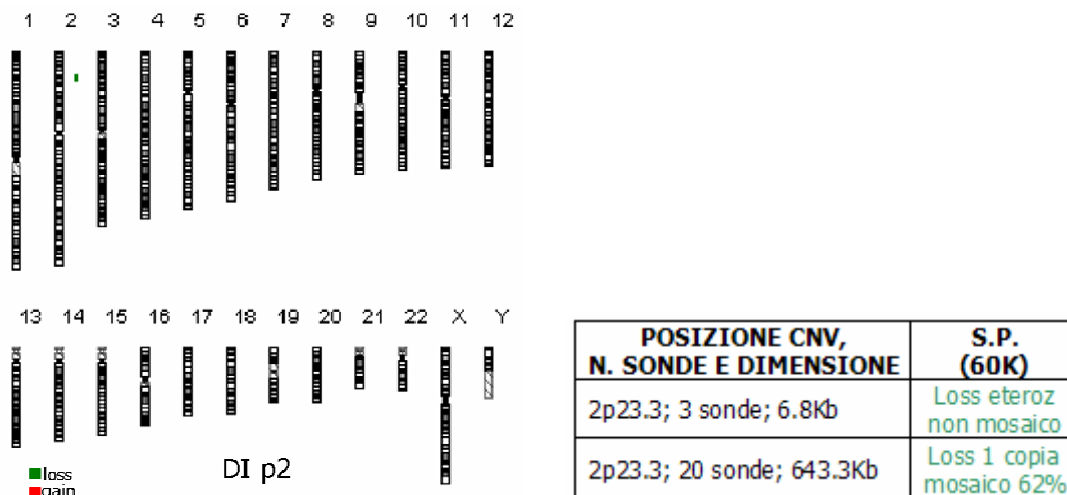
Riassumendo, delle 17 CNV osservate, 8 (pari al 47%) sembrano acquisite, mentre 9 (pari al 52.9%) sono costituzionali, delle quali solo 2 concordano tra i tessuti.



#### 4.3 PAZIENTE DI

Per questa paziente con mutazione P301L è stato possibile analizzare unicamente DNA estratto da fibroblasti al secondo passaggio di coltura (p2), utilizzando il formato 44K.

Sono state osservate unicamente 2 CNV in loss sul cromosoma 2, come mostrato in figura:



Le CNV osservate contengono geni noti e si sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto non sembrano avere effetto patologico.

Non avendo a disposizione DNA estratto da sangue periferico della paziente, non è possibile definire se tali CNV siano acquisite o costituzionali.

#### 4.4 PAZIENTE CA

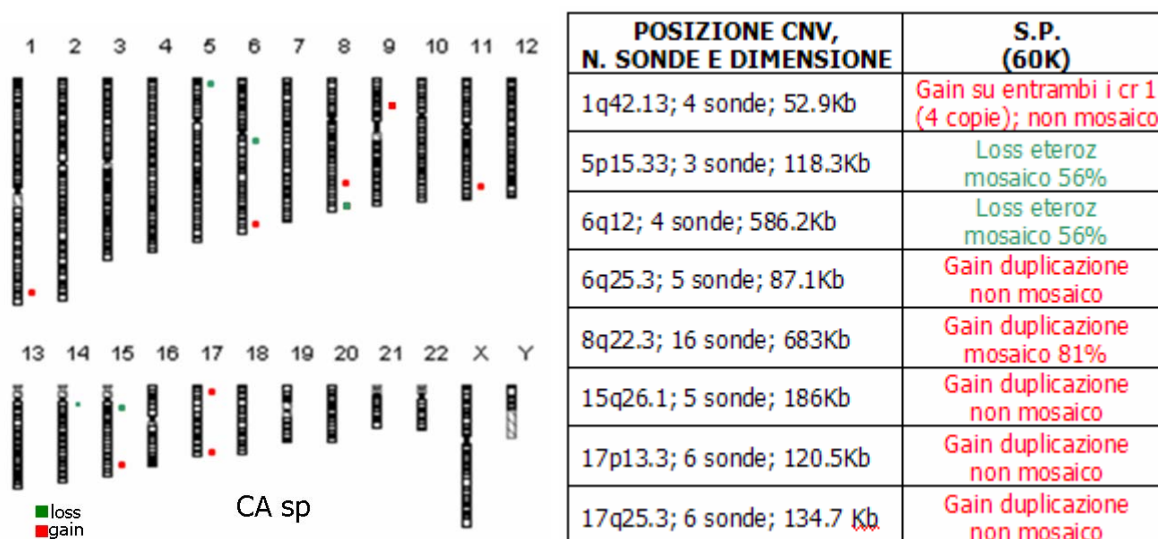
Per questo paziente con mutazione G389R è stato possibile analizzare DNA estratto da sangue periferico (sp) e da fibroblasti al quarto passaggio di coltura (p4), utilizzando due diversi formati di array che differiscono per il numero di sonde spottate sul supporto (60K per il sangue e 44K per i fibroblasti).

Sono state osservate in totale 20 CNV, 11 delle quali (pari al 55%) sono state osservate nel sangue periferico, mentre 9 (45%) nei fibroblasti.

Non si possono trarre informazioni dalle seguenti 3 CNV riscontrate nel sangue periferico dal momento che si trovano in regioni non coperte da entrambi i formati dell'array utilizzati:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p3 (44K)
11p15.5; 3 sonde; 13.1Kb	<i>No sonde nella regione</i>	Gain duplicazione mosaico 89%
11q23.3; 3 sonde; 69.6Kb	Gain su entrambi i cr 11 (4 copie); non mosaico	<i>No sonde nella regione</i>
15q11.2; 12 sonde; 1200Kb	Loss eteroz mosaico 84%	<i>No sonde nella regione</i>

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nel sangue come mostrato nell'immagine e riassunto nella tabella:



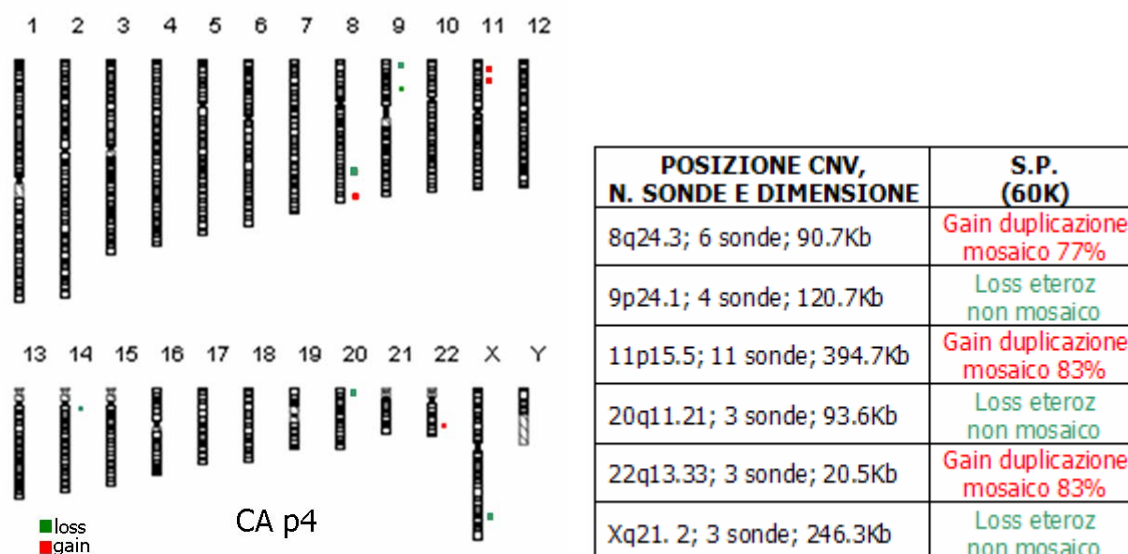
Nell'analisi del DNA estratto da sangue periferico dal paziente CA sono state osservate 13 CNV, 5 perdite e 8 guadagni, di grandezza variabile da 52 Kb a 1200 Kb che contengono geni noti. Tra queste, 8 si sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto si suppone che non abbiano effetto patologico. Le CNV dei cromosomi 1, 6, 9, 11 e 15 non sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, ma due si sovrappongono a quelle descritte nel database DECIPHER:

- il gain del cr 1 si sovrappone a quello osservato nel paziente DECIPHER 991 che presenta anomalie facciali, orali e toraciche oltre a ritardo mentale e di sviluppo. Tale CNV è stata osservata anche nel paziente EP.
- il loss del cr 15 si sovrappone a quelli osservati nei pazienti 253672 e 251332. Il primo mostra fronte prominente, anomalie facciali, ritardo mentale e di sviluppo, ipotonia e brachicefalia, mentre il secondo crisi epilettiche, ritardo mentale e di sviluppo.

Tra i geni presenti nelle CNV osservate risulta interessante:

- gain *ACTA1* (1q42.13) associato a miopia (OMIM \*102610) e osservato anche nel paziente EP (Kaindl AM, 2004).

Le seguenti CNV sono state invece osservate unicamente nei fibroblasti:



Sono state osservate 10 CNV, 4 loss e 6 gain, di grandezza variabile da 20Kb a 412 Kb che contengono geni noti. Tra queste, 7 si sovrappongono a quelle descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto si suppone abbiano effetto benigno, mentre le CNV dei cromosomi 9 e X non sono descritte.

Tra i geni presenti nelle CNV osservate nei fibroblasti della paziente RA risultano interessanti:

- gain *HCCA2* (11p15.5, MIM \*691969) la cui attività è repressa nei pazienti con Alzheimer (Doyu M, 2001).
- loss *DNMT3B* (DNA MethylTransferase 3B, 20q11.21, MIM \*602900) che è associato all'instabilità centromerica dei cromosomi 1, 9, 16 e 2, con conseguente aumentata frequenza di ricombinazione dei bracci di questi cromosomi (OMIM #242860, Xu GL, 1999). Dal momento che nel paziente questo gene è in perdita, potrebbe essere una compensazione dell'instabilità mitotica provocata dal malfunzionamento della proteina tau.

Di seguito vengono mostrate le CNV condivise tra i tessuti:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p4 (44K)
8q24.3; 6 sonde; 411.8Kb	Loss eteroz mosaico 42%	Gain duplicazione mosaico 89%
9p13.3; 3 sonde; 106.1Kb	Gain duplicazione non mosaico	Loss eteroz mosaico 91%
14q11.2; 8 sonde; 396.5Kb	Loss eteroz mosaico 81%	Gain duplicazione non mosaico

Come è possibile notare, nessuna delle CNV condivise mostra la stessa espressione nei tessuti analizzati, probabilmente per un'alterazione indotta dalla coltura *in vitro*.

Riassumendo, delle 20 CNV osservate, 3 (15%) non sono considerabili, 14 (70%) sembrano acquisite, mentre 3 (15%) costituzionali, pur non essendo concordanti tra i tessuti.

#### 4.5 PAZIENTE GG

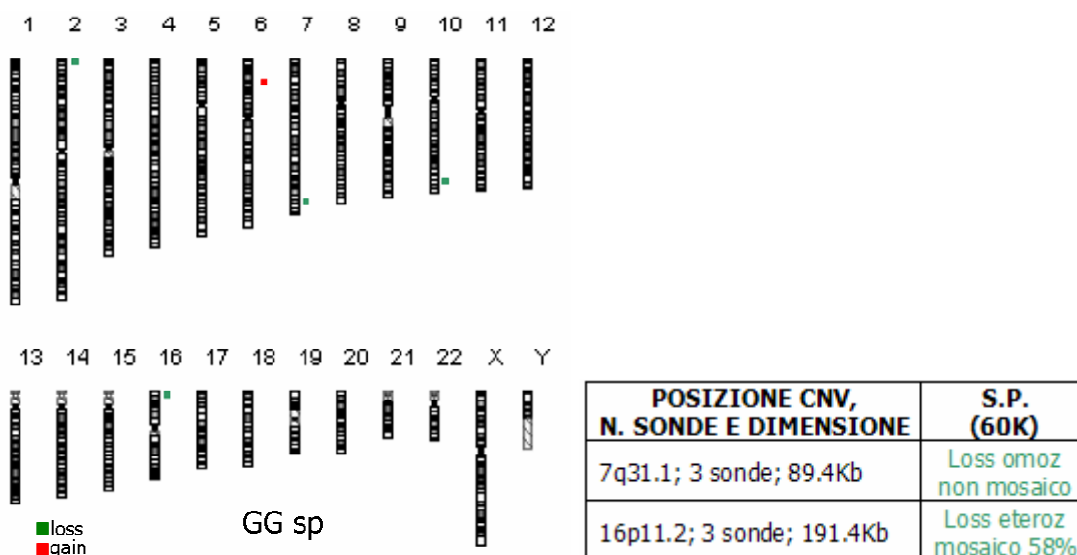
Per questa paziente con mutazione V363I è stato possibile analizzare DNA estratto da sangue periferico (sp) e da fibroblasti al quarto e decimo passaggio di coltura (p4, p8), utilizzando due diversi formati di array che differiscono per il numero di sonde spottate sul supporto (60K per il sangue e 44K per i fibroblasti).

Sono state osservate in totale 9 CNV, 5 delle quali (pari al 55.6%) sono state osservate nel sangue periferico, mentre 7 (77.8%) nei fibroblasti.

