



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA
TOSCANO DI NEUROSCIENZE

CICLO XXVIII

COORDINATORE Prof. Renato Corradetti

**PROFILO GENETICO ED EPIGENETICO
IN PAZIENTI CON DEMENZA
FRONTOTEMPORALE**

Settore Scientifico Disciplinare MED/26

Dottorando
Dott.ssa Piaceri Irene

Tutor
Prof. Sorbi Sandro

Coordinatore
Prof. Renato Corradetti

Anni 2012/2015

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. DEMENZA FRONTOTEMPORALE	2
1.1 <i>Diagnosi Clinica</i>	4
1.1.1 Variante comportamentale (bvFTD)	5
1.1.2 Afasia primaria progressiva (PPA)	6
1.1.2.1 Afasia progressiva non fluente (PNFA).....	7
1.1.2.2 Demenza Semantica (SD).....	8
1.1.3 Degenerazione corticobasale (CBD) e Paralisi sopranucleare progressiva (PSP)	9
1.2 <i>FTD/SLA spectrum</i>	10
1.3 <i>Aspetti Neuropatologici e Istopatologici</i>	11
2. LA GENETICA DELLA DEMENZA FRONTOTEMPORALE	14
2.1 <i>MAPT</i>	16
2.2 <i>GRN</i>	18
2.3 <i>VCP</i>	21
2.4 <i>TARDBP e FUS</i>	23
2.5 <i>CHMP2B</i>	25
3. C9ORF72: CHROMOSOME 9 OPEN READING FRAME 72.....	27
4. EPIGENETICA	32
4.1 <i>Rimodellamento della cromatina</i>	33
4.2 <i>RNA non codificanti</i>	34
4.3 <i>Metilazione del DNA</i>	35
4.3.1 C9orf72 e la metilazione del DNA	36
OBIETTIVI DELLO STUDIO	39
MATERIALI E METODI	40
6.1 SOGGETTI	40
6.2 ANALISI GENETICA	41
6.2.1 <i>Estrazione del DNA genomico</i>	41
6.2.2 <i>Amplificazione tramite PCR</i>	41

6.2.3	<i>Analisi di prescreening HRM</i>	42
6.2.4	<i>Trattamento con bisolfito</i>	43
6.2.5	<i>Analisi di Sequenza</i>	44
6.2.6	<i>Genotipizzazione delle ripetizioni G₄C₂ in C9orf72</i>	45
6.2.7	<i>Analisi del polimorfismo dell'APOE</i>	47
6.3	DOSAGGIO PROGRANULINA PLASMATICA	47
6.4	ANALISI BIOINFORMATICA E STATISTICA	48
	RISULTATI	49
7.1	SCREENING DI MUTAZIONI AUTOSOMICHE DOMINANTI	49
7.1.1	<i>Gene MAPT</i>	50
7.1.2	<i>Gene GRN</i>	50
7.1.3	<i>L'espansione C9orf72</i>	54
7.3	LIVELLI DI METILAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE C9ORF72	56
	DISCUSSIONE	60
	BIBLIOGRAFIA	I

INTRODUZIONE

Le malattie neurodegenerative sono patologie caratterizzate dalla perdita progressiva di neuroni e di cellule nervose all'interno di sistemi neuronali specifici. A seconda del numero, posizione e tipo di cellule danneggiate, il deterioramento può provocare deficit cognitivi, demenza, alterazioni motorie, disturbi comportamentali e psicologici con esito gravemente invalidante.

Lo studio dell'eziologia delle malattie neurodegenerative ha preso in esame molteplici meccanismi patologici evidenziando come caratteristica patologica più frequente l'accumulo e l'aggregazione di proteine anomale o mal ripiegate [Ramanan *et al.*, 2013].

Nell'ambito delle malattie neurodegenerative, le varie forme di demenza rappresentano sicuramente una priorità, sia da un punto di vista sanitario che sociale. Dopo oltre un secolo dalla descrizione clinica delle demenze, numerosi sforzi sono stati compiuti per individuare la componente genetica responsabile dell'insorgenza della patologia identificando diversi geni causativi.

La demenza Frontotemporale rappresenta la seconda forma di demenza più frequente nella popolazione di età inferiore ai 65 anni, preceduta soltanto dalla Malattia di Alzheimer ed è globalmente responsabile del 5-15% di tutti i casi di demenza. È una patologia eziologicamente molto complessa e coinvolge fattori sia genetici che ambientali. Le modificazioni epigenetiche potrebbero essere la chiave per comprendere al meglio la patogenesi della malattia. Infatti, negli ultimi dieci anni, lo studio dei meccanismi epigenetici sul sistema nervoso è risultato l'unico settore di ricerca in grado di spiegare l'interazione tra geni e ambiente [Sweatt JD, 2013]. Queste modificazioni giocano un ruolo critico nel determinare il destino di tutte le cellule, anche di quelle non proliferanti, e, negli ultimi anni, le modificazioni epigenetiche del DNA e della cromatina sono risultate essere mediatori essenziali per la formazione della memoria attraverso una specifica regolazione dell'espressione genica [Sultan *et al.*, 2011].

1. Demenza Frontotemporale

Alla fine del XIX secolo Arnold Pick descrisse per la prima volta una serie di pazienti con progressiva afasia, aprassia e cambiamenti comportamentali associati ad atrofia frontotemporale [Pick, 1892]. Tuttavia, il termine “degenerazione frontotemporale” (FTD) fu usato per la prima volta nel 1988 da Neary e colleghi per descrivere una sindrome clinica priva di specifiche connotazioni istologiche [Neary *et al.*, 1988] andando a sostituire il termine di “degenerazione del lobo frontale di tipo non - Alzheimer” [Gustafson *et al.*, 1987].

I primi criteri per la diagnosi clinica di FTD furono formulati nel 1994 dal gruppo di Lund-Manchester [Brun *et al.*, 1994]. Questi criteri, senza indicare il numero degli elementi clinici indispensabili per fare diagnosi di FTD, erano però in grado di discriminare le due forme principali di demenza: la malattia di Alzheimer e la demenza Frontotemporale. Successivamente, negli anni 1998 e 2001, questi criteri sono stati rivisti, inserendo la descrizione di sindromi cliniche principali all'interno del gruppo FTD: la variante comportamentale della demenza frontotemporale (bvFTD); l'afasia primaria progressiva (PPA) che include l'afasia non fluente progressiva (PNFA) e la demenza Semantica (SD) [Neary *et al.*, 1998]; la paralisi sopranucleare Progressiva (PSP); la Sindrome Corticobasale (CBS) [McKhann *et al.*, 2001]. La demenza Frontotemporale è stata quindi definita come un fenotipo patologico caratterizzato principalmente da atrofia dei lobi frontali e temporali causa di sindromi con pattern distintivo al neuroimaging [Karageorgiou *et al.*, 2014].

I dati epidemiologici riguardanti incidenza e prevalenza della FTD sono stati per molto tempo controversi, risentendo dei diversi criteri clinici utilizzati nei vari studi. Ad oggi si ritiene abbia una incidenza di circa 20-30 casi su 100.000 abitanti l'anno (casistica inglese), anche se ancora mancano studi epidemiologici su larga scala. I dati ottenuti fino ad ora suggeriscono che la FTD sia, per frequenza, la terza causa di demenza in tutti i gruppi di età dopo la malattia di Alzheimer e la demenza a corpi di Lewy rappresentando il 5-10% di tutti i casi patologicamente confermati [Snowden *et al.*, 2002]. Nei pazienti con esordio inferiore ai 65 anni è considerata la seconda forma di demenza presenile, preceduta soltanto dalla malattia di Alzheimer [Snowden *et al.*, 2002, Ratnavalli *et al.*, 2002].

Studi di popolazione non mostrano la presenza di una suscettibilità associata al sesso, non evidenziando differenze nell'incidenza della patologia tra donne e uomini [Seelaar *et al.*, 2011]. Solo lo studio di Ratnavalli e colleghi nel 2002 rilevò una netta predominanza nella loro casistica del sesso maschile, con un rapporto maschi-femmine di 14:3 [Ratnavalli *et al.*, 2002] e, in generale, diversi studi riportano una maggiore frequenza nel sesso maschile per la bvFTD e la SD e nel sesso femminile per la PNFA [Seltman *et al.*, 2012].

Rispetto alla malattia di Alzheimer, l'età media di insorgenza della FTD è più bassa (45-65 anni) diventando causa rara di demenza nella popolazione oltre i 65 anni [Ratnavalli *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2004]. Dalla diagnosi clinica di FTD, la sopravvivenza media è compresa tra 3 e 4 anni [Hodges *et al.*, 2003] aumentando sensibilmente tra 6.6 e 11.0 anni se prendiamo invece in esame la sopravvivenza dall'esordio dei sintomi [Knopman *et al.*, 2011]. Le diverse sindromi appartenenti al gruppo FTD si distinguono anche in termini di prognosi: bvFTD si assocerebbe ad una sopravvivenza media di 8,7 anni dall'esordio, PNFA di 9,4 anni e SD di 11,9 anni [Ratnavalli *et al.*, 2002] (Tabella 1). Roberson e colleghi hanno documentato che la sopravvivenza media è inferiore a quella riscontrata nella malattia di Alzheimer [Roberson *et al.*, 2005], soprattutto se la demenza è associata alla malattia del motoneurone (2.4–4.9 anni dall'esordio, 1.2-1.4 dalla diagnosi).