Non si possono trarre informazioni dalle seguenti 2 CNV riscontrate nel sangue periferico dal momento che si trovano in regioni non coperte dal formato dell'array utilizzato per i fibroblasti:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p4 (44K)	FIBROBLASTI p10 (44K)
7q31.1; 3 sonde; 89.4Kb	Loss omoz non mosaico	No sonde nella regione	No sonde nella regione
16p11.2; 3 sonde; 191.4Kb	Loss eteroz mosaico 58%	No sonde nella regione	No sonde nella regione

Nell'immagine seguente vengono mostrate le CNV riscontrate nel sangue periferico.

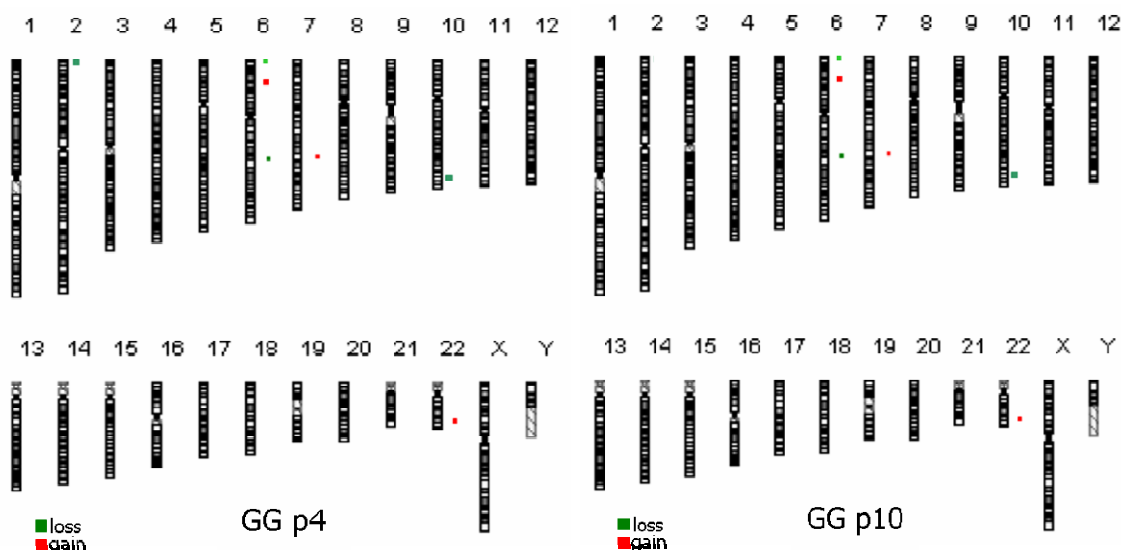


Nell'analisi del DNA estratto da sangue periferico dalla paziente GG sono state osservate 5 CNV, 4 perdite e 1 guadagno, di grandezza variabile da 99 Kb a 1040 Kb che contengono geni noti. Tra queste, 4 si sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto si suppone che non abbiano effetto patologico, mentre la CNV sul cromosoma 6 non si sovrappone ad altre descritte. Le CNV nei cromosomi 7, 10 e 16 sono in regioni che non contengono geni noti.

Se consideriamo i geni contenuti nelle CNV, potrebbero essere interessanti il seguente:

- loss *FAM110C* (2p25.3, MIM \*611395) che codifica per una proteina che potrebbe svolgere un ruolo nell'organizzazione dei microtubuli (Hauge H, 2007).

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nei passaggi dei fibroblasti analizzati come mostrato in figura e riassunto nella tabella:



POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	FIBROBLASTI p4 (44K)	FIBROBLASTI p10 (44K)
2p25.3; 5 sonde; 268.6Kb	Loss eteroz mosaico 35%	-
6p25.3; 3 sonde; 91Kb	Loss eteroz mosaico 86%	Loss eteroz mosaico 94%
6p22.2; 5 sonde; 99.4Kb	Gain duplicazione mosaico 85%	Gain duplicazione mosaico 57%
6q16.3; 14 sonde; 1311Kb	Loss eteroz mosaico 65%	Loss eteroz mosaico 65%
7q22.1; 14 sonde; 250.5Kb	Gain duplicazione mosaico 89%	Gain duplicazione (3 copie) non mosaico
10q25.1; 3 sonde; 673.9Kb	Loss eteroz mosaico 53%	Loss eteroz mosaico 68%
22q13.33; 10 sonde; 286Kb	Gain duplicazione mosaico 69%	Gain duplicazione non mosaico

Sei delle 7 CNV osservate nei fibroblasti sono comuni ad entrambi i passaggi ed è evidente la selezione operata dalla coltura *in vitro*. Tra i geni presenti risultano interessanti:

- loss *GRIK2* (6q16.3, MIM \*138244) che codifica per un recettore ionotropico del Glutammato, responsabile della conversione di un segnale chimico in impulso elettrico. Difetti in *GRIK2* sono la causa di ritardo mentale autosomico recessivo di tipo 6 (MRT6, MIM #611092), non correlato a malformazioni congenite o dimorfismi facciali (Motazacker MM, 2007).

- gain *VEGF* (7q22.1) un gene inducibile da NGF (Nerve Growth Factor) (Ferri GL, 1996).
- gain *TUBGCP6* (22q13.33, MIM #610053) che codifica per una proteina che fa parte di un complesso multi-subunità richiesto per la nucleazione dei microtubuli. Dal momento che tale gene è risultato in guadagno, si potrebbe ipotizzare che supplisca alla mancanza della proteina tau wild-type (Murphy SM, 2001).

Inoltre, 2 CNV osservate nei fibroblasti si sovrappongono a quelle descritte in DECIPHER:

- il loss in 6p25.3 si sovrappone a quello osservato nei pazienti 652, 1566, 4714, 248270, 250143, 250238, 250711, 2614, 218955 per i quali tuttavia non è descritto un particolare fenotipo patologico.
- il gain in 22q13.33 si sovrappone a quello osservato nei pazienti 1025, 250383, 250853, che mostrano ritardo mentale associato a dismorfismi facciali ed altre anomalie.

Di seguito vengono mostrate le CNV condivise tra i tessuti:

<b>POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE</b>	<b>S.P. (60K)</b>	<b>FIBROBLASTI p4 (44K)</b>	<b>FIBROBLASTI p10 (44K)</b>
2p25.3; 5 sonde; 268.6Kb	Loss eteroz; mosaico 29%	Loss eteroz mosaico 35%	-
6p22.2; 5 sonde; 99.4Kb	Gain duplicazione mosaico 85%	Gain duplicazione mosaico 85%	Gain duplicazione mosaico 57%
10q25.1; 3 sonde; 673.9Kb	Loss eteroz mosaico 29%	Loss eteroz mosaico 53%	Loss eteroz mosaico 68%

Come è possibile notare, solo 2 CNV sono presenti nei tre tessuti analizzati, pertanto possono essere considerate costitutive e non acquisite, ma nella regione 10q25.1 interessata non sono presenti geni.

Nella regione 6p22.2 sono invece contenuti i geni:

- *MRS2* che codifica per un trasportatore mitocondriale del magnesio
- *GPLD1* che permette il rilascio delle proteine ancorate alla membrana plasmatica
- *ALDH5A1* che catalizza la degradazione del neurotrasmettitore GABA e la cui assenza provoca l'accumulo del GABA causando atassia e lieve ritardo dello sviluppo psicomotorio.

Riassumendo, delle 9 CNV osservate, 2 (pari al 22.2%) sono da scartare perché non presenti in entrambi i formati utilizzati per l'array-CGH, 5 (pari al 55.6%) sembrano acquisite, mentre 2 (pari al 22.2%) sono costituzionali.

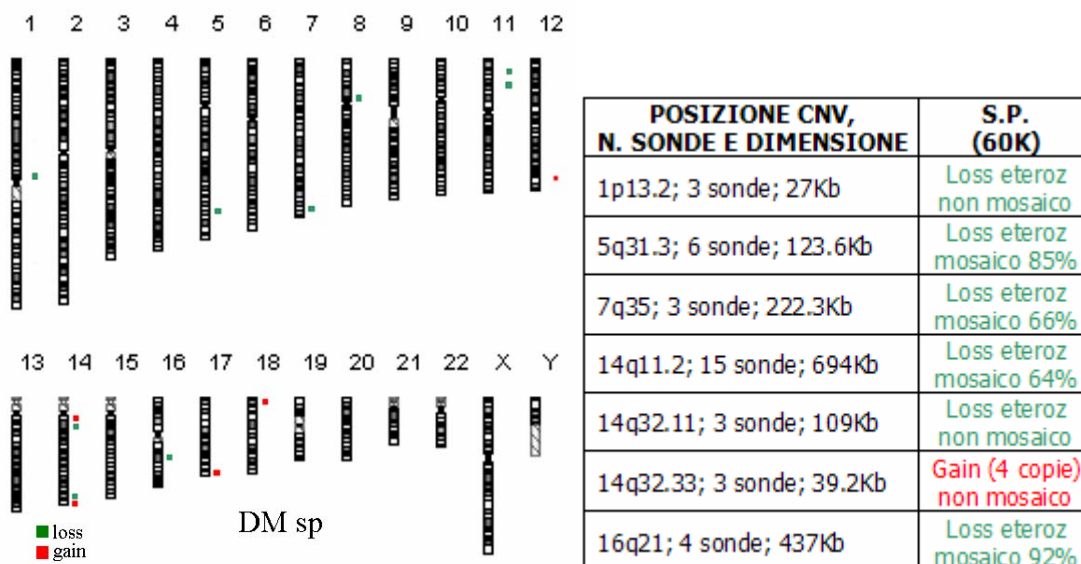
#### 4.6 PAZIENTE DM

Per questa paziente con mutazione P366R è stato possibile analizzare DNA estratto da sangue periferico (sp) e da fibroblasti al terzo e sesto passaggio di coltura (p3, p6), utilizzando due diversi formati di array che differiscono per il numero di sonde spottate sul supporto (60K per il sangue e 44K per i fibroblasti).

Sono state osservate in totale 20 CNV, delle quali 14 (pari al 73.7%) sono state osservate nel sangue periferico, mentre 10 (52.6%) e 7 (36.8%) rispettivamente nei fibroblasti p3 e p6. Non si possono trarre informazioni dalle seguenti 3 CNV riscontrate nel sangue periferico dal momento che si trovano in regioni non coperte dal formato dell'array utilizzato per i fibroblasti:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p3 (44K)	FIBROBLASTI p6 (44K)
8p11.23; 4 sonde; 127.3Kb	Loss omoz non mosaico	No sonde nella regione	No sonde nella regione
11p15.2; 3 sonde; 112.9Kb	Loss omoz mosaico 85%	No sonde nella regione	No sonde nella regione
14q11.2; 3 sonde; 122.5Kb	Gain (4 copie) non mosaico	No sonde nella regione	No sonde nella regione

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nel sangue come mostrato nell'immagine e riassunto nella tabella:

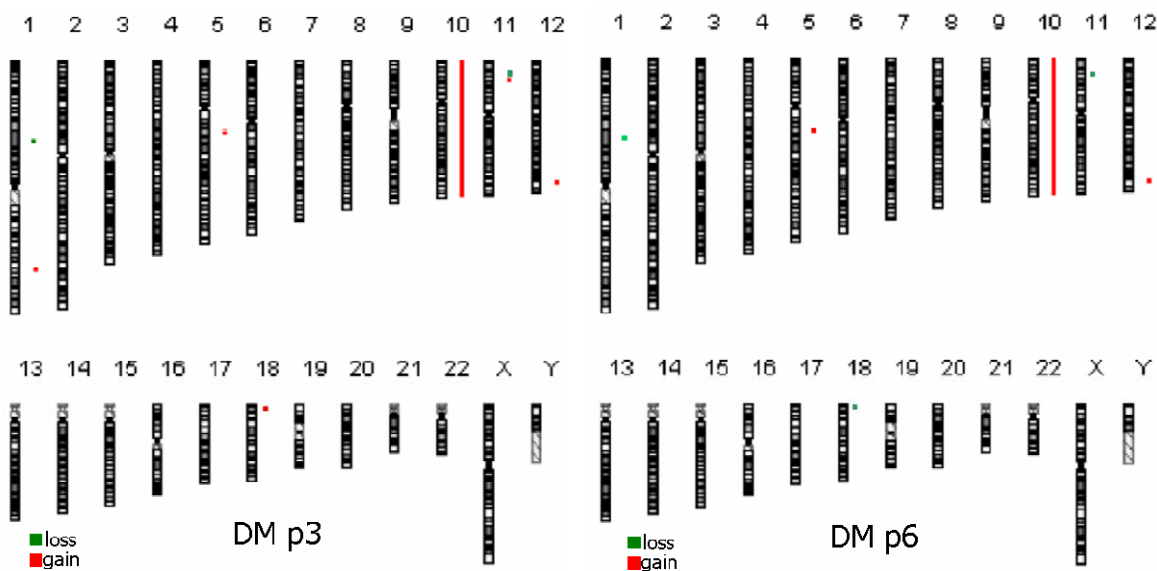


L'analisi del DNA estratto da sangue periferico dalla paziente DM (sinistra) ha mostrato 14 CNV, 9 perdite e 5 guadagni, di grandezza variabile da 27 Kb a 694 Kb che contengono geni noti, fatta eccezione per la CNV sul cromosoma 16. Tra queste, 11 si sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto si suppone che non abbiano effetto patologico. Se consideriamo i geni contenuti nelle CNV, potrebbero essere interessanti i seguenti:

- loss *PCDHA-B* (Protocadherin cluster, MIM #604966, 5q31) che codifica per proteine di superficie che vengono espresse nei neuroni e sono presenti a livello delle giunzioni sinaptiche. Queste proteine di adesione potrebbero essere implicate nel mantenimento e nella funzione di specifiche connessioni neuronali cerebrali e si legano a Fyn (Shapiro L, 1999).

- loss *ARHGEF5* (Rho Guanine nucleotide Exchange Factor 5, MIM \*600888, 7q35) che codifica per una proteina che potrebbe essere coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro attraverso la regolazione di piccole proteine che legano GTP (Xie X, 2005)
- loss *INSC* (omologo del gene *INSCutable* di *Drosophila*, MIM \*610668, 11p15.2) che è coinvolto nell'orientamento del fuso durante la mitosi e pertanto potrebbe regolare la proliferazione ed il differenziamento neuronale durante lo sviluppo del sistema nervoso (Udolph G, 2009). Potrebbe inoltre essere coinvolto nella divisione asimmetrica dei fibroblasti e nella stratificazione dell'epitelio squamoso (Lechler T, 2005).
- gain *NOS1* (Nitric Oxid Synthase 1 neuronale, MIM \*163731, 12q24.22) che codifica per l'enzima coinvolto nella sintesi, a partire dalla L-Arginina, di ossido nitrico, un radicale libero reattivo che agisce da mediatore biologico in diversi processi, tra i quali la neurotrasmissione e la neurotossicità associata ad ictus e a malattie neurodegenerative (Chabrier PE, 1999).
- gain *CETN1* (Centrin 1, MIM \*603187) che codifica per una proteina implicata nella determinazione della posizione del centrosoma e nel suo funzionamento come Centro d'Organizzazione dei Microtubuli (MTOC). Questa proteina si trova a livello del centrosoma nelle cellule in interfase, mentre si distribuisce ai poli del fuso durante la mitosi, riflettendo il comportamento dinamico del centrosoma durante il ciclo cellulare (Errabolu R, 1994).

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nei passaggi dei fibroblasti analizzati come mostrato in figura e riassunto nella tabella:





POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	FIBROBLASTI p3 (44K)	FIBROBLASTI p6 (44K)
1p31.1; 5 sonde; 363.4Kb	Loss eteroz mosaico 62%	Loss eteroz mosaico 59%
1q32.1; 6 sonde; 365.5Kb	Gain, duplicazione mosaico 89%	-
5q13.1-q13.2; 4 sonde; 257Kb	Gain duplicazione mosaico 66%	Gain duplicazione mosaico 55%
5q13.2; 8 sonde; 2106Kb	Gain duplicazione mosaico 50%	-
10p15.3-q26.3; 1736 sonde; 135Mb	Gain duplicazione mosaico 81%	Gain duplicazione mosaico 70%
11p15.1; 14 sonde; 257.8Kb	Gain duplicazione mosaico 57%	-

Le CNV osservate hanno una grandezza variabile da 50 Kb a 2106 Kb e contengono geni noti. Sei di queste si sovrappongono a quelle descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto potrebbero non avere effetti patologici. Tre CNV sono comuni ad entrambi i passaggi, mentre altre 3 sono presenti unicamente nel p3, facendo ipotizzare una selezione effettuata dalla coltura *in vitro*, supportata anche dalla diversa percentuale di mosaicismo delle CNV condivise nei passaggi analizzati. L'analisi ha inoltre confermato la trisomia del cromosoma 10 osservata in citogenetica classica. Tra i geni presenti nelle CNV osservate nei fibroblasti della paziente DM risultano interessanti:

- gain *SMN1-SMN2* (Survival of Motor Neuron 1 telomerico e 2 centromerico, 5q13.2, MIM \*600354) che codifica per la proteina SMN che lega l'RNA ed è necessaria per l'assemblaggio di complessi di piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNPs). È stata tuttavia trovata associata ad elementi citoscheletrici in assoni e dendriti spinali, soprattutto durante lo sviluppo postnatale (Pagliardini S, 2000). Inoltre, la perdita in omozigosi di SMN1 causa l'Atrofia Muscolare Spinale (SMA, MIM # 253300).
- gain *NOS1* (Nitric Oxid Synthase 1 neuronale, MIM \*163731, 12q24.22) già riscontrato nell'analisi del sangue periferico.

Di seguito vengono invece mostrate le CNV condivise tra i tessuti:

POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	S.P. (60K)	FIBROBLASTI p3 (44K)	FIBROBLASTI p6 (44K)
11p15.4; 4 sonde; 42.1Kb	Loss eteroz mosaico 68%	Loss eteroz mosaico 36%	Loss eteroz mosaico 29%
12q24.22; 5 sonde; 117.5Kb	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione non mosaico
17q25.3; 3 sonde; 85.4Kb	Gain (4 copie) non mosaico	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione non mosaico
18p11.32; 6 sonde; 244.7Kb	Gain duplicazione mosaico 85%	Gain duplicazione mosaico 43%	Gain duplicazione mosaico 38%

Le CNV condivise possono essere considerate costituzionali e per 3 di esse è evidente la selezione operata *in vitro*. Nelle regioni condivise sono presenti i seguenti geni: *AMPD3*

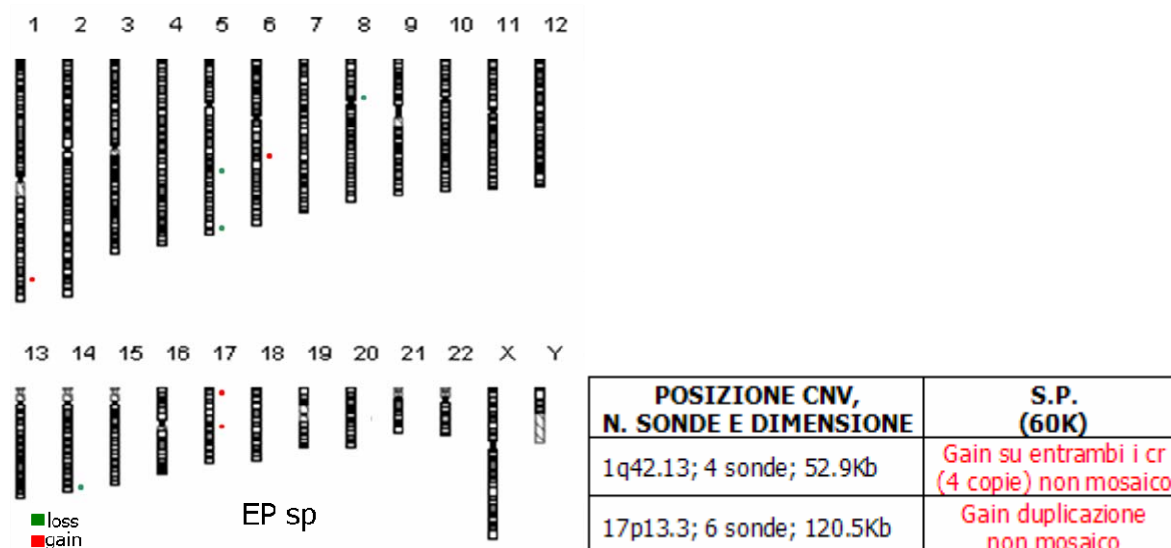
(11p15.4), *NOS1* (12q24.22), *CBX2-CBX8-CBX4* (17q25.3, richiesti per mantenere molti geni nello stato trascrizionalmente inattivo durante lo sviluppo attraverso il rimodellamento della cromatina e la modificazione degli istoni), *CETN1-CLUL1-C18orf56-TYMS-ENOSF1-YES1* (18p11.32).

Riassumendo, delle 20 CNV osservate, 3 (pari al 15%) sono da scartare perché non presenti in entrambi i formati utilizzati per l'array-CGH, 13 (pari al 65%) sembrano acquisite, mentre 4 (pari al 20%) sono costituzionali.

#### 4.7 PAZIENTE EP

Per questo paziente con mutazione P364S è stato possibile analizzare DNA estratto da sangue periferico (sp) e da fibroblasti al terzo e settimo passaggio di coltura (p3, p7), utilizzando il formato 60K. Sono state osservate in totale 21 CNV, 8 delle quali (pari al 38%) sono state osservate nel sangue periferico, mentre 19 (90.5%) nei fibroblasti.

Le seguenti CNV sono state osservate unicamente nel sangue come mostrato nell'immagine e riassunto nella tabella:

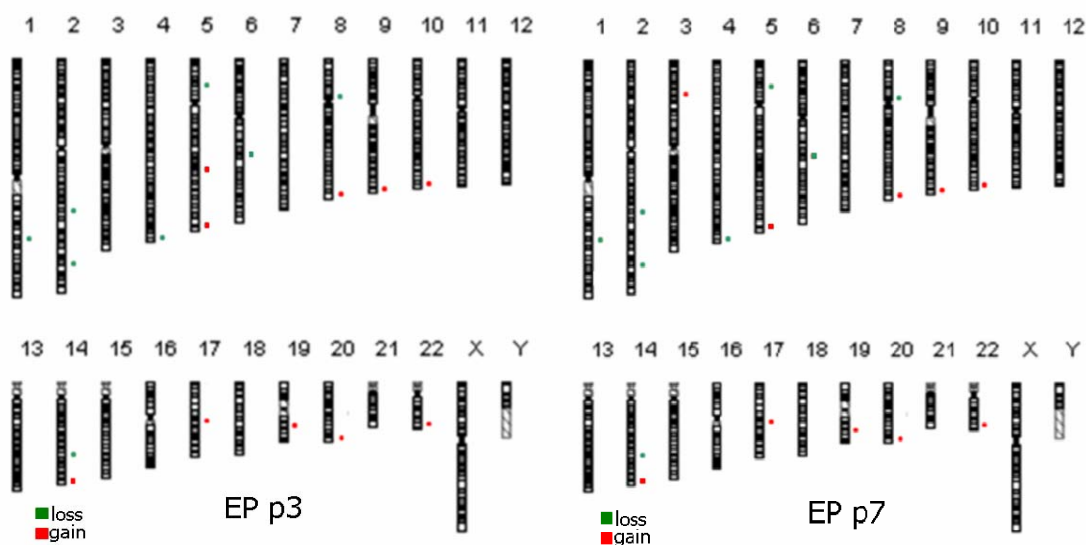


Nell'analisi del DNA estratto da sangue periferico dal paziente EP sono state osservate 8 CNV, 4 perdite e 4 guadagni, di grandezza variabile da 39 Kb a 143 Kb che contengono geni noti. Tra queste, 5 si sovrappongono ad altre descritte nel Database of Genomic Variants, pertanto si suppone che non abbiano effetto patologico, mentre 3 non si sovrappongono ad altre descritte. Se consideriamo i geni contenuti nelle CNV, potrebbero essere interessanti i seguenti:

- gain *ACTA1* (1q42.13) già descritto per il paziente CA
- gain *GRIK2* (6q16.3) già descritto per la paziente GG in cui tuttavia era in perdita.

Inoltre, la CNV in gain in 1q42.13 si sovrappone a quella osservata nel paziente 991 e già descritta per il paziente CA.

Le seguenti CNV sono invece state osservate unicamente nei passaggi dei fibroblasti analizzati come mostrato in figura e riassunto nella tabella:



POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE	FIBROBLASTI p3 (60K)	FIBROBLASTI p7 (60K)
1q31.1; 9 sonde; 1100Kb	Loss eteroz mosaico 80%	Loss eteroz mosaico 30%
2q24.1; 6 sonde; 737Kb	Loss eteroz mosaico 94%	Loss eteroz mosaico 44%
2q34; 5 sonde; 194Kb	Loss eteroz mosaico 91%	Loss eteroz mosaico 34%
3p22.2; 3 sonde; 76.8Kb	-	Gain duplicazione (3 copie); non mosaico
4q35.2; 3 sonde; 129.8Kb	Loss eteroz mosaico 94%	Loss eteroz mosaico 55%
5p14.1; 8 sonde; 690.7Kb	Loss eteroz mosaico 67%	Loss eteroz mosaico 33%
8q24.3; 24 sonde; 571.2Kb	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione mosaico 48%
9q34.3; 9 sonde; 3400Kb	Gain duplicazione mosaico 89%	Gain duplicazione mosaico 33%
10q26.3; 12 sonde; 258.7Kb	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione mosaico 35%
14q31.2; 4 sonde; 413.5Kb	Loss eteroz mosaico 82%	Loss eteroz mosaico 40%
19q13.32; 5 sonde; 67.8Kb	Gain amplificazione ~ 5 copie	Gain duplicazione non mosaico
20q13.33; 10 sonde; 237.5Kb	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione mosaico 87%
22q13.33; 23 sonde; 517.2Kb	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione mosaico 87%

Tutte le CNV sono comuni ad entrambi i passaggi, eccetto una (3p22.2) e risulta evidente la selezione *in vitro* nei passaggi da p3 a p7, infatti la percentuale di mosaicismo varia tra di essi.