Tabella 1. Epidemiologia della Demenza Frontotemporale suddivisa nelle principali sindromi cliniche.

Sindrome Clinica	Casi (%)	Età media di insorgenza (range)	Aspettativa di vita dall'esordio dei sintomi (aa)	Aspettativa di vita dalla diagnosi (aa)
Variante comportamentale	54-69	58 (47-82)	9 6 se presente SLA	5 1 se presente SLA
Afasia non fluente primaria progressiva	14-35	63 (42-79)	9	4
Demenza Semantica	6-10	62 (52-85)	12	5

1.1 Diagnosi Clinica

Il primo obiettivo del processo diagnostico nella FTD è identificare la sindrome fenotipica (bvFTD vs. SD vs. PNFA *etc.*) rispetto ad altri tipi di demenza. Tutte le forme di FTD sono accomunate da un esordio insidioso con compromissione del comportamento o del linguaggio e da un progressivo declino funzionale [Neary *et al.*, 1998, Seelar *et al.*, 2011]. Durante la storia naturale della malattia, le tre varianti di FTD tendono a convergere da un punto di vista clinico, poiché l'iniziale atrofia focale progredisce inesorabilmente verso un coinvolgimento frontotemporale diffuso [Borrioni *et al.*, 2010]. In tutte le varianti fenotipiche di FTD si possono riscontrare paralisi bulbare, atrofia e fascicolazioni, segni caratteristici della malattia del motoneurone. Sono presenti differenze distintive tra i pazienti colpiti prevalentemente nella parte destra dell'emisfero cerebrale rispetto a quella sinistra. I pazienti con atrofia predominante a destra tendono ad essere emotivamente freddi e distanti, interrompono le relazioni familiari e si presentano con disturbi comportamentali che spesso vengono erroneamente interpretati come sintomi psichiatrici. I pazienti con atrofia predominante a sinistra invece presentano nella maggior parte dei casi problemi al linguaggio [Karageorgiou *et al.*, 2014].

1.1.1 Variante comportamentale (bvFTD)

La variante comportamentale di FTD (bvFTD) è il fenotipo clinico più comune (frequenza stimata attorno al 70%) [Snowden *et al.*, 2002] ed è caratterizzata da cambiamenti della personalità, fluttuazioni emotive e alterazioni delle abitudini sociali ed interpersonali. Il cambiamento caratteriale non è però uniforme ed è difficile ricostruire retrospettivamente l'epoca di esordio. I disturbi tipici possono variare da alterazioni della personalità e del comportamento con quadri di apatia e perdita di interesse negli affari personali alla disinibizione, ad azioni impulsive e comportamenti socialmente imbarazzanti [Miller *et al.*, 1997]. Nelle prime fasi di malattia i disturbi del linguaggio non sono comuni ed il quadro clinico è generalmente dominato dalle modificazioni del comportamento. I test neuropsicologici possono inizialmente risultare normali indirizzando la diagnosi verso patologie psicologiche o psichiatriche [Cerami *et al.*, 2012]. Gradualmente compaiono disturbi attentivi e deficit cognitivi specialmente nei settori della pianificazione e del giudizio (Figura 1). La memoria episodica è interessata in modo parziale e, a differenza della malattia di Alzheimer, le funzioni visuospatiali all'esordio sono conservate [Kramer *et al.*, 2003].

Gli studi di neuroimaging hanno dimostrato un coinvolgimento frontale sia strutturale (atrofia della materia grigia) che funzionale (ipoperfusione e ipometabolismo) [Rosen *et al.*, 2002; Grimmer *et al.*, 2004; Whitewell *et al.*, 2010]. Negli ultimi anni, infatti, le metodiche di medicina nucleare, come PET (tomografia ad emissione di positroni) e SPECT (tomografia ad emissione di fotone singolo), grazie alla loro elevata sensibilità, hanno permesso di identificare precocemente la presenza di ipometabolismo o di ipoperfusione cerebrale a livello frontale o frontotemporale [Womack *et al.*, 2011]. Le diverse presentazioni cliniche riflettono specifici danni cerebrali: l'atrofia dorso mediale frontale correla con apatia mentre l'atrofia orbito frontale è associata a comportamenti disinibiti. Il rilievo di una atrofia focale lobare alla TAC o alla RMN ha un ruolo rilevante sia nella diagnosi di bvFTD sia nella valutazione della velocità di progressione della patologia, soprattutto se combinato alle valutazioni cliniche e neuropsicologiche (Figura 1). Il sottotipo anatomico di bvFTD sembra essere un importante predittore del declino funzionale; le forme frontotemporale e frontale dominante sarebbero associate ad una prognosi più severa [Josephs *et al.*, 2011]. Nel 2011

L'International Behavioural Variant FTD Criteria Consortium (FTDC) ha stilato nuovi criteri per la diagnosi di bvFTD [Rascovsky K *et al.*, 2011], che prendono in considerazione il progressivo deterioramento del comportamento e/o della sfera cognitiva rilevato durante osservazione diretta del paziente e si caratterizzano per una sensibilità maggiore rispetto ai precedenti. Tuttavia, per poter diagnosticare una bvFTD definita, è sempre necessaria la dimostrazione istopatologica (postmortem) o la presenza di una mutazione patogenetica nota.

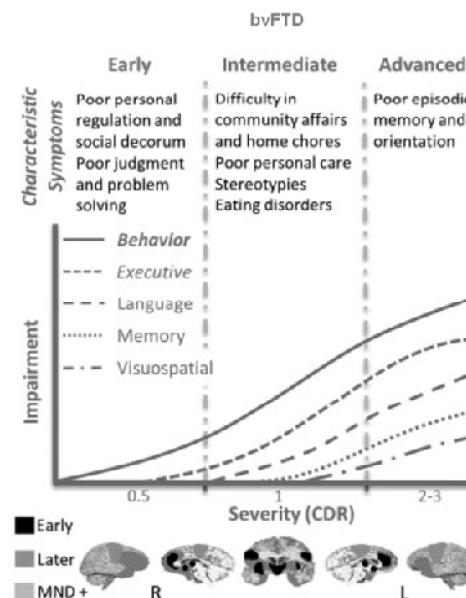


Figura 1. Modello cognitivo, comportamentale e pattern di atrofia associato alla progressione di malattia nella variante comportamentale FTD [Karageorgiou *et al.*, 2014].

1.1.2 Afasia primaria progressiva (PPA)

Il secondo fenotipo di FTD, denominato PPA, è caratterizzato da una precoce e prominente compromissione delle abilità linguistiche, mantenendo relativamente ben conservate le altre funzioni cognitive, almeno nella prima fase di malattia. Attualmente si distinguono tre differenti forme cliniche di PPA: l'afasia agrammatica, la variante logopenica e la demenza semantica in base alle differenze nella natura del disturbo del linguaggio e nella capacità di esprimersi [Mesulam, 2001].

1.1.2.1 Afasia progressiva non fluente (PNFA)

La variante non fluente o agrammatica (PNFA) è caratterizzata da un importante agrammatismo. La comprensione è compromessa precocemente ed è evidente l'influenza data dalla complessità grammaticale della frase [Hodges 1996]. I pazienti riescono a comprendere il significato di singole parole o degli oggetti, ma non delle frasi complesse. Rispetto alla demenza semantica, nella PNFA la capacità di trovare le parole è relativamente mantenuta, così come la comprensione di frasi semplici [Seltman et al.; 2012]. Il disturbo lessicale tende a rimanere isolato senza coinvolgere altri domini cognitivi (Figura 2); in alcuni casi possono comparire problemi motori compatibili con la diagnosi di Degenerazione corticobasale o Paralisi sopranucleare progressiva [Knibb et al., 2006] o alterazioni del comportamento, anche se con una frequenza minore e meno severa rispetto alla bvFTD e alla SD [Premi et al., 2012]. La PNFA è caratterizzata da atrofia nell'opercolo frontale sinistro e da un coinvolgimento selettivo delle aree perisilviane sinistre, della corteccia frontale inferiore, dell'insula e delle aree motorie supplementari e premotorie, tali da causare la comparsa di agrammatismo, disturbi della lettura e della scrittura e relativa diminuzione della comprensione del significato delle parole [Karageorgiou et al., 2014].

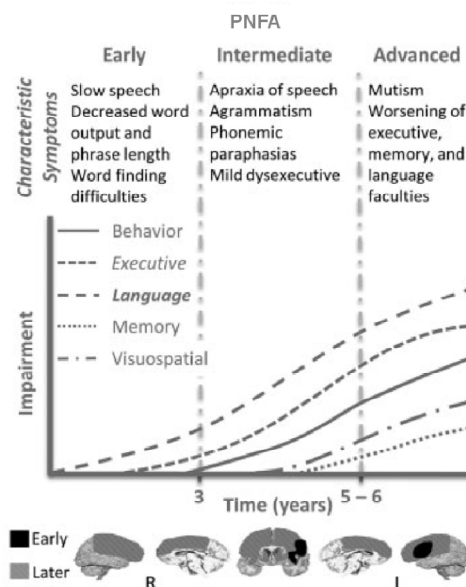


Figura 2. Modello cognitivo, comportamentale e pattern di atrofia associato alla progressione di malattia nell'Afasia progressiva non fluente [Karageorgiou et al., 2014].