Tra i geni presenti nelle CNV osservate nei fibroblasti del paziente EP risultano interessanti:

- loss *GRIK2* (6q16.3) già descritto per la paziente GG e presente in gain nel sangue periferico del paziente.
- gain *RECQL4* (8q24.3, MIM #603780) codifica per una ATP-asi DNA-dipendente che potrebbe essere coinvolta nella segregazione dei cromosomi. Mutazioni in questo gene sono associate alle sindromi Rothmund-Thomson, RAPADILINO and Baller-Gerold (Yin J, 2004).
- gain *GRIN1* (9q34.3, MIM \*138249) coinvolto in plasticità sinaptica, sinaptogenesi, apprendimento, memoria e neurotrasmissione. Un polimorfismo nel promotore del gene è associato a schizofrenia (Begni S, 2003).
- gain *TUBB2C* (9q34.3, MIM \*602660) che codifica per la tubulina, il principale costituente del microtubuli (Lewis SA, 1990).
- gain *TUBGCP2* (10q26.3, MIM \*609610) che codifica per una proteina richiesta per la nucleazione dei microtubuli (Fava F, 1999).
- gain *APOE* (19q13.32, MIM +107741) associato alla regolazione della plasticità neurale, dell'estensione assonale e della trasmissione sinaptica. L'allele APOE4 è associato ad Alzheimer ad esordio precoce e tardivo (Bennett DA, 2003).
- gain *TUBGCP6* (22q13.33, MIM #610053) codifica per una proteina richiesta per la nucleazione dei microtubuli.

Di seguito vengono invece mostrate le CNV condivise tra i tessuti:

<b>POSIZIONE CNV, N. SONDE E DIMENSIONE</b>	<b>S.P. (60K)</b>	<b>FIBROBLASTI p3 (60K)</b>	<b>FIBROBLASTI p7 (60K)</b>
5q35.3; 4 sonde; 42.2Kb	Loss eteroz mosaico 87%	Gain amplificazione ~ 6 copie	Gain duplicazione mosaico 83%
6q16.3; 8 sonde; 106.1Kb	Gain duplicazione mosaico 81%	Loss eteroz mosaico 86%	Loss eteroz mosaico 33%
8p11.23-p11.22; 4 sonde; 127.3Kb	Loss omoz non mosaico	Loss omoz non mosaico	Loss omoz non mosaico
14q32.33; 3 sonde; 39.2Kb	Loss eteroz mosaico 81%	Gain amplificazione ~ 11 copie	Gain amplificazione ~ 5 copie
17q21.2; 4 sonde; 57Kb	Gain duplicazione mosaico 77%	Gain duplicazione non mosaico	Gain duplicazione non mosaico

Come è possibile notare, le uniche CNV che mostrano la stessa espressione in tutti i tessuti analizzati sono il loss in 8p11 e il gain in 17q21, pertanto possono essere considerate costituzionali. I geni presenti in tali CNV sono:

- *ADAM5P* e *tMDC* (8p11.23) già descritti per la paziente DSG dove sono stati osservati in gain, mentre nel paziente EP sono in loss.
- *IGFBP4* (17q21.2, MIM \*146733) che codifica per una proteina in grado di legare l'IGF (Insulin Growth Factor) prolungandone l'emivita ed alterandone l'interazione con recettori di superficie cellulare (Zazzi H, 1998).

- *TNS4* (17q21.2, *tensin-4*, MIM \*608385) che codifica per una proteina che potrebbe essere coinvolta nella migrazione cellulare e nella trasduzione del segnale al citoscheletro. Potrebbe inoltre promuovere l'apoptosi se tagliata dalla caspasi-3 (Katz M, 2007).

Riassumendo, delle 21 CNV osservate, 16 (pari al 76.2%) sembrano acquisite, mentre 5 (pari al 23.8%) sembrano costituzionali, ma solo 2 di queste mostrano la stessa espressione in tutti i tessuti analizzati.

Nelle tabelle seguenti vengono riassunti i geni condivisi da diversi pazienti.

GENI CONDIVISI NELLE CNV RISCONTRATE NEI FIBROBLASTI:

CA	DM	DSG	EP	RA	GG
				DUSP22	DUSP22
			GRIK2		GRIK2
		ADAM5P, tMDC	ADAM5P, tMDC		
	ANXA8, ANTXRL, FAM21, ZNF488, BMPR1A	ANXA8, ANTXRL, FAM21, ZNF488, BMPR1A			
	HNRNPH3, RUFY2	HNRNPH3, RUFY2		HNRNPH3, RUFY2	
	GPRI23, KNDC1, UTF1, VENTX, ADAM8, TUBGCP2, ZNF511, CALY, PRAP1, ECHS1		GPRI23, KNDC1, UTF1, VENTX, ADAM8, TUBGCP2, ZNF511, CALY, PRAP1, ECHS1		
TCRA		TCRA			
PANX2, TRABD			PANX2, TRABD		
			TUBGCP6, HDAC10, MAPK12, PLXNB2, SAPS2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2		TUBGCP6, HDAC10, MAPK12, PLXNB2, SAPS2, SBF1, ADM2, MIOX, LMF2

Tra i geni condivisi nei fibroblasti vanno segnalati:

- *GRIK2*: codifica per un recettore ionotropico del Glutammato, responsabile della conversione di un segnale chimico in impulso elettrico. Difetti in *GRIK2* sono la causa di ritardo mentale autosomico recessivo di tipo 6 (MRT6, MIM #611092), non correlato a malformazioni congenite o dimorfismi facciali (Motazacker MM, 2007).
- *FAM21C/B*: coinvolta nella polimerizzazione dell'actina.
- *RUFY2*: localizzato in una regione associata ad Alzheimer ad esordio tardivo.

- *TUBGCP2* (Gamma-tubulin complex component 2): necessario per la nucleazione dei microtubuli a livello del centrosoma.
- *CALY* (neuron-specific vesicular protein calcyon): codifica per una proteina i cui livelli di espressione nella corteccia prefrontale risultano aumentati di circa due volte nei pazienti schizofrenici rispetto a controlli sani (Koh PO, 2003).

## GENI CONDIVISI NELLE CNV RISCONTRATE NEL SANGUE PERIFERICO:

CA	DM	DSG	EP	RA
ACTA1, NUP133			ACTA1, NUP133	
	ADAM5P, tMDC	ADAM5P, tMDC	ADAM5P, tMDC	
ODF1, KLF10, AZIN1, ATP6V1C1				ODF1, KLF10, AZIN1, ATP6V1C1
NAG20, UBAP1				NAG20, UBAP1
TCRA	TCRA	TCRA		
		TP53TG3b, TP53TG3, SLC6A10P		TP53TG3b, TP53TG3, SLC6A10P
SERPINF1, SERPINF2, SMYD4, RPA1			SERPINF1, SERPINF2, SMYD4, RPA1	SERPINF1, SERPINF2, SMYD4, RPA1

*Discussione*

Tau è una proteina associata ai microtubuli (MT) che ne promuove l'assemblaggio e la stabilizzazione. È espressa principalmente nel sistema nervoso, ma è presente anche in cellule non neurali come fibroblasti e linfociti. In condizioni fisiologiche, tau è legata ai microtubuli e la sua fosforilazione ne diminuisce l'affinità di legame e di conseguenza l'assemblaggio dei MT. In condizioni patologiche, tau viene iperfosforilata causando la distruzione del citoscheletro in neuroni e glia e la deposizione di filamenti proteici all'interno delle cellule (grovigli neurofibrillari o NFT, NeuroFibrillary Tangles), con conseguente atrofia cerebrale e demenza, caratteristiche di patologie denominate taupatie. Tali malattie neurodegenerative comprendono la demenza frontotemporale (FTD), che può presentare eziologia sporadica o genetica se causata da mutazioni nel gene *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau, 17q21.1). L'effetto patogenetico di tali mutazioni è dovuto all'alterazione del rapporto tra le diverse isoforme di tau a causa di anomalie nello splicing del gene, oppure alla produzione della proteina mutata che mostra una diminuita capacità di legame ai MT. In entrambi i casi si assiste all'accumulo intracellulare di NFT e allo sviluppo di diversi fenotipi clinici.

Oltre ad essere localizzata a livello del citoscheletro, tau è risultata localizzata nelle regioni fibrillari dense dei nucleoli in interfase e nelle NORs (Nucleolar Organizing Regions) dei cromosomi acrocentrici in mitosi. È stato inoltre dimostrato che tau colocalizza con le sequenze  $\alpha$ -satellite eterocromatiche e con la nucleolina a livello della periferia interna del nucleolo (Sjoberg MK, 2006). Recentemente è stata anche dimostrata la presenza di tau fosforilata all'interno del nucleo durante l'interfase e lungo i cromosomi dalla profase alla metafase e successivamente nella telofase, così che possa essere considerata una delle proteine dello strato pericromosomico insieme alla nucleolina.

Data la localizzazione della proteina e la sua capacità di legame al DNA, è stato quindi suggerito un ruolo di tau nella stabilità cromosomica dal momento che sono state osservate numerose aberrazioni cromosomiche quali rotture, lesioni acromatiche, delezioni, traslocazioni, aneuploidie nonché anomalie cromatiniche nelle cellule somatiche di pazienti affetti da demenza frontotemporale dovuta alla mutazione P301L, la più frequente nel gene *MAPT* (Rossi G, 2008).

Scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di verificare se le anomalie cromosomiche riscontrate fossero dovute unicamente alla mutazione analizzata ampliando l'indagine a un totale di 17 pazienti affetti da demenza, ma portatori di diverse mutazioni nel gene *MAPT*, arruolati presso il Dipartimento di Neuropatologia dell'Istituto Carlo Besta diretto dal Prof. Fabrizio Tagliavini.



Le cellule somatiche (linfociti periferici e fibroblasti) di questi pazienti sono state analizzate attraverso tecniche di citogenetica classica (analisi del cariotipo) e molecolare (array-CGH) per verificare se la proteina tau sia in grado di provocare una patologia nucleare in cellule non neurali oltre alla consolidata patologia citoscheletrica del sistema nervoso. Inoltre, per verificare un possibile coinvolgimento di tau nei sistemi di riparo del DNA, sono stati trattati i linfoblasti di tre pazienti con mutazione P301L con gli agenti genotossici bleomicina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In seguito a coltura di sangue intero ed allestimento per il preparato cromosomico secondo le procedure in uso nel Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale San Gerardo di Monza, sono state analizzate metafasi linfocitarie ottenute da 13 pazienti e da 78 controlli sani pervenuti al Laboratorio di Genetica Medica per l'analisi del cariotipo in seguito a problemi riproduttivi. Per la paziente DSG con mutazione P301L è stato possibile analizzare 5 prelievi effettuati in diversi periodi nell'arco di tre anni. Sono state quindi confrontate attraverso il test statistico *t* di Student le frequenze delle metafasi con lesioni cromosomiche (rottture o *breaks*, lesioni acromatiche o *gaps*, traslocazioni, delezioni, inversioni, riarrangiamenti) e perdite/guadagni clonali (presenti in più di tre metafasi) dei pazienti e dei controlli. È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nelle frequenze di linfociti con lesioni stabili (trasmissibili alla progenie) tra pazienti e controlli ( $p=0.007$ ), ancora più marcata tra la paziente DSG e i controlli ( $p=0$ ). La differenza significativa scompare se alla percentuale delle lesioni dei pazienti vengono sottratte le aneuploidie clonali che non sono riscontrate nei controlli; esse tuttavia potrebbero essere dovute alla disfunzione di tau mutata nell'organizzazione dei microtubuli e di conseguenza del fuso mitotico. È stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nella percentuale di cellule con lesioni stabili (rottture cromosomiche e cromatidiche, traslocazioni, delezioni, inversioni e riarrangiamenti), cellule con aneuploidie (perdite/guadagni casuali di cromosomi) ed aneuploidie clonali (perdite/guadagni osservati in più di tre metafasi) tra pazienti e controlli.

Rispetto ai controlli, i pazienti hanno mostrato alta fragilità cromosomica distribuita su tutti i cromosomi, difetti del fuso mitotico e della condensazione (ad esempio fibre e *bridge* cromatinici) e nuclei anomali, in accordo con i risultati già presentati in letteratura (Rossi G, 2008), ad eccezione del paziente IN che presenta una bassa percentuale di lesioni (1%), accompagnata tuttavia da un'elevata frequenza di separazione prematura dei cromatidi (*pcs*, *premature chromatid separation*) e dalla presenza di nuclei e cromosomi con fibre cromatiniche.

La presenza di aberrazioni cromosomiche nei pazienti con FTD dovuta a mutazioni nel gene *MAPT* è probabilmente da attribuire alla disfunzione di tau come proteina associata ai microtubuli, dal momento che l'iperfosforilazione proteica indotta dalle mutazioni studiate

riduce l'affinità di legame della proteina ai microtubuli producendo un fuso mitotico instabile che spiegherebbe le aneuploidie, i *bridge* cromatinici e i pcs osservati nei pazienti.