1.1.2.2 Demenza Semantica (SD)

La SD è detta anche afasia primaria progressiva-semantiche ed è caratterizzata dalla perdita del significato semantico delle parole, del linguaggio fluente e dalla presenza di deficit nella comprensione, con possibile anomia ed alterazioni del comportamento. L'anomia e i deficit nella comprensione di singole parole sono considerati i deficit centrali di questa variante e le attuali linee guida li valutano entrambi essenziali per formulare la diagnosi. Nonostante questi deficit siano presenti anche in altre forme di PPA ed in altri disordini neurodegenerativi, nella SD il disturbo risulta essere più grave, soprattutto rispetto agli altri domini del linguaggio che vengono risparmiati [Gorno-Tempini *et al.*, 2011]. La comprensione dei singoli termini è severamente compromessa, soprattutto per quanto riguarda le parole meno utilizzate; in alcuni casi la difficoltà nel capire parole poco familiari, specialmente negli stadi precoci, può essere l'unico elemento accanto all'anomia (Figura 3). I deficit semantici coinvolgono in genere tutte le categorie (persone, animali, oggetti).

I sintomi correlano con una precoce atrofia selettiva del lobo temporale sinistro, con un preferenziale interessamento della corteccia temporo-polare ed infero-temporale, centro effettivo della conoscenza semantica e da cui si diffonde la degenerazione, che in seguito raggiunge le aree frontali ed il fascicolo uncinato. Un coinvolgimento primario a sinistra è associato ad una perdita progressiva della conoscenza semantica di parole, oggetti e concetti. Al contrario, i pazienti con coinvolgimento primario a destra presentano prosopagnosia e disturbi del comportamento [Borrioni *et al.*, 2007].

Il coinvolgimento delle strutture temporo-mesiali con gradiente antero-posteriore e maggiormente dell'amigdala rispetto all'ippocampo determina la comparsa di un'afasia fluente nella quale la perdita della memoria semantica porta a grave anomia e alla riduzione della comprensione verbale.

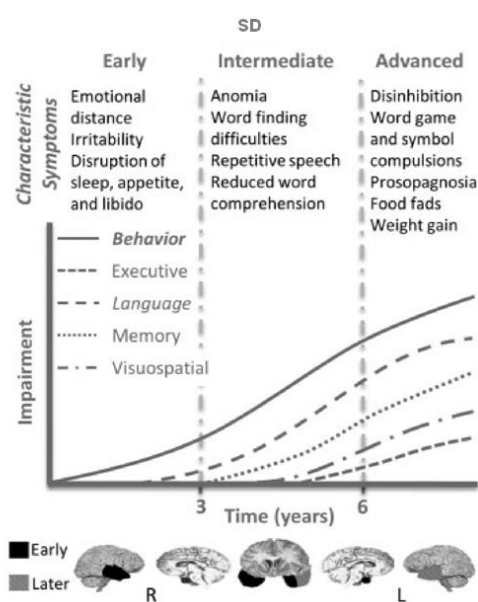


Figura 3. Modello cognitivo, comportamentale e pattern di atrofia associato alla progressione di malattia nella demenza semantica [Karageorgiou *et al.*, 2014].

1.1.3 Degenerazione corticobasale (CBD) e Paralisi sopranucleare progressiva (PSP)

La demenza corticobasale (CBD) e la paralisi sopranucleare progressiva (PSP) sono due sindromi da overlap. Infatti, entrambe le patologie possono presentare disturbi del comportamento simili a quelli della bvFTD o del linguaggio del tipo PNFA sebbene pazienti inizialmente diagnosticati come bvFTD o PNFA possono mostrare invece disordini del movimento come in CBD o PSP.

La CBD è un disordine progressivo caratterizzato dalla comparsa di segni corticali ed extrapiramidali asimmetrici: I primi includono aprassia degli arti, mioclonia, fenomeno dell'arto alieno (movimento dell'arto involontario, talora antagonista al movimento volontario), alterazione della sensibilità corticale; i secondi comprendono bradicinesia, tremore, rigidità degli arti e distonia. Questa sindrome si associa ad una atrofia asimmetrica della corteccia premotoria, dello striato e del giro parietale superiore.

La PSP è un disordine del movimento raro caratterizzato da instabilità posturale e frequenti cadute, disartria, bradicinesia, rigidità assiale, paralisi dello sguardo di verticalità e progressivo declino funzionale. Da un punto di vista anatomopatologico si riscontra una atrofia della sostanza nera, del

globus pallidus e del nucleo subtalamico, con relativo risparmio, almeno nelle fasi iniziali della corteccia frontale.

1.2 FTD/SLA *spectrum*

Hudson e colleghi, nel 1981, identificarono 60 famiglie con Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e tra queste, 9 (15%) presentavano anche deterioramento cognitivo. Oltre alle 9 famiglie, furono anche individuati 42 casi sporadici di SLA con demenza o parkinsonismo, suggerendo una sovrapposizione tra le varie sindromi neurodegenerative [Hudson 1981]. Le autopsie di questi primi casi in cui era presente sia SLA che demenza rivelarono atrofie frontotemporali e nessun segno di degenerazione tipico della malattia di Alzheimer [Hudson 1981].

La SLA-FTD è più comune negli uomini rispetto alle donne ed in genere questi pazienti hanno l'insorgenza dei primi sintomi intorno ai 50 anni. I sintomi della SLA possono precedere, verificarsi contemporaneamente o seguire i segni e i sintomi della FTD, anche se è più frequente individuare prima il deterioramento cognitivo e poi i primi sintomi di debolezza muscolare. L'intervallo di tempo tra l'insorgenza dei sintomi cognitivi e quelli della SLA può variare tra i due mesi fino ad un massimo di 7 anni, con una media di circa due anni [Mitsuyama 1993; Hudson 1981; Rakovicz *et al.*, 1998]. La SLA può presentarsi in contemporanea a qualsiasi variante di FTD, ma più frequentemente è associata a bvFTD. La sopravvivenza per i pazienti con SLA-FTD è peggiore rispetto a quella dei pazienti con una sola delle due sindromi [Lillo *et al.*, 2010; Elamin *et al.*, 2011]. In coloro che risultano essere cognitivamente compromessi ma non chiaramente dementi, il tipo di disfunzione frontotemporale può influenzare la sopravvivenza.

Strong e i colleghi, nel 2009, proposero il seguente sistema di classificazione per le sindromi frontotemporali nella SLA [Strong *et al.*, 2009]:

- SLAci o cognitivamente compromessa;
- SLAbi o comportamentale;
- SLA-FTD in cui sono soddisfatti i criteri di Neary [Neary *et al.*, 1998]
- FTD-MND in cui è presente una perdita di motoneuroni, ma non sono presenti i sintomi della malattia dei motoneuroni;
- SLA-demenza in cui non è presente FTD ma malattia di Alzheimer e demenza vascolare.

Il legame tra SLA e FTD è stato ulteriormente consolidato negli ultimi 5 anni, quando molti geni sono stati riconosciuti come causativi per entrambe le patologie. I marcatori patologici e genetici condivisi e i segni neurologici comuni tra queste malattie ha dato origine al concetto di SLA/FTD *spectrum*.

1.3 Aspetti Neuropatologici e Istopatologici

Il termine di Degenerazione Frontotemporale indica tutti i cambiamenti patologici macroscopici e microscopici riscontrabili all'esame istopatologico dei campioni cerebrali provenienti da pazienti diagnosticati FTD. Questi campioni autoptici, caratterizzati da diversi pattern di atrofia dei lobi temporali e frontali anteriori, correlano con particolari fenotipi clinici. La prima caratterizzazione istologica della FTD fu elaborata nel 1994 e considerava tre differenti "istotipi": *FTD-type*, più frequente, *Pick-type* e *MND-type* (degenerazione lobare e malattia del motoneurone) [Brun *et al.*, 1994]. Nel tempo, grazie al progredire delle tecniche di immunistochimica, è stato possibile riformulare ed apportare modifiche per l'identificazione delle categorie di FTD e per la discriminazione dei quadri istologici eziologicamente distinti. Nel 2007, fu introdotta una nuova classificazione [Cairns *et al.*, 2007] che distingueva:

-*Tau-patie*, legate alle mutazioni nel gene *MAPT* (microtubule associated protein tau) a cui appartiene anche il fenotipo FTD con parkinsonismo legato al cromosoma 17 (*FTDP-17 type*).

-*TDP-43 proteinopatie*, di cui fanno parte tre istotipi diversi

FTLD-U tipo 1 frequentemente associato al fenotipo clinico della SD

FTLD-U tipo 2 corrispondente a FTD-MND

FTLD-U tipo 3 che spesso è correlato a PNFA

-*Non Tau-patie non TDP-43 proteinopatie*, comprendente il quadro con inclusioni neuronali di filamenti intermedi (NIFID) e il quadro di demenza priva di istopatologia distintiva (DLHD).

La classificazione ancora oggi utilizzata è quella introdotta nel 2009 da Mackenzie, che distingue la FTD in base alla presenza/assenza di specifiche inclusioni cellulari [Mackenzie *et al.*, 2009]:

a) FTD-TAU. Circa il 40% dei pazienti mostra all'esame immunostologico inclusioni tau positive. Tau è una proteina associata ai microtubuli ed è localizzata a livello assonale, dove promuove la polimerizzazione della

tubulina. Fisiologicamente, il cervello umano esprime sei diverse isoforme di questa proteina. Tre isoforme contengono tre sequenze ripetute leganti i microtubuli (3R) mentre le altre tre presentano quattro ripetizioni (4R). Le patologie neurodegenerative caratterizzate da un progressivo accumulo di proteina tau sono chiamate taupatie. Fanno parte di questo gruppo di malattie la malattia di Pick, i pazienti FTD portatori di mutazione nel gene *MAPT*, la PSP e la CBD [Cairns *et al.*, 2007], che si distinguono anche per la predominanza di proteina Tau 3R o Tau 4R. Nella malattia di Pick, ad esempio, troviamo i caratteristici corpi di Pick che sono inclusioni formate principalmente dall'isoforma della proteina Tau 3R, mentre nella PSP e nella CBD sono presenti in prevalenza aggregati formati dall'isoforma 4R.

- b) FTD-TDP con inclusioni tau negative, ubiquitina e TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) positive. TDP 43 è una proteina nucleare espressa in modo ubiquitario. Il segnale immunostochimico si localizza principalmente nel citoplasma dei neuroni appartenenti alle aree interessate dalla malattia oltre ai neuroni del giro dentato dell'ippocampo [Neumann *et al.*, 2006].
- c) FTD-FUS con inclusioni FUS positive. La maggior parte delle forme di FTD negative per tau e TDP43 risultano positive per la proteina FUS. Questa proteina è codificata dal gene *FUS/TLS* situato sul cromosoma 16 ed è coinvolta come la proteina TDP-43 nella regolazione della processazione dell'RNA. Nel corso del processo patogenetico la proteina FUS subisce una traslocazione a livello citoplasmatico, andando a costituire gli aggregati intraneuronali. I primi casi di patologia connessa con FUS sono stati descritti nell'ambito di forme familiari di SLA. Le forme FTLD-FUS si caratterizzano per un esordio molto precoce, anche prima dei 40 anni e per la presenza di caratteri psichiatrici importanti come allucinazioni e depressione [Seelar *et al.*, 2010].
- d) Forme più rare. In un numero esiguo di casi le inclusioni proteiche rimangono ancora oggi sconosciute e sono state classificate come:
 - FTD-UPS con positività per il sistema ubiquitina proteasoma;
 - FTD-IF con immunoreattività per i filamenti intermedi di tipo IV;
 - FTD-ni in cui non si riesce a dimostrare la presenza di inclusioni.

Per quanto riguarda la variante comportamentale non esiste una correlazione tra un determinato quadro neuropatologico ed uno specifico fenotipo clinico. La maggior parte dei pazienti affetti da bvFTD mostra equamente sia inclusioni Tau positive che TDP-43 positive, mentre una piccola percentuale è caratterizzata da inclusioni FUS positive [Peelaer *et al.*, 2010]. Al contrario le varianti cliniche di PNFA sono associate a quadri neuropatologici specifici. La variante non fluente è associata ad inclusioni tau 4R positive e TDP-43 type A [Knibb *et al.*, 2006] mentre la variante semantica alle inclusioni TDP-43 type C positive [Hodges *et al.*, 2004] (Figura 4).

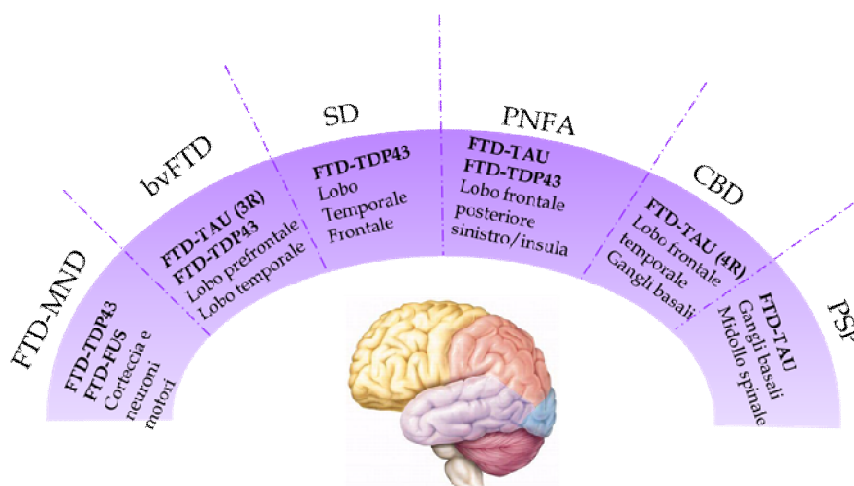


Figura 4. Fenotipi, pattern di atrofia e aspetti istopatologici correlati alle principali sindromi cliniche di FTD

2. La genetica della demenza frontotemporale

La storia della genetica della demenza frontotemporale è recente. Le prime importanti scoperte risalgono al 1997 [Froelich *et al.*, 1997] quando fu identificato il primo *locus* sul cromosoma 17 associato alla malattia. Il 25-50% dei casi di FTD mostra una storia familiare positiva per demenza [Lashley *et al.*, 2011] e circa il 10% ha un chiaro pattern di ereditarietà autosomica dominante ad alta penetranza [Murray *et al.*, 2011, Rohrer *et al.*, 2009]. Inoltre, studi epidemiologici hanno evidenziato un chiaro aumento del rischio di malattia nei parenti di primo grado di pazienti affetti da FTD (3.5 volte maggiore rispetto alla popolazione generale) [Steven *et al.*, 1998].

Studi genetici hanno dimostrato che la FTD è l'espressione di molteplici geni alterati ed è quindi considerata una patologia geneticamente eterogenea (Figura 5). I pazienti con forma monogenica della malattia spesso presentano un'estesa variabilità fenotipica, presente anche tra pazienti portatori della stessa mutazione.

Il sottotipo FTD con componente ereditaria maggiormente espressa è la variante comportamentale (45%), specialmente se associata alla malattia del motoneurone (MND) (60%) [Goldman *et al.*, 2005].

Esiste una correlazione abbastanza stretta tra il tipo di mutazione genetica e le diverse alterazioni neuropatologiche con le quali si classificano i diversi tipi di FTD [Mackenzie *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010]. Le inclusioni neuronali e gliali di proteina tau iperfosforilata, sono state identificate nei pazienti FTD-TAU, risultati in seguito portatori di mutazioni geniche nel gene *MAPT* (microtubule associated protein tau gene), così come nella malattia di Pick, nella PSP e nella CBD [Josephs *et al.*, 2006]. Solo dopo la scoperta del gene *GRN* (Granulin) e *TARDBP* (TAR DNA-binding protein 43, TDP-43) le inclusioni ubiquitina-positive originariamente chiamate FTD-U [Mackenzie *et al.*, 2006], sono stati successivamente rinominate FTD-TDP [Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006](Figura 6). Le inclusioni TDP-43 sono state individuate anche nella maggior parte dei casi con sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e FTD-MND. Nel 2009, circa il 10% dei casi negativi sia alle inclusioni tau che TDP-43 sono stati caratterizzati da inclusioni immunoreattive per FUS e conseguentemente definite FTD-FUS [Munoz *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009; Rademakers *et al.*, 2009].

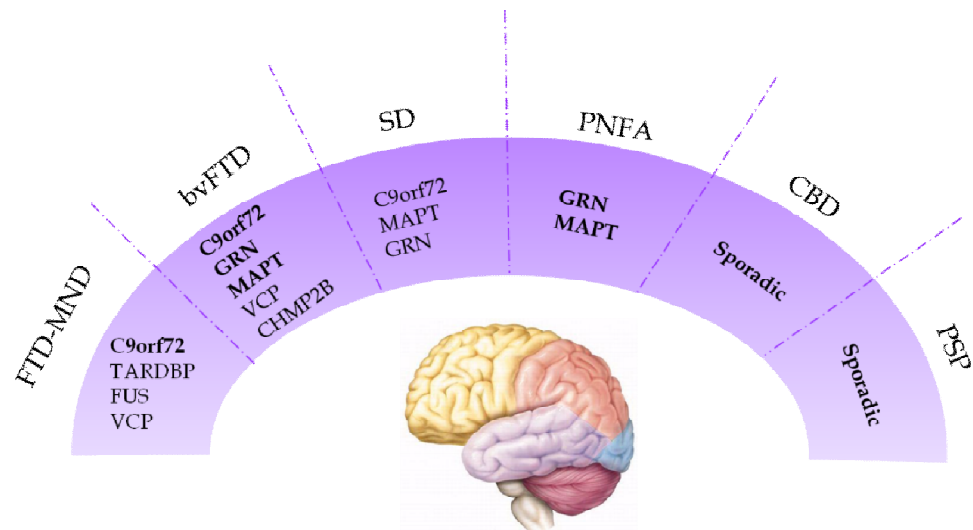


Figura 5. Spettro delle cause genetiche associate alle sindromi cliniche FTD. C9orf72, GRN e MAPT sono i geni causativi principali.