Confrontando la percentuale di lesioni con l'età di insorgenza della patologia si nota una netta tendenza all'aumento delle lesioni con l'aumentare dell'età, probabilmente a causa dell'accumulo di errori dovuti alla disfunzione della proteina mutata, mentre i controlli mostrano dati più distribuiti nelle fasce di età prese in considerazione che tuttavia non coincidono con quelle dei pazienti. Non considerando i pazienti più giovani (ES, 18 anni; IN, 22 anni; CN, 36 anni) si nota invece una distribuzione più omogenea della frequenza delle lesioni. Va comunque sottolineata la grande differenza nella percentuale di lesioni tra i IN (mutazione G335S) ed ES (mutazione P364S): quest'ultimo, pur essendo asintomatico, mostra un'elevata percentuale di lesioni rispetto a IN che è sintomatico, probabilmente a causa dei diversi effetti delle mutazioni sulla funzionalità della proteina tau.

È stata poi analizzata la distribuzione dei punti di rottura cromosomici e cromatidici per verificare eventuali "hot spot" di fragilità correlabili alla patologia. È stato possibile notare che sono presenti delezioni unicamente nei pazienti e che le rotture si distribuiscono in tutti i cromosomi, tuttavia per alcuni (cromosomi 18, 20, 21, Y) sono presenti rotture unicamente nei pazienti e non nei controlli.

Tenendo in considerazione unicamente i siti di rottura cromosomici che non sono condivisi tra pazienti e controlli e confrontandoli con i siti fragili riportati in letteratura (Giardino D, 2009) è emerso che il 48.4% dei siti di rottura nei controlli coincidono con siti fragili, contro il 42.5% osservato nei pazienti. Valutando la posizione invece è possibile osservare che si trovano entro un terzo del cromosoma rispetto al centromero 8 siti nei controlli (25.8%) e 13 nei pazienti (27.7%), suggerendo un leggera preferenza alla rottura pericentromerica in questi ultimi. Inoltre, il cromosoma 22 è il solo ad essere interessato unicamente nei controlli, mentre i cromosomi 7, 8, 18, 20, 21 e Y mostrano siti di rottura unicamente nei pazienti. Infine i cromosomi 2, 4, 9, 10, 16 e X mostrano un maggior numero di siti di rottura cromosomica nei pazienti rispetto ai controlli.

Nel loro insieme questi dati confermano nei pazienti una maggiore suscettibilità alla rottura che potrebbe essere dovuta alla disfunzione di tau mutata nel corretto assemblaggio e nella stabilizzazione dei microtubuli e di conseguenza del fuso mitotico.

Anche analizzando un'altra popolazione cellulare somatica costituita dai fibroblasti cutanei è stata confermata la presenza di un'elevata percentuale di cellule aneuploidi e con lesioni cromosomiche. Sono state analizzate metafasi ottenute da biopsie effettuate a 11 pazienti e a 17 controlli. A differenza di ciò che è stato osservato per i linfociti, non è stata riscontrata una differenza significativa nella percentuale di cellule con aneuploidie clonali in pazienti e

controlli. Ciò potrebbe essere causato dai lunghi tempi di coltura *in vitro* a cui sono sottoposti i fibroblasti a differenza dei linfociti che rimangono in coltura per un massimo di 72 ore prima dell'allestimento cromosomico. Tuttavia, è stata osservata una differenza statisticamente significativa nella percentuale di cellule con anomalie strutturali (rotture cromosomiche e cromatidiche, lesioni acromatiche, traslocazioni, delezioni, inversioni, riarrangiamenti, cromosomi derivativi), lesioni stabili (anomalie strutturali escluse le lesioni acromatiche) e cellule con aneuploidie casuali.

Anche da quest'analisi è infatti emersa la presenza di anomalie di numero o di struttura nei pazienti, oltre che di fibre cromatiniche, "bridge" cromatinici, cromosomi decondensati ed anomalie del fuso mitotico, supportando il coinvolgimento della proteina tau nell'organizzazione cromatinica e nella stabilità cromosomica.

In letteratura sono presenti numerosi lavori che riportano aumentati livelli di aneuploidia somatica e neurale in patologie cerebrali genetiche, quali l'Alzheimer (Mosch B, 2007), la schizofrenia (Yurov YB, 2008) e l'autismo (Yurov YB, 2007).

È stato osservato un livello più elevato di aneuploidia coinvolgente il cromosoma 21 dove mappa il gene *APP* sia in linfociti che in fibroblasti di pazienti affetti da Alzheimer (Geller LN, 1999), in supporto alla scoperta risalente a trent'anni fa di una percentuale più elevata di metafasi aneuploidi in tali pazienti rispetto a controlli (Ward BE, 1979). L'aumento dell'aneuploidia dei cromosomi 17 e 21 è stata osservata anche nelle cellule della mucosa buccale di pazienti AD, come anche in soggetti di età superiore ai 64 anni. Tali dati sono stati ottenuti attraverso la tecnica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), mentre la stessa analisi effettuata attraverso tecniche di citogenetica classica ha fornito risultati ambigui, soprattutto per la limitata capacità di individuare bassi livelli di mosaicismo per il basso numero di metafasi analizzate.

L'aneuploidia nell'Alzheimer (AD) sembra risultare da difetti nella segregazione cromosomica a causa del non corretto funzionamento di tau, APP e Presenilina 1 che comporta un aumento di neuroni iperdiploidi (Granic A, 2010).

Nel cervello normale adulto è stata osservata una percentuale del 6-12% di neuroni iperdiploidi ( $>2n$ ) che non esprimono marcatori del ciclo cellulare (ad esempio cicline), pertanto non sono in grado di rientrare nel ciclo cellulare e possono essere considerati una popolazione statica risultante da una non corretta segregazione mitotica avvenuta nei progenitori. Nel cervello dei pazienti AD tali neuroni raggiungono la percentuale del 20% ed esprimono marcatori del ciclo cellulare, indicando la loro capacità di rientrare nel ciclo cellulare ed iniziare almeno la sintesi del DNA, ma solo l'1-2% sarebbe in grado di completarla. Tali neuroni costituirebbero quindi una popolazione in divisione che potrebbe

essere coinvolta nella neurodegenerazione. L'aneuploidia osservata potrebbe quindi essere il risultato di un'anomala neurogenesi adulta, caratterizzata da non-disgiunzione mitotica a causa di un difettoso rientro nel ciclo cellulare.

La neurogenesi avviene durante tutta la vita, soprattutto dopo perdita neuronale e potrebbe avere un potenziale rigenerativo, ma potrebbe anche produrre un maggior numero di cellule staminali e progenitori aneuploidi in individui che mostrano una predisposizione ad una non corretta segregazione cromosomica, infatti i processi patogenetici alla base dell'AD e della FTD prendono inizio in regioni caratterizzate da maggiore plasticità neuronale e coinvolte nella neurogenesi.

Dopo la neurogenesi, i precursori dei neuroni (neuroblasti) lasciano la zona ventricolare o sottoventricolare e una volta differenziati rimangono in fase  $G_0$  diventando post-mitotici e mostrando un forte blocco verso il rientro nel ciclo cellulare. In seguito a condizioni di stress i neuroni postmitotici tuttavia possono riattivare la replicazione, ma il rientro nel ciclo cellulare è letale, pertanto un anomalo rientro nel ciclo potrebbe causare neurodegenerazione e morte cellulare. La longevità dei neuroni postmitotici e della glia potrebbe fornire infatti più tempo per l'accumulo delle aneuploidie rispetto alle cellule in più o meno rapida divisione come linfociti e fibroblasti (Kingsbury MA, 2006).

È stata proposta un'ipotesi "two-hit" per la neurodegenerazione, che prevede che il rientro nel ciclo cellulare sia un evento precoce nei neuroni postmitotici sottoposti a stress, ma non sia sufficiente per indurre l'apoptosi. I neuroni potrebbero infatti sopravvivere per mesi, finché un secondo "hit" (come un ulteriore stress) causi la loro morte. Questo modello è compatibile con la natura cronica delle patologie neurodegenerative, caratterizzate da una progressiva e non immediata perdita neuronale. Inoltre, è stato suggerito che l'attivazione di proteine del ciclo cellulare dal primo "hit" possa rappresentare una risposta protettiva verso fattori di stress, permettendo ai neuroni di sopravvivere grazie ad alleli addizionali prodotti dalla replicazione del DNA.

Va ricordato che la neurogenesi può essere stimolata da fattori fisiologici e patologici e comincia con la fosforilazione di tau che è coinvolta anche nell'attivazione del ciclo cellulare associata a morte cellulare, infatti è stato dimostrato in un modello di taupatia in *Drosophila* che la proteina nella forma wild type e mutata è in grado di provocare il rientro nel ciclo cellulare se iperfosforilata (Khurana V, 2006).

È possibile che anche pazienti con mutazioni nel gene *MAPT* mostrino, rispetto a soggetti normali, un maggior livello di aneuploidia, oltre che a livello somatico anche a livello cerebrale, con conseguente aumentata suscettibilità a danni cellulari e neurodegenerazione.

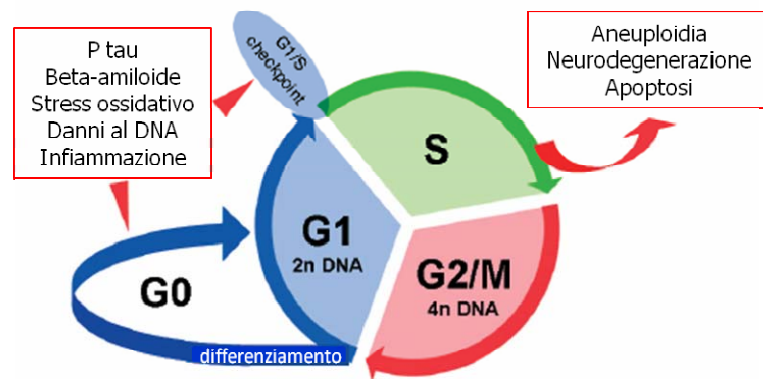


Figura 34. Cause e conseguenze del rientro nel ciclo cellulare in neuroni maturi differenziati come importante componente patogenetica in malattie neurodegenerative come l'Alzheimer che potrebbe valere anche per la Demenza Frontotemporale. (modificata da Zekanowski C, 2009).

Nelle cellule dei pazienti presi in esame è stata riscontrata anche un'aumentata percentuale di separazione prematura dei cromatidi (pcs) che è correlata con una perdita del controllo della separazione e della segregazione dei cromosomi che può comportare aneuploidia. È stata osservata una percentuale circa tre volte più elevata di pcs anche nei linfociti di pazienti AD rispetto ai controlli.

Dal momento che i centromeri sono di fondamentale importanza nella corretta segregazione cromosomica durante la meiosi e la mitosi, nel movimento dei cromosomi e nella regolazione del checkpoint mitotico, la perdita del controllo della separazione dei cromatidi potrebbe comportare difetti nell'organizzazione dei microtubuli e nella segregazione dei cromatidi fratelli. La separazione prematura dei cromatidi nelle cellule neurali potrebbe quindi essere il risultato della deregolazione del ciclo cellulare associata ad una non corretta segregazione mitotica risultante in progenitori aneuploidi e conseguente neurodegenerazione e morte cellulare dopo decenni di lento accumulo di aneuploidie.

È stato proposto che una maggiore produzione, propagazione e mantenimento di cellule neurali aneuploidi potrebbe contribuire anche alla neurodegenerazione associata ad Atassia Telangectasia (AT), una patologia causata da mutazioni nel gene *ATM* che comporta la disregolazione dei sistemi di riparo del DNA, della replicazione e del controllo del ciclo cellulare con conseguente instabilità cromosomica (McConnell MJ, 2004).

Per valutare se anche la proteina tau possa essere coinvolta in meccanismi di riparo del DNA, sono stati trattati i linfoblasti di tre pazienti con mutazione P301L (GR, GM, DSG) con le sostanze genotossiche  $H_2O_2$  e bleomicina, in grado di indurre rotture nel DNA rispettivamente a singolo e a doppio filamento. Sono state considerate 50 metafasi per ogni trattamento a dosi crescenti di  $H_2O_2$  e bleomicina nei controlli, mentre per le pazienti non è sempre stato

possibile ottenere tale numero, soprattutto per le dosi elevate dei trattamenti. È stato inoltre valutato l'indice mitotico (numero di metafasi/1000 nuclei) per ogni trattamento per evidenziare eventuali differenze tra controlli e pazienti.

Come atteso si è osservata una tendenza alla diminuzione dell'indice mitotico nei trattamenti effettuati, più evidente nelle pazienti, con un minimo corrispondente al trattamento più elevato (IM<0.1 nelle pazienti, IM>0.1 nel controllo).

Confrontando il numero di cellule con lesioni è stata osservata una differenza significativa solo nelle cellule non trattate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0 mM, bleomicina 0 µg/ml), confermando l'instabilità cromosomica già descritta in letteratura (Rossi G, 2008).

Nelle cellule trattate con la dose più elevata di bleomicina (100 µg/ml) è stato riscontrato un minor numero di cellule con lesioni nelle pazienti, probabilmente dovuto ad un aumento di morte cellulare. Inoltre, il numero di lesioni per cellula è risultato più basso nelle pazienti, probabilmente a causa dell'aumento nel numero di metafasi non valutabili perché composte da frammenti cromatinici non organizzati in cromosomi, indice di una maggiore alterazione delle fisiologiche dinamiche del fuso mitotico.