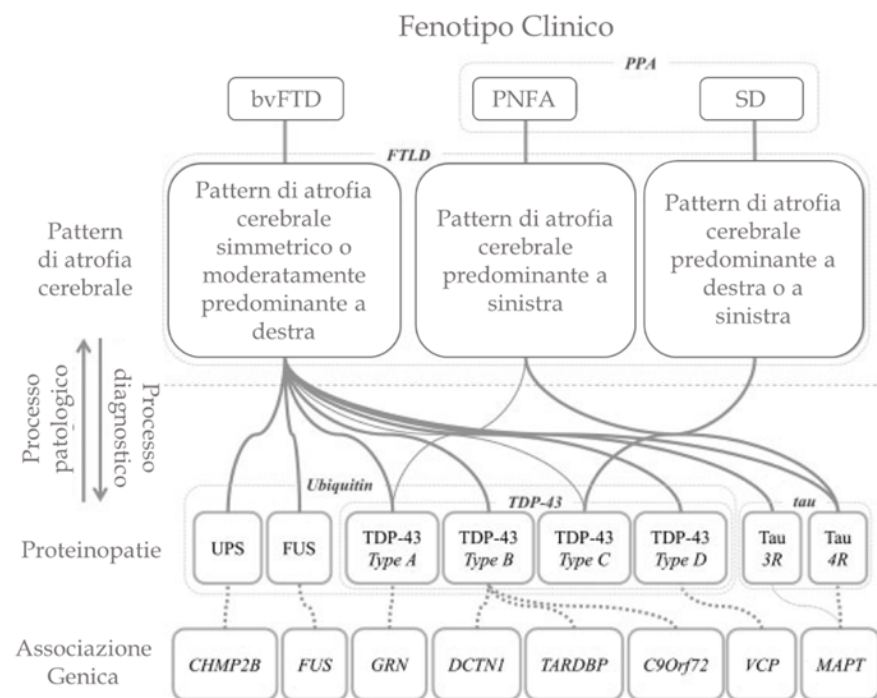


Figura 6. Diagramma riassuntivo dei pattern cerebrali, proteinopatie e geni coinvolti nelle tre principali sindromi FTD [modificata da Karageorgiou *et al.*, 2014].

2.1 MAPT

Il gene *MAPT* (microtubule associated protein tau gene) è stato il primo gene ad essere identificato come causa genetica per le forme di FTD familiari associate a parkinsonismo [Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998]. Il gene è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q21) ed è costituito da un esone 0 non codificante, seguito da 14 esoni codificanti o parzialmente codificanti [Andreadis *et al.*, 1992]. Questo gene codifica per la proteina Tau abbondantemente espressa nel sistema nervoso periferico (SNP) e centrale (SNC) a livello degli assoni, dei neuroni in crescita e maturi ed in quantità minore anche negli oligodendrociti e negli astrociti. La proteina è principalmente coinvolta nella stabilizzazione dei microtubuli e nel loro assemblaggio in quanto regola la trasduzione del segnale e il trasporto assonale [Goedert *et al.*, 1989].

Nel cervello umano, la proteina tau esiste in sei diverse isoforme ognuna con un ruolo diverso ed è espressa in specifiche fasi dello sviluppo. L'interazione tra tau e i microtubuli è mediata dalla presenza di domini ripetuti, localizzati all'estremità C-terminale della proteina e codificati dagli esoni 9-13. Lo splicing alternativo dell'esone 10 determina la produzione di tre (3R) o quattro (4R) domini leganti i microtubuli [Spillantini e Goedert, 2013], mentre lo splicing alternativo dell'esone 2, o del 2 e del 3 insieme, è responsabile di ulteriori tre isoforme con zero (0N), uno (1N) o due (2N) sequenze di 29 aminoacidi a livello N-terminale, responsabili dell'interazione con la membrana plasmatica [Rademakers *et al.*, 2004].

La principale modificazione post traduzionale a cui può andare incontro la proteina tau è la fosforilazione, che può coinvolgere almeno 25 siti differenti. La deposizione delle molecole iperfosforilate a livello cerebrale, sotto forma di filamenti insolubili, è comune a diverse patologie neurodegenerative, dette taupatie.

Ad oggi, sono state descritte 44 mutazioni in 134 differenti famiglie [Cruts *et al.*, 2012] classificate in base alla regione genica colpita, al loro effetto sulla trascrizione del gene e al tipo di taupatia che determinano. Le mutazioni possono essere differenziate in mutazioni missenso, delezioni o mutazioni introniche e la maggior parte sono concentrate negli esoni 9-13. Un numero considerevole di mutazioni promuove l'aggregazione, mentre altre

incrementano la fosforilazione, influenzando la normale funzione della proteina tau nella stabilizzazione dei microtubuli.

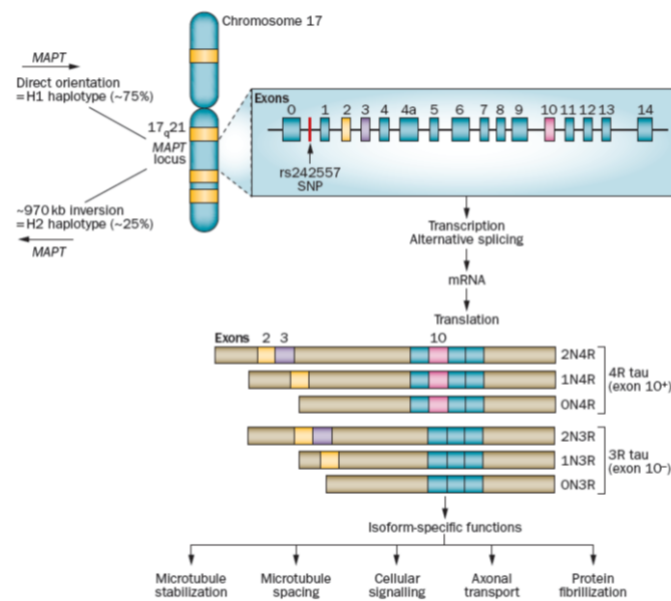


Figura 7. Il gene *MAPT* e le isoforme della proteina tau [Wade-Martins, 2012]

Molte altre invece modificano lo splicing dell'esone 10 a livello di mRNA, con una conseguente produzione di differenti isoforme, causando un rapporto sproporzionato delle isoforme tau 3R/4R [Goedert *et al.*, 1989]. Alcune mutazioni mostrano un aumento della tendenza della proteina tau a formare aggregati neurotossici.

La frequenza delle mutazioni sul gene *MAPT* è molto variabile, e va da 0-3% nei casi sporadici, fino a circa 5-50% circa nei casi familiari [Rademakers *et al.*, 2004; Pickering-Brown *et al.*, 2008] (Tabella 2). Diversi fenotipi clinici sono stati osservati nei pazienti portatori di mutazioni nel gene *MAPT* anche all'interno di una stessa famiglia [Janssen *et al.*, 2002; Boeve *et al.*, 2005]. L'esordio della malattia è compreso tra i 45 e i 65 anni, con un'età media di insorgenza di 55 anni, circa 10 anni prima rispetto ai pazienti portatori di mutazioni nel gene *GRN*. La malattia può comunque occasionalmente presentarsi anche tra i 20 e i 30 anni [Van Swieten e Spillantini, 2007; Momeni *et al.*, 2010] o dopo i 70 anni [Hayashi *et al.*, 2002]. La durata media della malattia è mediamente di 9 anni, ma con un range molto ampio (da 5 a 20 anni) [Seelaar *et al.*, 2011].

Il fenotipo clinico più comune nei pazienti portatori di mutazioni nel gene *MAPT* è la bvFTD che può essere suddiviso in demenza-dominante o

parkinsonismo-dominante [Van Swieten e Spillantini, 2007]. Raramente il parkinsonismo è la presentazione clinica esclusiva, tuttavia, alcuni pazienti hanno una sindrome parkinsoniana primaria come CBS o, più raramente, come in PSP [Dickson *et al.*, 2007; Van Swieten e Spillantini, 2007]. Le caratteristiche parkinsoniane consistono in bradicinesia simmetrica, instabilità posturale e rigidità che interessano la muscolatura assiale e appendicolare, assenza di tremore a riposo e scarsa o assente risposta alla levodopa [Ghetti *et al.*, 2015]. Anche se non esiste una chiara correlazione tra il tipo di mutazione e la presentazione clinica è stato osservato che le mutazioni che non influenzano lo splicing dell'esone 10 sono di solito associate ad un fenotipo demenza-dominante, mentre le mutazioni che interessano lo splicing dell'esone 10 tendono ad essere associate ad un fenotipo parkinsonismo-dominante [Ghetti *et al.*, 2015].

Studi di neuroimaging hanno osservato pattern eterogenei di atrofia corticale, ma con il coinvolgimento predominante dei lobi frontali e temporali [Whitwell *et al.*, 2009]. L'atrofia è particolarmente importante nei lobi temporali antero-mediale [Rohrer *et al.*, 2010]. Nella maggior parte degli individui, i modelli di atrofia corticale sono relativamente simmetrici [Van Swieten *et al.*, 1999; Ghetti *et al.*, 2008; Rohrer *et al.*, 2011]. Come l'imaging strutturale, anche l'imaging funzionale mediante tomografia ad emissione di positroni con F-18 fluorodeossiglucosio (FDG-PET) mostra un ipometabolismo frontale e/o temporale, che ricorda i pattern osservati in pazienti FTD sporadici [Frank *et al.*, 2007].

2.2 GRN

In seguito alla scoperta del gene *MAPT* come gene causale per la FTD, risultavano ancora molte famiglie caratterizzate da ereditarietà autosomica dominante geneticamente correlate alla stessa regione del cromosoma 17 (17q21), ma che non presentavano nessuna mutazione sul gene *MAPT*. Questi pazienti erano caratterizzati da inclusioni istopatologiche ubiquitinate e Tau-negative [Rosso *et al.*, 2001].

Grazie al sequenziamento di circa 80 geni presenti nella regione cromosomica adiacente a quella su cui è localizzato il gene *MAPT*, fu identificato il gene responsabile della patologia in queste famiglie: il gene

GRN (Granulin) [Baker *et al.*, 2006; Cruets *et al.*, 2006]. Dal 2006, quando fu identificata la prima mutazione ad oggi, sono state individuate 69 diverse mutazioni patogenetiche, responsabili del 20% circa delle forme di FTD familiari e del 5% circa dei casi sporadici [Cruets *et al.*, 2012] (Tabella 2). Il gene *GRN* è situato a livello del cromosoma 17q21.32 ed è costituito da 13 esoni codificanti una proteina detta Progranulina (PGRN). La PGRN è una proteina dal peso di 68.5 kDa composta da 593 aminoacidi, prevalentemente cisteine fondamentali per la formazione della struttura tipica della proteina (scala a pioli con 4 ripiegamenti a forcina) [He and Bateman 2003]. Al suo interno si riconoscono 7 domini altamente conservati (detti granuline), ognuno dei quali costituito da ripetizioni di 12 cisteine, separati da regioni su cui agiscono elastasi che generano frammenti da 6-25kDa (Figura 8) [Bateman e Bennett, 2009].

La PGRN è un fattore di crescita coinvolto in numerose funzioni biologiche come la riparazione tissutale, la progressione del ciclo cellulare e la motilità cellulare [Daniel *et al.*, 2003]. Tale proteina è espressa in molti tipi di cellule, in particolare nei neuroni e nella microglia attivata durante il corso di molte patologie neurodegenerative.

Le mutazioni in *GRN* sono distribuite uniformemente su tutta la regione codificante (Figura 8) e tutte determinano una marcata riduzione del trascritto proteico [Baker *et al.*, 2006; Cruets *et al.*, 2006].

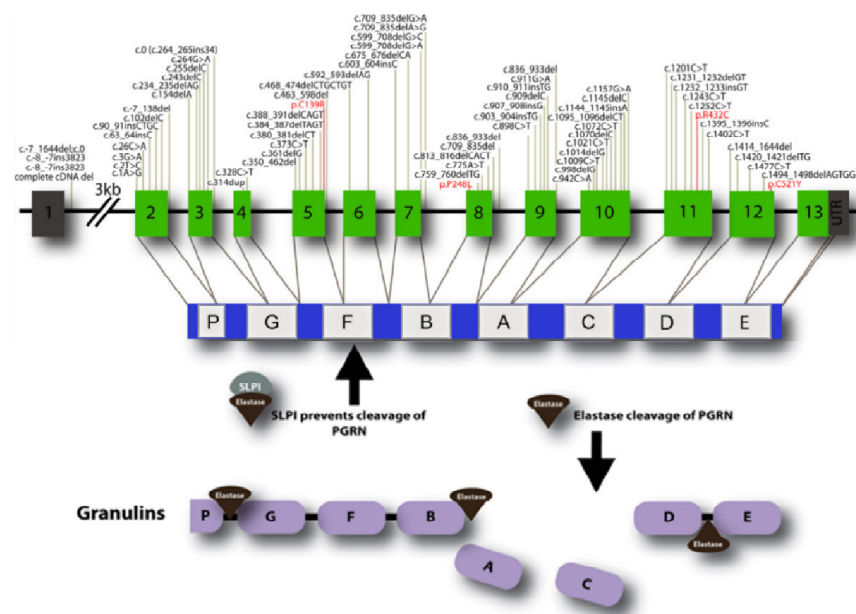


Figura 8. Il gene Progranulina: Mappa delle mutazioni identificate e trascritto proteico [modificata da originale [Nicholson *et al.*, 2012].

Questo ha portato ad ipotizzare che alla base della FTD associata a mutazioni in *GRN*, vi sia un meccanismo di aploinsufficienza proteica che determina una riduzione dei livelli di progranulina nel liquido cerebrospinale plasma e siero, sia nei pazienti che nei soggetti a rischio, portatori di mutazioni nel gene [Ghidoni *et al.*, 2008; Finch *et al.*, 2009; Sleegers *et al.*, 2009]. Una possibile spiegazione prevede la degradazione dell'mRNA mutato, che coinvolge parzialmente anche l'mRNA wild type, amplificando così l'effetto dell'allele nullo. Ad oggi, la determinazione dei livelli plasmatici di progranulina è utilizzata per lo screening dei pazienti (Figura 9) [Schofield *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2013].

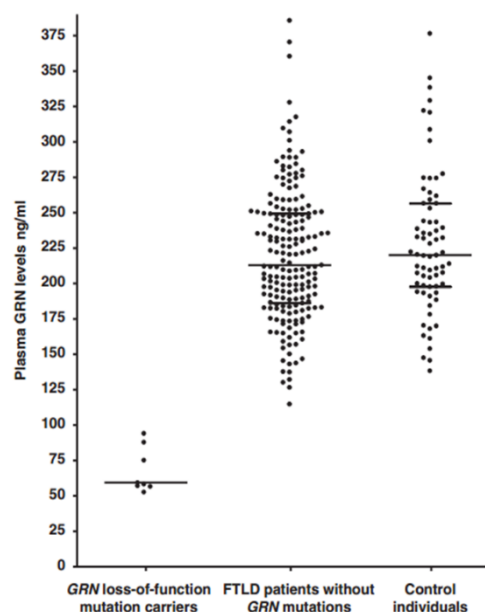


Figura 9. Livelli plasmatici di Progranulina nei pazienti portatori di mutazioni in *GRN*, nei pazienti non portatori di mutazioni in *GRN* e nei soggetti di controllo [Finch *et al.*, 2008].

Oltre alle mutazioni loss-of-function, sono state descritte 52 mutazioni missenso, 26 delle quali sono state osservate esclusivamente in soggetti affetti, indicando così il loro potenziale effetto patogenetico; queste sono disseminate nell'intero gene ed è possibile riscontrarle sia nella progranulina che nelle granuline.

La presentazione clinica nei pazienti con mutazioni *GRN* è molto variabile, ed una eterogeneità fenotipica è osservata anche all'interno di una stessa famiglia [Beck *et al.*, 2008; Chen-Plotkin *et al.*, 2011], con una penetranza incompleta ed età-dipendente [Cruts e Van Broeckhoven, 2008]. L'età di esordio dei sintomi è molto variabile con un range molto ampio (da 35 a 89

anni). L'età media di insorgenza dei sintomi è 65, anni con una penetranza del 50% prima dei 60 e del 90% entro i 70 anni [Van Swieten e Heutink, 2008; Le Ber, 2013]. La variabilità nell'età di esordio è visibile anche all'interno delle famiglie con una differenza di oltre 20 anni tra generazioni consecutive [Van Swieten e Heutink, 2008]. Non è stata ancora verificata una correlazione tra l'età di insorgenza e la durata della malattia con il tipo e la posizione della mutazione *GRN*.

L'assenza di una specifica correlazione tra genotipo e fenotipo clinico dipende dal meccanismo di aploinsufficienza con il quale le mutazioni in *GRN* determinano la FTD [Baker 2006] risentendo dell'associazione anche con altri fattori di natura sia genetica che ambientale. Allo stesso tempo possiamo affermare che la sola osservazione clinica dei pazienti non permette di formulare un'ipotesi di coinvolgimento di *GRN*. La diagnosi clinica indicata inizialmente come la più comune nei pazienti portatori di mutazioni in *GRN* è stata la bvFTD [Baker *et al.*, 2006; Cruts *et al.*, 2006]. Tuttavia, studi successivi hanno evidenziato all'esordio anche presentazioni cliniche caratterizzate da disturbi afasici coerenti con PNFA [Mesulam *et al.*, 2007; Le Ber *et al.*, 2008]. Il disturbo afasico associato a queste mutazioni però sembra essere discorde da quello con aprassia del discorso osservato occasionalmente nei pazienti con FTD-tau [Rohrer *et al.*, 2010].