Trattando le cellule con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stato osservato un numero di cellule con lesioni simile tra controlli e pazienti per i trattamenti di 0.5 mM e 1 mM. Inoltre, per la dose più elevata del trattamento, il controllo mostra una distribuzione di lesioni con picco tra 1 e 3, mentre la paziente DSG mostra un numero maggiore di cellule con numero di lesioni compreso tra 2 e 8 e non si osservano, a differenza della bleomicina, cellule con più di 14 lesioni.

Per dimostrare il reale coinvolgimento della proteina tau in sistemi di riparo del DNA sarà necessario tuttavia trattare i linfoblasti con altri agenti genotossici, estendere le analisi ad un maggior numero di pazienti e valutare un'eventuale colocalizzazione di tau con proteine fondamentali per la progressione del ciclo cellulare e la stabilizzazione del fuso mitotico.

Per ottenere informazioni più approfondite a livello genomico, è stata infine utilizzata la tecnica dell'array-CGH che permette un'analisi a risoluzione significativamente maggiore rispetto all'analisi citogenetica classica rendendo possibile la visualizzazione di CNV, ossia variazioni nel numero di copie in perdita o guadagno rispetto a un DNA genomico di riferimento. È stato possibile analizzare DNA estratto da fibroblasti a diversi passaggi di coltura di 7 pazienti con diverse mutazioni e da sangue periferico di 6 dei 7 pazienti. La maggior parte delle CNV osservate coincidono con quelle riportate nel Database of Genomic Variants lasciando supporre che siano polimorfismi benigni, mentre per altre è difficile determinarne il possibile effetto patologico.

Nei pazienti sono state osservate CNV in geni che codificano per proteine coinvolte nella stabilizzazione dei microtubuli (in perdita *INSC*, in guadagno *CETN1*, *LMLN*, *PTPN20A*, *KIF3B*,

*TUBGCP2*), nel controllo del citoscheletro (in perdita *ARHGEF5*, in guadagno *SMN*, *FAM21*), ma anche nella neurotossicità ed in patologie del sistema nervoso (in perdita *RUFY2*, *TSHZ2*, *GRIK2*, in guadagno *NOS1*, *CALY*). Sono state inoltre osservate CNV amplificate anche di quattro volte. Per avere informazioni più dettagliate sarà necessario ampliare l'analisi ad altri pazienti e valutare attentamente il ruolo dei geni condivisi.

Concludendo, i nostri risultati mostrano la presenza di alterazioni citogenetiche a livello periferico nei pazienti affetti da Demenza FrontoTemporale (FTD), supportando l'ipotesi del coinvolgimento della proteina tau nella stabilità cromosomica nonché dell'organizzazione cromatinica attraverso l'interazione sia con i microtubuli che con la cromatina stessa.

La predisposizione all'aneuploidia nei linfociti e nei fibroblasti dei nostri pazienti indica infatti un danneggiamento dei microtubuli che comporterebbe un'anomala segregazione dei cromosomi. È interessante notare che anche Pin1, una proteina che modula la fosforilazione di tau, causa non corretta segregazione cromosomica, aneuploidia e trasformazione tumorale in cellule transfettate (Suizu F, 2006).

L'iperfosforilazione di tau in seguito a mutazioni nel gene *MAPT* annullerebbe il suo ruolo nel supporto dei microtubuli nel mantenimento della struttura assonica e dendritica, così come della struttura del fuso mitotico. Errori nel mantenimento e nella segregazione dei cromosomi e nel riparo dei danni al DNA potrebbero causare quindi alterazioni nel dosaggio e nell'espressione genica, che porterebbero al rientro nel ciclo cellulare sia dei neuroni postmitotici che delle cellule staminali neurali con conseguente morte neuronale e degenerazione. Il fatto che la demenza frontotemporale si presenti per lo più in età avanzata e che l'invecchiamento comporti un aumento dell'aneuploidia sia nei precursori neuronali che in altre cellule, supporta l'ipotesi che il lento sviluppo ed accumulo dell'aneuploidia contribuisca a patologie neurodegenerative correlate all'età.

Inoltre, dal momento che anche i radicali dell'ossigeno sono in grado di indurre aberrazioni cromosomiche, le rotture osservate nelle cellule somatiche dei pazienti studiati potrebbero essere correlate ad un elevato livello di stress ossidativo, come già proposto in letteratura per alcune patologie neurodegenerative, quali Alzheimer, Parkinson, Atassia Telangiectasia, Atassia di Friedreich, Corea di Huntington e Sindrome di Down (Migliore L, 2009).

Tau potrebbe quindi essere considerata una proteina multifunzionale, coinvolta anche nel controllo del fuso mitotico e nella stabilità cromosomica e cromatinica, e di conseguenza un possibile componente del complesso sistema alla base della protezione della stabilità genomica.

## *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* 2000;113:3737-45.
- Akhmanova A, Verkerk T, Langeveld A, Grosveld F, Galjart N. Characterization of transcriptionally active and inactive chromatin domains in neurons. *J Cell Sci* 2001;113:4463-74.
- Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* 2002;157, 1187-96.
- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, 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 U.S.A.* 1997;94:298-303.
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 1999;453:260-4.
- Anderson D, Phillips BJ. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. *Food Chem Ox* 1999;37:1015-25.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992;31:10626-33.
- Andreadis A, Wagner BK, Broderick JA, Kosik KS. A tau promoter region without neuronal specificity. *J Neurochem* 1996;66:2257-63.
- 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* 1996;271:28741-4.
- Arrasate M, Pérez M, Valpuesta JM, Avila J. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol* 1997;151:1115-22.
- associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta. *J Biol Chem* 2003;278:18997-19007.
- Avila J, Lucas JJ, Pérez M, Hernández F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 2004;84:361-84.
- 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* 1999;8:711-5.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R. Mutations in progranulin cause tau- negative frontotemporal lobar degeneration linked to chromosome 17. *Nature* 2006;442:916-9.

- Banfi S, Bassi MT, Andolfi G, Marchitello A, Zanotta S et al. Identification and characterization of AFG3L2, a novel paraplegin-related gene. *Genomics* 1999;59:51-8.
- Begni S, Moraschi S, Bignotti S, Fumagalli F, Rillosi L et al. Association between the G1001C polymorphism in the GRIN1 gene promoter region and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2003;53:617-9.
- Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, Aggarwal NT et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease. *Neurology* 2003;60:246-52.
- Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J et al. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 2000;290:2302-3.
- Bird TD, Nochlin D, Poorkaj P, Cherrier M, Kaye J et al. A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain* 1999;122:741-56.
- Black MM, Slaughter T, Moshiah S, Obrocka M, Fischer I. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 1996;16:3601-19.
- Borghi R, Giliberto L, Assini A, Delacourte A, Perry G et al. Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2002;58:589-92.
- Brandt R, Leger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 1995;131:1327-40.
- Broderick J, Wang J, Andreadis A. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E2 binds to tau exon 10 and moderately activates its splicing. *Gene* 2004;331:107-14.
- Buè L, Bussièrè T, Buè-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 2000;33:95-130.
- 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.* 1999;58:667-77.
- 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* 1999; 58:667-77.
- Bullmann T, de Silva R, Holzer M, Mori H, Arendt T. Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 2007;17,98-102.
- Bunker JM, Kamath K, Wilson L, Jordan MA, Feinstein SC. FTDP-17 mutations compromise the ability of tau to regulate microtubule dynamics in cells. *J Biol Chem* 2006;281:11856-63.

- Caceres A, Kosik KS. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 1990;343:461-3.
- Chabrier PE, Demerlé-Pallardy C, Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1029-35.
- Chambers CB, Lee JM, Troncoso JC, Reich S, Muma NA. Overexpression of 4R-tau mRNA isoforms in progressive supranuclear palsy but not in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;46:325-32.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 1992;360:674-7.
- Chen LT, Gilman AG, Kozasa T. A candidate target for G protein action in brain. *J Biol Chem* 1999;274:26931-8.
- Chun W, Johnson GV. Activation of glycogen synthase kinase 3b promotes the intermolecular association of tau. The use of fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Biol Chem* 2007;282:23410-7.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009;11:909-13.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 1977;116:207-25.
- Collot M, Louvard D, Singer SJ. Lysosomes are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1984;81:788-92.
- Conrad C, Andreadis A, Trojanowski JQ, Dickson DW, Kang D et al. Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 1997;41:277-81.
- Conrad C, Vianna C, Freeman M, Davies P. A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002;99:7751-6.
- Constantinidis J, Richard J, Tissot R. Pick's disease. Histological and clinical correlations. *Eur Neurol* 1974;11:208-17.
- Cordato NJ, Pantelis C, Halliday GM, Velakoulis D, Wood SJ et al. Frontal atrophy correlates with behavioural changes in progressive supranuclear palsy. *Brain* 2002;125:789-800.
- Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G. Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein tau cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 1995;89:291-5.
- 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* 1999;96:5598-5603.

- 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* 1999;96:5598-603.
- D'Souza I, Schellenberg GD. Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 2000;275:17700-9.
- D'Souza I, Schellenberg GD. Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 2000;275:17700-9.
- D'Souza I, Schellenberg GD. Tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J Biol Chem* 2002;277:26587-99.
- David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG. Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem* 2002;83:176-85.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 2001;114,1179-87.
- Delisle MB, Murrell JR, Richardson R, Trofatter JA, Rascol O et al. A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;98:62-77.
- Donahue CP, Muratore C, Wu JY, Kosik KS, Wolfe MS. Stabilization of the tau exon 10 stem loop alters pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2006;281:23302-6.
- Doyu M, Sawada K, Mitsuma N, Niwa J, Yoshimoto M et al. Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;87:1-11.
- Dranovsky A, Vincent I, Gregori L, Schwarzman A, Colflesh D et al. Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* 2001;22:517-28.
- Drubin DG, Kirschner MW. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 1986;103:2739-46.
- Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B et al. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 1998;143:777-94
- Eidenmüller J, Fath T, Hellwig A, Reed J, Sontag E, Brandt R. Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins. *Biochemistry* 2000;39:13166-75.
- Errabolu R, Sanders MA, Salisbury JL. Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-

- hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J Cell Sci* 1994;107:9-16.
- Fabre SF, Forsell C, Viitanen M, Sjogren M, Wallin A et al. Clinic-based cases with frontotemporal dementia show increased cerebrospinal fluid tau and high apolipoprotein E epsilon4 frequency, but no tau gene mutations. *Exp Neurol* 2001;168:413-18.
- Fan QW, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 2001;76:391-400.
- Fath T, Eidenmüller J, Brandt R. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002;22:9733-41.
- Fava F, Raynaud-Messina B, Leung-Tack J, Mazzolini L, Li M et al. Human 76p: A new member of the gamma-tubulin-associated protein family. *J Cell Biol* 1999;147:857-68.
- Feany MB, Dickson DW. Widespread cytoskeletal pathology characterizes corticobasal degeneration. *Am J Pathol* 1995;146:1388-96.
- Ferman TJ, McRae CA, Arvanitakis Z, Tsuboi Y, Vo A, Wszolek ZK. Early and pre-symptomatic neuropsychological dysfunction in the PPND family with the N279K tau mutation. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;9:265-70.
- Ferri GL, Possenti R. vgf A neurotrophin-inducible gene expressed in neuroendocrine tissues. *Trends Endocrinol Metab* 1996;7:233-9.
- Feuillette S, Miguel L, Frebourg T, Campion D, Lecourtis M. Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity *in vivo* is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *J Neurochem* 2010;113:895-903.
- Fodero-Tavoletti MT, Hardy MP, Cornell B, Katsis F, Sadek CM et al. Protein tyrosine phosphatase hPTPN20a is targeted to sites of actin polymerization. *Biochem J* 2005;389:343-54.
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 2009;284:12845-52.
- Galimberti D, Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F et al. MCP -1 A-2518G polymorphism: effect on susceptibility for frontotemporal lobar degeneration and on cerebrospinal fluid MCP-1 levels. *J Alzheimers Dis* 2009;17:125-33.
- Geller LN, Potter H. Chromosome missegregation and trisomy 21 mosaicism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 1999;6:167-79.
- Geschwind DH, Robidoux J, Alarcon M, Miller BL, Wilhelmsen KC et al. Dementia and neurodevelopmental predisposition: cognitive dysfunction in presymptomatic subjects precedes dementia by decades in frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2001; 50:741-6.
- Giardino D, Corti C, Ballarati L, Colombo D, Sala E et al. De novo balanced chromosome rearrangements in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2009;29:257-65.

- Gocke CB, Yu H, Kang J. Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem* 2005;280:5004-12.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA. Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett* 1999;450:306-11.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA et al. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989a;3:519-26.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, 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* 1989;8:393-9.
- Goedert M, Spillantini MG. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;1502:110-21.
- 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* 2003;23:8872-80.
- Goldberg DJ, Wu DY. Tyrosine phosphorylation and protrusive structures of the growth cone. *Perspect Dev Neurobiol* 1996;4:183-192.
- Gomez TS, Billadeau DD. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell* 2009;17:699-711.
- Gómez-Ramos A, Diaz-Hernandez M, Cuadros R, Hernandez F, Avila J. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett*. 2006;580:4842-50.
- Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Cuadros R, Hernández F, Avila J. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett* 2006;580:4842-50.
- Gómez-Ramos A, Diaz-Hernandez M, Rubio A, Miras-Portugal MT, Avila J. Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol. Cell Neurosci*. 2008;37:673-81.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2000;275:5535-44.
- Goode BL, Feinstein SC. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 1994;124:769-82.
- Götz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM. Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* 2001;276:529-34.
- Granic A, Padmanabhan J, Norden M, Potter H. Alzheimer Abeta peptide induces

chromosome mis-segregation and aneuploidy, including trisomy 21: requirement for tau and APP. *Mol Biol Cell* 2010;21:511-20.

Grover A, DeTure M, Yen SH, Hutton M. Effects on splicing and protein function of three mutations in codon N296 of tau in vitro. *Neurosci Lett* 2002;323:33-6.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353-6.

Hartmann AM, Rujescu D, Giannakouros T, Nikolakaki E, Goedert M et al. Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors. *Mol Cell Neurosci* 2001;18:80-90.

Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 1998;437:207-10.

Hasegawa M, Smith MJ, Iijima M, Tabira T, Goedert M. FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett.* 1999;443:93-6.

Hasegawa M, Smith MJ, Iijima M, Tabira T, Goedert M. FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett* 1999;443:93-6.

Hauge H, Patzke S, Aasheim HC. Characterization of the FAM110 gene family. *Genomics* 2007;90:14-27.

Hayashi S, Toyoshima Y, Hasegawa M, Umeda Y, Wakabayashi K et al. Late-onset frontotemporal dementia with a novel exon 1 (Arg5His) tau gene mutation. *Ann Neurol* 2002;525-30.

Hernández E, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol. Life Sci.* 2007;64:2219-33.

Hernández E, Perez M, Lucas JJ, Mata AM, Bhat R, Avila J. Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2004;279:3801-6.

Himmler A. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 1989;9:1389-96.

Hodges JR, Davies R, Xuereb J, Kril J, Halliday G. Survival in frontotemporal dementia. *Neurology* 2003;61:349-54.

Hogg M, Grujic ZM, Baker M, Demirci S, Guillozet AL. The L266V tau mutation is associated with frontotemporal dementia and Pick-like 3R and 4R tauopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 2003;106:323-36.

Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L et al. Mutation specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditaryFTDP-17. *Science* 1998;282:1914-7.

Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, et al. Mutation specific

functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 1998;282:1914-7.

Hua Q, He RQ, Haque N, Qu MH, del Carmen Alonso A et al. Microtubule-associated protein binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:413-21.

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* 1998;393:702-5.

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* 1998;393:702-5.

Illenberger S, Zheng-Fischer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K et al. The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* 1998;9:1495-512.

Ingelson M, Vanmechelen E, Lannfelt L. Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett* 1996;220:9-12.

Ingram EM, Spillantini MG. Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends Mol Med* 2002;8:555-62.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso AC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2009;118:53-69.

Iseki E, Matsumura T, Marui W, Hino H, Odawara T et al. Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel N296H mutation in exon 10 of the tau gene and a widespread tau accumulation in the glial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102:285-92.

Iseki E, Matsumura T, Marui W, Hino H, Odawara T et al. Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel N296H mutation in exon 10 of the tau gene and a widespread tau accumulation in the glial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102:285-92.

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* 1999;24:751-62.

Jiang Z, Tang H, Havlioglu N, Zhang X, Stamm S et al. Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta. *J Biol Chem* 2003;278:18997-9007.

Johansson C, Finger LD, Trantirek L, Mueller TD, Kim S et al. Solution structure of the complex formed by the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and a pre-rRNA target. *J Mol Biol* 2004;337:799-816.

Johnson GVV, Bailey CDC. Tau, where are we now? *J Alz Dis* 2002;4:375-98.

Kaindl AM, Rüschemdorf F, Krause S, Goebel HH, Koehler K et al. Missense mutations of ACTA1 cause dominant congenital myopathy with cores. *J Med Genet* 2004;41:842-8.



- Kampers T, Pangalos M, Geerts H, Wiech H, Mandelkow E. Assembly of paired helical filaments from mouse tau: implications for the neurofibrillary pathology in transgenic mouse models for Alzheimer's disease, *FEBS Lett* 1999;451:39-44.
- Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 2003;22:70-7.
- Katz M, Amit I, Citri A, Shay T, Carvalho S et al. A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol* 2007;9:961-9.
- Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett* 1994;351,80-4.
- Khurana V, Lu Y, Steinhilb ML, Oldham S, Shulman JM, Feany MB. TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a Drosophila tauopathy model. *Curr Biol* 2006;16:230-41
- Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:1013-30.
- Kim W, Lee S, Jung C, Ahmed A, Lee G, Hall GF. Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons *in situ*. *J. Alzheimer's Dis.* 2010;19:647-64.
- King ME, Ghoshal N, Wall JS, Binder LI, Ksiezak-Reding H. Structural analysis of Pick's disease-derived and in vitro-assembled tau filaments. *Am J Pathol* 2001;158,1481-90.
- King TD, Bijur GN, Jope RS. Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. *Brain Res* 2001;919(1):106-14
- Kingsbury MA, Yung YC, Peterson SE, Westra JW, Chun J. Aneuploidy in the normal and diseased brain. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2626-41.
- Klein C, Kramer EM, Cardine AM, Schraven B, Brandt R, Trotter J. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci* 2002;22:698-707.
- Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L, McConlogue L. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol* 1991;114:725-33.
- Kodama K, Okada S, Iseki E, Kowalska A, Tabira T et al. Familial frontotemporal dementia with a P301L tau mutation in Japan. *J Neurol Sci* 2000;176:57-64.
- Koh PO, Bergson C, Undie AS, Goldman-Rakic PS, Lidow MS. Up-regulation of the D1 dopamine receptor-interacting protein, calcyon, in patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60:311-9.
- Koh PO, Undie AS, Kabbani N, Levenson R, Goldman-Rakic PS, Lidow MS. Up-regulation of

neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:313-7.

Komori T. Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease. *Brain Pathol* 1999;9:663-79.

Kosik KS, Shimura H. Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1739:298-310.

Krylova SM, Musheev M, Nutiu R, Li Y, Lee G, Krylov SN. Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically-the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *FEBS Lett* 2005;579:1371-5.

Ksiezak-Reding H, He D, Gordon-Krajcer W, Kress Y, Lee S, Dickson DW. Induction of Alzheimer-specific Tau epitope AT100 in apoptotic human fetal astrocytes, *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;47:236-52.

Lapidot-Lifson Y, Patinkin D, Prody CA, Ehrlich G, Seidman S et al. Cloning and antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a human homolog of cdc2 required in hematopoiesis. *Proc Nat Acad Sci* 1992;89:579-83.

Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 2005;437:275-80.

Ledesma MD, Bonay P, Avila J. Tau protein from Alzheimer's disease patients is glycosylated at its tubulin-binding domain. *J Neurochem* 1995;65:1658-64.

Lee G, Neve RL, Kosik KS. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 1989;2:1615-24.

Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 1998;111:3167-77.

Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K et al. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2004;24:2304-12.

Lee R, Kim YJ, Lee YJ, Chung HW. The selective effect of genistein on the toxicity of bleomycin in normal lymphocytes and HL-60 cells. *Toxicology*. 2004;195:87-95.

Lee VMY, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Ann Rev Neurosci* 2001;24:1121-59.

Lesort M, Johnson GV. Insulin-like growth factor-1 and insulin mediate transient site-selective increases in tau phosphorylation in primary cortical neurons, *Neuroscience* 2000;99:305-16.

Leterrier JF, Liem RK, Shelanski ML. Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J Cell Biol* 1982;95:982-6.

- Lewis SA, Cowan N. Microtubule bundling. *Nature* 1990;345:674.
- Liazoghli D, Perreault S, Micheva KD, Desjardins M, Leclerc N. Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol* 2005;166:1499-514.
- Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 1984;259:5301-5.
- Lippa CE, Zhukareva V, Kawarai T, Uryu K, Shafiq M et al. Frontotemporal dementia with novel tau pathology and a Glu342Val tau mutation. *Ann Neurol* 2000;48:850-8.
- Litvan I, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology* 1996;47:1-9.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10804-9.
- Liu F, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Aberant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* 2002;115:829-37.
- Liu WK, Le TV, Adamson J, Baker M, Cookson N et al. Relationship of the extended tau haplotype to tau biochemistry and neuropathology in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 200;50:494-502.
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu K P. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 1999;399:784-88.
- Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 2001;20:27-39.
- Luo MH, Leski ML, Andreadis A. Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. *J Cell Biochem* 2004;91:880-95.
- Ma N, Matsunaga S, Takata H, Ono-Maniwa R, Uchiyama S, Fukui K. Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J Cell Sci* 2007;120:2091-105.
- Magnani E, Fan J, Gasparini L, Golding M, Williams M et al. Interaction of tau protein with the dynein complex. *EMBO J* 2007;26:4546-54
- Malkani R, D'Souza I, Gwinn-Hardy K, Schellenberg GD, Hardy J, Momeni P. A MAPT mutation in a regulatory element upstream of exon 10 causes frontotemporal dementia. *Neurobiol Dis* 2006;22:401-3.
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. Tau domains,

- phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging* 1995;16:355-62.
- Mandell JW, Banker GA. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 1996;16:5727-40.
- Mangiarotti G. Dai geni agli organismi. *Biologia cellulare e genetica*. Piccin editore.
- McConnell MJ, Kaushal D, Yang AH, Kingsbury MA, Rehen SK et al. Failed clearance of aneuploid embryonic neural progenitor cells leads to excess aneuploidy in the Atm-deficient but not the Trp53-deficient adult cerebral cortex. *J Neurosci* 2004;24:8090-6.
- McHugh B, Krause SA, Yu B, Deans AM, Heasman S et al. Invadolysin: a novel, conserved metalloprotease links mitotic structural rearrangements with cell migration. *J Cell Biol* 2004;167:673-86.
- Meraz-Ríos MA, Lira-De León, Campos-Peña, De Anda- Hernández MA, Mena-López R. Tau oligomero and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010;112:1353-67.
- Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res* 2009;674:73-84.
- Mirra SS, Murrell JR, Gearing M, Spillantini MG, Goedert M et al. Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58:335-45.
- Mitchinson TS, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1988;1:761-72.
- 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* 2001;50:117-20.
- Mosch B, Morawski M, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Arendt T. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2007;27:6859-67.
- Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K et al. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007;81:792-8.
- Murphy SM, Preble AM, Patel UK, O'Connell KL, Dias DP et al. GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell* 2001;12:3340-52.
- Murrell JR, Spillantini MG, Zolo P, Guazzelli M, Smith MJ et al. Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant Pick body-like inclusions and axonal deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:1207-26.
- Nakashima H, Ishihara T, Suguimoto P, Yokota O, Oshima E et al. Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol* 2005;110:547-56.
- 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* 1994;79:1209-20.

Nasreddine ZS, Loginov M, Clark LN, Lamarche J, Miller BL et al. From genotype to phenotype: a clinical pathological, and biochemical investigation of frontotemporal dementia and parkinsonism (FTDP-17) caused by the P301L tau mutation. *Ann Neurol* 1999;45:704-15.

Navas P, Muma N., Jin Y, Shannon K., Cochran E et al. Pathological and biochemical characterization of a tau R5L mutation in a single case of PSP. *Soc Neurosci Abstr* 2001;429.4.

Neumann M, Schulz-Schaeffer W, Crowther RA, Smith MJ, Spillantini MG et al. Pick's disease associated with the novel Tau gene mutation K369I. *Ann Neurol* 2001;50:503-13.

neuropsychological dysfunction in the PPND family with the N279K tau mutation. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;9:265-70.

Neystat M, Rzhetskaya M, Oo TF, Kholodilov N, Yarygina O et al. Expression of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in models of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra *in vivo*. *J Neurochem* 2001;77:1611-25.

Nicholl DJ, Greenstone MA, Clarke CE, Rizzu P, Crooks D et al. An English kindred with a novel recessive tauopathy and respiratory failure. *Ann Neurol* 2003;54:682-6.

Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102:6990-5.

Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(19):6990-5.

Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* 2006;281:39413-23.

Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M et al. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Molec Genet* 2000;9:47-56.

Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry* 1995;34:11117-27.

Papasozomenos SC, Su Y. Altered phosphorylation of tau protein in heat-shocked rats and patients with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4543-7.