In circa il 40% dei pazienti portatori di mutazioni sul gene *GRN* sono state riportate caratteristiche extrapiramidali, CBS con aprassia degli arti, parkinsonismo asimmetrico e distonia, anche se di solito emergono dopo l'insorgenza dei sintomi comportamentali o di linguaggio [Yu *et al.*, 2010], e rispondono solo occasionalmente al trattamento con levodopa [Di Fabio *et al.*, 2010].

2.3 VCP

Nel 2004, attraverso indagini di linkage in famiglie affette da una rara sindrome familiare di miopatia da corpi inclusi (IBM), da malattia di Paget oltre che da FTD [Watt s *et al.*, 2004], sono state identificate mutazioni autosomiche dominanti nel gene Valosing containing protein (*VCP*). *VCP* è localizzato sul cromosoma 9p13.3 e codifica per una proteina, conosciuta anche come p97, di 806 aminoacidi che formano 4 diversi domini funzionali

denominati N-terminale, D1, D2 e C-terminale (Figura 10). VCP è un membro della famiglia delle AAA-ATPasi (ATPasi Associate a diverse attività cellulari) [Wang *et al.*, 2004] ed è una delle più abbondanti proteine citosoliche. La proteina è espressa ubiquitariamente ed associata a numerose funzioni cellulari, tra cui la degradazione delle proteine sia attraverso proteasoma che meccanismi autofagici [Nalbandian *et al.*, 2011; Yamanaka *et al.*, 2012]. Mutazioni in questo gene portano all'accumulo di proteine poli-ubiquitinate e non degradate suggerendo che la proteina mutata potrebbe avere un ruolo nella patogenesi della FTD alterando la normale degradazione proteica.

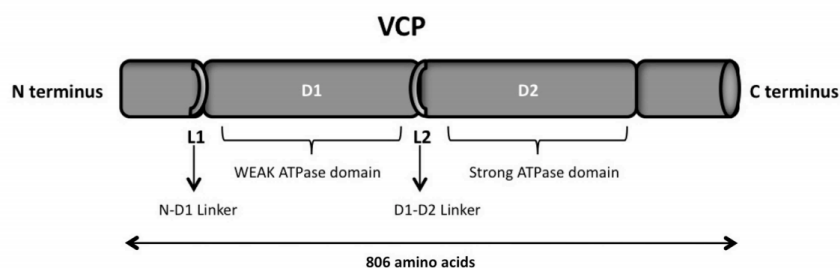


Figura 10. Rappresentazione schematica dei 4 domini funzionali della proteina VCP: il dominio N-terminale, il dominio D1 e D2 e il dominio C-terminale [Fontana *et al.*, 2015].

Ad oggi, sono state identificate 19 diverse mutazioni patogenetiche in 49 famiglie indipendenti [Cruts *et al.*, 2012]. Quasi l'80% dei portatori di mutazioni in VCP presenta una storia familiare positiva con grande variabilità nella presentazione fenotipica, anche all'interno della stessa famiglia. Tuttavia, è importante precisare che tali varianti sono molto rare essendo responsabili solo del 1% dei casi familiari di FTD (Tabella 2) [van der Zee *et al.*, 2009] e sono associate prevalentemente ai sottotipi bvFTD e SD [Weihi 2011].

La malattia di solito inizia all'età di 40 anni con sintomi muscolo-scheletrici non dissimili da quelli della distrofia muscolare dei cingoli, che colpisce più del 80% dei pazienti. Inoltre, quasi il 60% dei pazienti sviluppa in età adulta la malattia di Paget [Watts *et al.*, 2004]. FTD, solitamente, si sviluppa più tardi nel corso della malattia (55-60 anni), e colpisce circa il 30% dei pazienti, con un classico fenotipo bvFTD [Weihi, 2011]. Tuttavia, mutazioni a carico del gene VCP sono state identificate anche in pazienti con fenotipo MND-SLA, occasionalmente associato a FTD [Johnson *et al.*, 2010; Hirano *et al.*, 2015].

2.4 TARDBP e FUS

Mutazioni a carico dei geni *TARDBP* (TAR DNA binding protein) e *FUS* (fused in sarcoma) sono prevalentemente associate alla Sclerosi laterale Amiotrofica (SLA).

Il gene *TARDBP*, localizzato sul cromosoma 1p36.22, codifica per la proteina TDP-43 (Transactive risposta DNA-binding protein 4), una ribonucleoproteina ubiquitariamente espressa e altamente conservata. TDP-43 è una proteina che lega l'RNA formando complessi nucleari eterogenei di ribonucleoproteine (hnRNP) che intervengono nella regolazione dell'attività trascrizionale della cellula [Buratti *et al.*, 2008].

Le mutazioni riportate in letteratura sono tutte localizzate all'interno del dominio C-terminale (Figura 11), ricco in glicina, responsabile dell'interazione della proteina TDP-43 con altre proteine [Fontana *et al.*, 2015]. Inizialmente furono descritte nei pazienti affetti da SLA, sia nei casi familiari che sporadici con un coinvolgimento di questo gene del 5% per le forme familiari [Kabashi *et al.*, 2008]. Sebbene molti studi non abbiano identificato un ruolo significativo per questo gene per la FTD [Rollinson *et al.*, 2007; Gijssels *et al.*, 2009], nel 2009 è stato riportato che raramente potrebbe essere causa della FTD/MDN [Borrioni *et al.*, 2009]. Pazienti con FTD senza coinvolgimento del motoneurone e portatori di mutazione sul gene *TARDBP* sono ancora più eccezionali. Infatti, sono stati segnalati meno di 16 casi [Borrioni *et al.*, 2009; Borrioni *et al.*, 2010; Gitcho *et al.*, 2009; Gelpi *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2015], con solo quattro casi aventi una conferma neuropatologica [Gitcho *et al.*, 2009; Kovacs *et al.*, 2009; Gelpi *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2015]. Il fenotipo più comunemente descritto è bvFTD seguito da PPA, in particolare con svPPA, con una età di insorgenza molto eterogenea (da 29 a 77 anni).

I pazienti portatori di mutazioni sul gene *TARDBP* presentano a livello cerebrale inclusioni TDP-43 positive. Tuttavia queste inclusioni sono state osservate anche nelle forme di FTD causate da mutazioni sui geni *GRN*, *VCP* e *C9orf72*, suggerendo che la disregolazione di TDP-43 potrebbe essere un meccanismo patogenetico molto importante [Rademakers *et al.*, 2012].

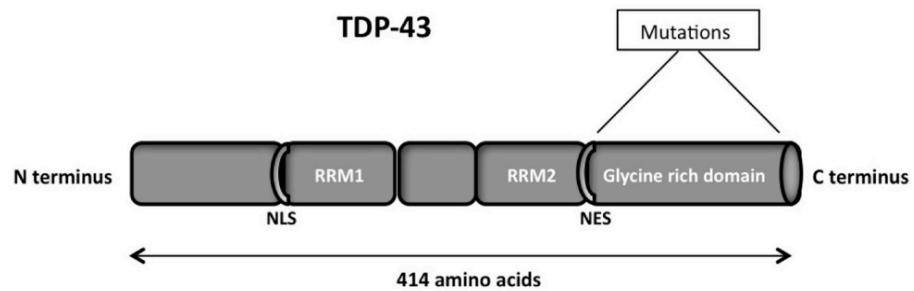


Figura 11. Rappresentazione schematica dei domini funzionali della proteina TDP-43. Le mutazioni identificate fino ad ora sono concentrate all'interno del dominio ricco in glicine [Fontana *et al.*, 2015].

Come *TARDBP* anche il gene *FUS*, localizzato sul cromosoma 16p11.2, codifica per una proteina appartenente alle hnRNP espressa ubiquitariamente e coinvolta in diversi processi, tra cui la regolazione della trascrizione ed il trasporto dell'RNA fra i vari compartimenti intracellulari.

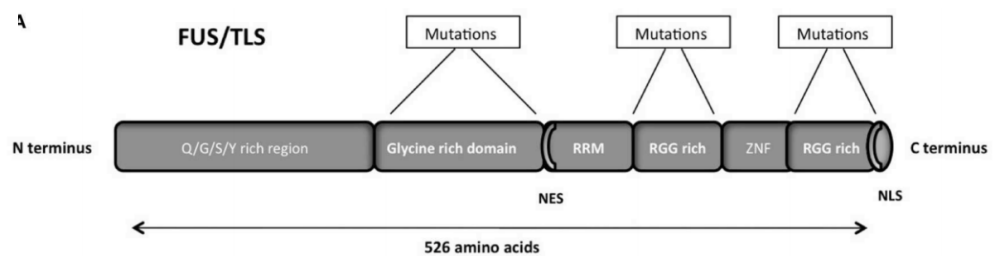


Figura 12. Rappresentazione schematica dei 6 domini funzionali della proteina FUS/TLS [Fontana *et al.*, 2015].

Il gene è responsabile del 5% delle forme di SLA familiare [Vance *et al.*, 2009; Doi *et al.*, 2010, Belzil *et al.*, 2009] ed, al momento, mutazioni sul gene *FUS* sono state identificate solo in quattro pazienti con FTD-MND/SLA e nelle loro famiglie [Ticozzi *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2010; Broustal *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010]. Queste mutazioni sono caratterizzate dalla presenza di inclusioni FUS-positive e TDP-43 negative [Kwiatkowski *et al.*, 2009; Vance *et al.*, 2009] che non sono state però confermate nei due casi segnalati con fenotipo FTD senza coinvolgimento del motoneurone data l'assenza di dati autoptici.