- Pastor P, Pastor E, Carnero C, Vela R, Garcia T et al. Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene. *Ann Neurol* 2001;49:263-7.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration, *Nature* 1999;402:615-22.
- Perez M, Lim F, Arrasate M, Avila J. The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J Neurochem* 2000;74:2583-89.
- Pickering-Brown S, Baker M, Bird T, Trojanowski J, Lee V et al. Evidence of a founder effect in families with frontotemporal dementia that harbor the tau +16 splice mutation. *Am J Med Genet* 2004;125B:79-82.
- Pickering-Brown SM, Baker M, Gass J, Boeve BF, Loy CT et al. Mutations in progranulin explain atypical phenotypes with variants in MAPT. *Brain* 2006;129:3124-6.
- 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* 2004;127:1415-26.
- Pickering-Brown SM, Richardson AM, Snowden JS, McDonagh AM, Burns A et al. Inherited frontotemporal dementia in nine British families associated with intronic mutations in the tau gene. *Brain* 2002;125:732-51.
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998;43:815-25.
- Qu MH, Li H, Tian R, Nie CL, Liu Y et al. Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *NeuroReport* 2004;15:2723-7.
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 2005;433:382-8.
- Rademakers R, Cruts M, Dermaut B, Sleegers K, Rosso SM et al. Tau negative frontal lobe dementia at 17q21: significant finemapping of the candidate region to a 4.8 cM interval. *Mol Psychiatry* 2002;7:1064-74.
- Rademakers R, Cruts M, van Broeckhoven C. The role of tau (MAPT) in frontotemporal lobar degeneration and related tauopathies. *Hum Mutat* 2004;24(4):277-95.
- Rademakers R, Dermaut B, Peeters K, Cruts M, Heutink P. Tau (MAPT) mutation Arg406Trp presenting clinically with Alzheimer disease does not share a common founder in Western Europe. *Hum Mutat* 2003;22:409-11.
- Radin L, Radin G. The Role of Genetics: A Piece in the FTD Puzzle. *What If It's Not Alzheimer's*. Prometheus Books 2003
- Raux G, Gantier R, Thomas-Anterion C, Boulliat J, Verpillat P et al. Dementia with prominent

- frontotemporal features associated with L113P presenilin 1 mutation. *Neurology* 2000;55:1577-8.
- Rebeiz JJ, Kolodny EH, Richardson EP Jr. Corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia 2. *Arch Neurol* 1968; 18:20-33.
- Reed LA, Grabowski TJ, Schmidt ML, Morris JC, Goate A et al. Autosomal dominant dementia with widespread neurofibrillary tangles. *Ann Neurol* 1997;42:564-72.
- 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* 2000;59:990-1001.
- 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* 2000;59:990-1001.
- Rizzu P, Joosse M, Ravid R, Hoogeveen A, Kamphorst W et al. Mutation-dependent aggregation of tau protein and its selective depletion from the soluble fraction in brain of P301L FTDP-17 patients. *Hum Mol Genet* 2000;9:3075-82.
- 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* 2008;7(12):1788-94.
- Rosso SM, Kamphorst W, de Graaf B, Willemsen R, Ravid R et al. Familial frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions is linked to chromosome 17q21-22. *Brain* 2001;124:1948-57.
- 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* 2002; 51:373-376.
- Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E. Early-onset rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation. *Neurology* 2002;58:811-3.
- 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* 1996;55:534-39.
- Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214), also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments, *Biochemistry* 1999;38:3549-58.
- Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, 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* 1995;92:8463-7.
- Sergeant N, Watzek A, Delacourte A. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms. *J Neurochem* 1999;72:1243-9.

- Shahani N, Brandt R. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1668-80.
- Shapiro L, Colman DR. The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron* 1999;23:427-30.
- Shen Y, Luche R, Wei B, Gordon ML, Diltz CD, Tonks NK. Activation of the Jnk signaling pathway by a dual-specificity phosphatase, JSP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13613-8.
- Sheperd GM. Neurobiology, 3rd Edition 1994 Oxford University Press
- Shimizu T, Watanabe A, Ogawara M, Mori H, Shirasawa T. Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 2000;381:225-34.
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS. CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 2004;279:4869-76.
- Sjoberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 2006;119:2025-34.
- 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* 1999;274:25490-8.
- Soulié C, Lepagnol J, Delacourte A, Caillet-Boudin ML. Dephosphorylation studies of SKNSH-SY 5Y cell Tau proteins by endogenous phosphatase activity. *Neurosci Lett* 1996;206:189-92.
- Sperfeld AD, Collatz MB, Baier H, Palmbach M, Storch A. FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann Neurol* 1999;46:708-15.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7737-41.
- 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* 2000;48:939-43.
- Spina S, Murrell JR, Yoshida H, Ghetti B, Bermingham N et al. The novel Tau mutation G335S: clinical, neuropathological and molecular characterization. *Acta Neuropathol (Berl)* 2007; 113:461-70.
- 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* 1999;155:2153-65.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles,



- neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.* 2002;156:1051-63.
- Stanford PM, Brooks WS, Teber ET, Hallupp M, McLean C et al. Frequency of tau mutations in familial and sporadic frontotemporal dementia and other tauopathies. *J Neurol* 2004;251:1098-104.
- Stanford PM, Halliday GM, Brooks WS, Kwok JB, Storey CE. 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* 2000;123:880-93.
- 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* 2003;126:814-26.
- Suizu F, Ryo A, Wulf G, Lim J, Lu KP. Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Mol Cell Biol* 2006;26:1463-79.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T et al. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9637-4.
- Tanemura K, Murayama M, Akagi T, Hashikawa T, Tominaga T et al. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci* 2002;22:133-41.
- Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knock-out in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 2001;155:65-76.
- Tesseur I, Van Dorpe J, Spittaels K, Van den Haute C, Moechars D, Van Leuven F. Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am J Pathol* 2000;156:951-64.
- Thurston VC, Zinkowski RP, Binder LI. Tau as a nucleolar protein in human nonneuronal cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 1996;105:20-30.
- Tint I, Slaughter T, Fischer I, Black MM. Acute inactivation of tau has no effect on dynamics of microtubules in growing axons of cultured sympathetic neurons. *J Neurosci* 1998;18:8660-73.
- Trojanowski JQ, Lee VM. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J* 1995;9:1570-6.
- Tsang WY, Spektor A, Vijayakumar S, Bista BR, Li J et al. Cep76, a centrosomal protein that specifically restrains centriole reduplication. *Dev Cell* 2009;16:649-60.

- Tucholski J, Kuret J, Johnson GV. Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J Neurochem* 1999;73:1871-80.
- Udolph G, Rath P, Tio M, Toh J, Fang W et al. On the roles of Notch, Delta, kuzbanian, and inscuteable during the development of Drosophila embryonic neuroblast lineages. *Dev Biol* 2009;336:156-68.
- van Herpen E, Rosso SM, Serverijnen LA, Yoshida H, Breedveld G et al. Variable phenotypic expression and extensive tau pathology in two families with the novel tau mutation L315R. *Ann Neurol* 2003;54:573-81.
- van Swieten J, Spillantini MG. Hereditary frontotemporal dementia caused by Tau gene mutations. *Brain Pathol* 2007;17:63-73.
- van Swieten JC, Stevens M, Rosso SM, Rizzu P, Joosse M, et al. Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations. *Ann Neurol* 1999;46:617-26.
- Venturelli E, Villa C, Fenoglio C, Clerici F, Marcone A et al. The NOS3 G894T (Glu298Asp) polymorphism is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *Eur J Neurol* 2009;16:37-42.
- Venturelli E, Villa C, Scarpini E, Fenoglio C, Guidi I et al. Neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism increases the risk for frontotemporal lobar degeneration. *Eur J Neurol* 2008;15:77-81.
- Verpillat P, Ricard S, Hannequin D, Dubois S, Bou J et al. Is the Saitohin gene involved in neurodegenerative diseases? *Ann Neurol* 2002;52:829-32.
- Vitaliani R, Scaravilli T, Egarter-Vigl E, Giometto B, Klein C et al. The pathology of the spinal cord in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:268-74.
- von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J et al. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure, *J Biol Chem* 2001;276:48165-74.
- von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 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* 2000;97:5129-34.
- Walker RH, Friedman J, Wiener J, Hobler R, Gwinn-Hardy K. A family with a tau P301L mutation presenting with parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 2002;9:121-3.
- Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in Neurobiol* 2008;85:148-75.
- Ward BE, Cook RH, Robinson A, Austin JH. Increased aneuploidy in Alzheimer disease. *Am J Med Genet* 1979;3:137-44.

- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1975;72:1858-62.
- Wilquet V, De Strooper B. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14:582-8.
- Wszolek ZK, Pfeiffer RF, Bhatt MH, Schelper RL, Cordes M et al. Rapidly progressive autosomal dominant parkinsonism and dementia with pallido-ponto-nigral degeneration. *Ann Neurol* 1992;32:312-20.
- Wszolek ZK, Tsuboi Y, Uitti RJ, Reed L, Hutton ML et al. Progressive supranuclear palsy as a disease phenotype caused by the S305S tau gene mutation. *Brain* 2001;124:1666-70.
- Wu JY, Kar A, Kuo D, Yu B, Havlioglu N. SRp54, a regulator for tau exon 10 alternative splicing identified by an expression cloning strategy. *Mol Cell Biol* 2006;26:6739-47.
- Xie X, Chang SW, Tatsumoto T, Chan AM, Miki T. TIM, a Dbl-related protein, regulates cell shape and cytoskeletal organization in a Rho-dependent manner. *Cell Signal* 2005;17:461-71.
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. 1999;402:187-91.
- Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N. KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J Cell Biol* 1995;130:1387-99.
- Yang LS, Gordon-Krajcer W, Ksiezak-Reding H. Tau released from paired helical filaments with formic acid or guanidine is susceptible to calpain-mediated proteolysis, *J Neurochem* 1997;69:1548-58.
- Yin J, Kwon YT, Varshavsky A, Wang W. RECQL4, mutated in the Rothmund-Thomson and RAPADILINO syndromes, interacts with ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway. *Hum Mol Genet* 2004;13:2421-30.
- Yoshida H, Crowther RA, Goedert M. Functional effects of tau gene mutations deltaN296 and N296H. *J Neurochem* 2002;80:548-51.
- Yuan A, Kumar A, Peterhoff C, Duff K, Nixon RA. Axonal transport rates *in vivo* are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci* 2008;28:1682-7.
- Yurov YB, Iourov IY, Vorsanova SG, Demidova IA, Kravetz VS et al. The schizophrenia brain exhibits low-level aneuploidy involving chromosome 1. *Schizophr Res* 2008;98:139-47.
- Yurov YB, Vorsanova SG, Iourov IY, Demidova IA, Beresheva AK et al. Unexplained autism is frequently associated with low-level mosaic aneuploidy. *J Med Genet* 2007;44:521-5.
- Zazzi H, Nikoshkov A, Hall K, Luthman H. Structure and transcription regulation of the

human insulin-like growth factor binding protein 4 gene (IGFBP4). *Genomics* 1998;49:401-10.

Zekanowski C, Peplonska B, Styczynska M, Gustaw K, Kuznicki J, Barcikowska M. Mutation screening of the MAPT and STH genes in Polish patients with clinically diagnosed frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003;16:126-31.

Zekanowski C, Wojda U. Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2009;69:232-53.

Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, Mc-Donald Jones G et al. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:227-31.

Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, et al. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 2000;6:873-83.

Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q et al. Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci* 2007;27:12211-20.

Zilka N, Stozicka Z, Kovac A, Pilipcinec E, Bugos O, Novak M. Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the transgenic rat model of tauopathy. *J Neuroimmunol.* 2009;209:16-25.

Ancora non mi sembra vero di essere riuscita anche questa volta ad arrivare fin qui... A questo punto, mancano proprio solo i ringraziamenti...

I primi vanno sicuramente alla Prof.ssa Dalprà che mi ha dato la possibilità di svolgere il dottorato nel Suo laboratorio e che mi ha insegnato la passione per questo lavoro.

Grazie ovviamente alla mia compagna d'avventura (e a volte anche di disavventura!), la mia "gemellina" Tella. Grazie per avermi aiutato, capito, ascoltato, sopportato, fatto compagnia negli interminabili viaggi in macchina nel traffico milanese, fatto sentire più vecchia cercandomi i capelli bianchi, ma soprattutto grazie per esserci stata sempre e comunque, anche quando tutto è diventato più difficile.

Grazie a Saretta perché basta guardarla negli occhi che ti torna il sorriso, a Faby che ha vinto il premio per la storia più intricata, ma anche più appassionante dell'anno e a Sere per la sua disponibilità e per tutto il lavoro fatto per l'array-CGH.

Grazie a tutto il laboratorio di Genetica Medica: a Elena, Franci e Nico, a Eugenio che mi ha fatto scoprire quante cose possa fare un mignolo sotto cappa, al compagno di mensa Roby (prima o poi bisognerà testare se è davvero più brava tua moglie a cucinare!)... e come non ringraziare la grande Giò, preziosa, dolce (ma anche salata!) compagna nelle giornate in laboratorio.

Grazie anche a Simo e Angela, sempre disponibili per un consiglio o un suggerimento.

Grazie alla mia stellina Gianlu, orgoglioso nonostante tutto della sua mamma "scienziata" e ad Ale che ha dovuto sopportare le mie crisi isteriche e la mia stanchezza.

Grazie alla mia famiglia, che mi è sempre stata accanto, ha creduto in me e ha condiviso le mie gioie ed i miei dolori.

Grazie a tutti quelli che mi hanno fatto sentire la loro vicinanza e mi hanno dimostrato il loro affetto quando il mio Angelo è volato via.

E infine un grazie speciale ai miei Angeli lassù che sono parte del mio cuore e sono sicura che veglieranno sempre su di me e mi aiuteranno quando più ne avrò bisogno...