2.5 CHMP2B

Nel 2005, un'analisi di linkage su una famiglia danese molto ampia ha identificato una mutazione sul gene *CHMP2B* [Skibinski *et al.*, 2005]. *CHMP2B* (charged multivescicular body protein). *CHMP2B* è localizzato sul cromosoma 3p11.2 e codifica per una proteina di 213 aminoacidi (Figura 13) componente del complesso ESCRT-III (endosomal sorting complex required for transport-III). Questo complesso è coinvolto nella formazione dell'endosoma tardivo, il quale si deve fondere con il lisosoma al fine di degradare e riciclare le proteine [Fontana *et al.*, 2015]. Dal 2005, solo 4 mutazioni sono state riportate in letteratura, rappresentando meno del 1 % delle forme familiari di FTD (Tabella 2). Tutte le mutazioni, localizzate all'interno degli esoni 5 e 6, causano un processo di splicing aberrante e colpiscono la zona C-terminale della proteina [Crutz *et al.*, 2012]. Mutazioni del gene sono causa della presenza nei neuroni di vacuoli enormi che impediscono la fusione dell'endosoma con il lisosoma.

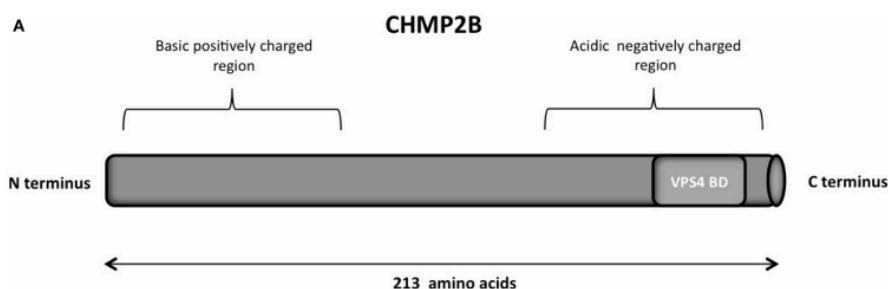


Figura 13. Rappresentazione schematica della proteina CHMP2B [Fontana *et al.*, 2015].

Dal punto di vista neuropatologico, i pazienti portatori di mutazioni sul gene *CHMP2B* presentano inclusioni neuronali ubiquitina/p62 positive e TDP-43/FUS negative, definite FTD-U [Holm *et al.*, 2009].

Clinicamente, i pazienti presentano una diagnosi di bvFTD caratterizzata da cambiamenti della personalità molto precoci. Inoltre, nella famiglia in cui è stata descritta per la prima volta una mutazione sul gene *CHMP2B*, la bvFTD era associata a sintomi piramidali e distonia [Skibinski *et al.*, 2005]. L'età media di insorgenza è di circa 58 anni con un range di età tra i 45 e i 65 anni.

Tabella 2. Frequenza delle mutazioni all'interno dei geni coinvolti nella demenza Frontotemporale.

Gene	Locus Genomico	Proteina	Frequenza stimata di mutazioni
<i>MAPT</i>	17q21.32	Tau	0-50%
<i>PGRN</i>	17q21.31	Progranulina	3-26%
<i>VCP</i>	9p13.3	VCP	<1%
<i>CHMP2B</i>	3p11.2	CHMP2B	<1%
<i>TARDBP</i>	1p36.22	TDP-43	<1%
<i>FUS/TLS</i>	16p11.2	FUS	<1%
<i>C9orf72</i>	9p21.2	C9ORF72	6-48%

3. C9orf72: Chromosome 9 open reading frame 72

Le mutazioni all'interno dei geni *MAPT* e *GRN* spiegano solo il 25% dei casi familiari di FTD e vari studi hanno cercato di spiegare quei casi familiari rimasti irrisolti identificando fattori di rischio aggiuntivi.

Nel 2006, un'analisi di linkage rivelò una regione di 3,7 Mb sul cromosoma 9p21 associata con famiglie FTD/MND [Momeni *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2006]. Da allora una serie di studi ha confermato l'importanza di questo locus [Luty *et al.*, 2008; Pearson *et al.*, 2011]. Nel 2011, due studi indipendenti, utilizzando tre approcci differenti, identificarono nell'espansione di una ripetizione esanucleotidica (GGGGCC, G_4C_2) di una regione non codificante la spiegazione del segnale di associazione delle famiglie FTD/MND con la regione cromosomica 9p21 [Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011]. Questi lavori furono velocemente seguiti da un grande numero di altri studi che identificarono la stessa espansione esanucleotidica in una vasta serie di popolazioni [Cruts *et al.*, 2013].

All'interno di questa regione è presente il gene *C9orf72* (chromosome 9 open reading frame 72) composto da 12 esoni, con due esone 1 non codificanti (esone 1a e esone 1b; Figura 14). Il gene è trascritto in tre diversi RNA messaggeri (trascritto 1, 2 e 3) che codificano per due proteine di 222 (C9orf72b; risultante dagli esoni 2-5) e 481 aminoacidi (C9orf72a, risultante dagli esoni 2-11) [Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011].

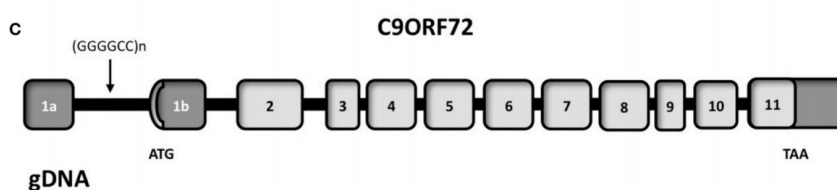


Figura 14. Rappresentazione schematica della gene *C9orf72*. La ripetizione G_4C_2 è localizzata tra l'esone 1a e l'esone 1b [Fontana *et al.*, 2015].

Le due isoforme condividono la parte N-terminale ma differiscono nella regione C-terminale. In base alla trascrizione alternativa dell'esone 1, la ripetizione G_4C_2 è localizzata all'interno o del promotore del trascritto (trascritto 1) o all'interno dell'introne 1 (trascritto 2 e 3) (Figura 15) [Renton *et al.*, 2011; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011]. Analisi condotte per la valutazione quantitativa dell'mRNA hanno dimostrato che, in presenza della ripetizione

G_4C_2 , si ha una perdita del trascritto 1 con conseguente riduzione dell'isoforma C9orf72a [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011].

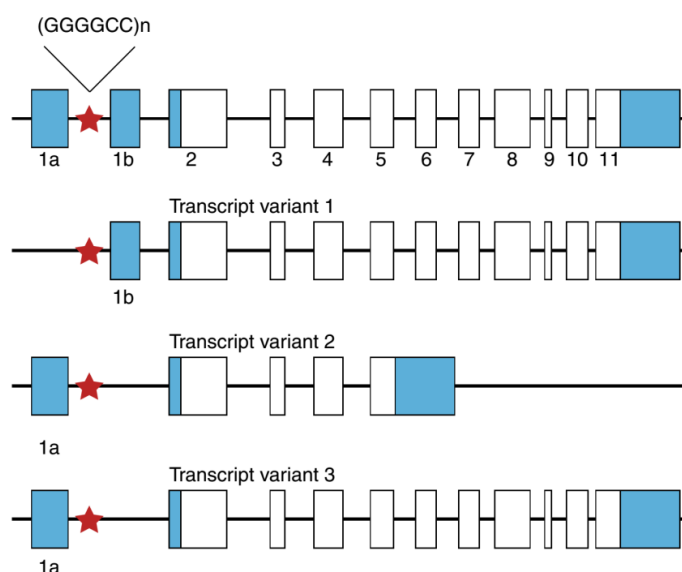


Figura 15. Struttura del gene *C9orf72* e dei principali trascritti, varianti 1, 2 e 3 prodotti dallo splicing alternativo. In blu sono rappresentati gli esoni non tradotti, in bianco quelli tradotti. La posizione dell'esanucleotide G_4C_2 è indicata dalla stella rossa [Ione *et al.*, 2014].

Diversi studi hanno esaminato l'effetto dell'espansione sulla produzione delle isoforme C9orf72a e C9orf72b; la maggioranza di questi studi ha mostrato una riduzione di entrambe le isoforme a livello del tessuto cerebrale o delle linee cellulari linfoblastoidi [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Gijssels *et al.*, 2012]. Tuttavia, l'effetto della mutazione non è stato ancora fermamente stabilito e tre ipotesi principali sono attualmente all'esame [Gendron *et al.*, 2014] (Figura 16):

- l'espansione della ripetizione G_4C_2 provoca una ridotta espressione dell'allele contenente l'espansione (aploinsufficienza);
- l'espansione ripetuta può essere trascritta e inclusa nel pre-mRNA dei trascritti 1 e 3 impedendo il normale splicing. Si vengono così a formare focolai di RNA trascritti contenenti le ripetizioni G_4C_2 che potrebbero avere un effetto tossico;
- produzione di poli-dipeptidi tossici.

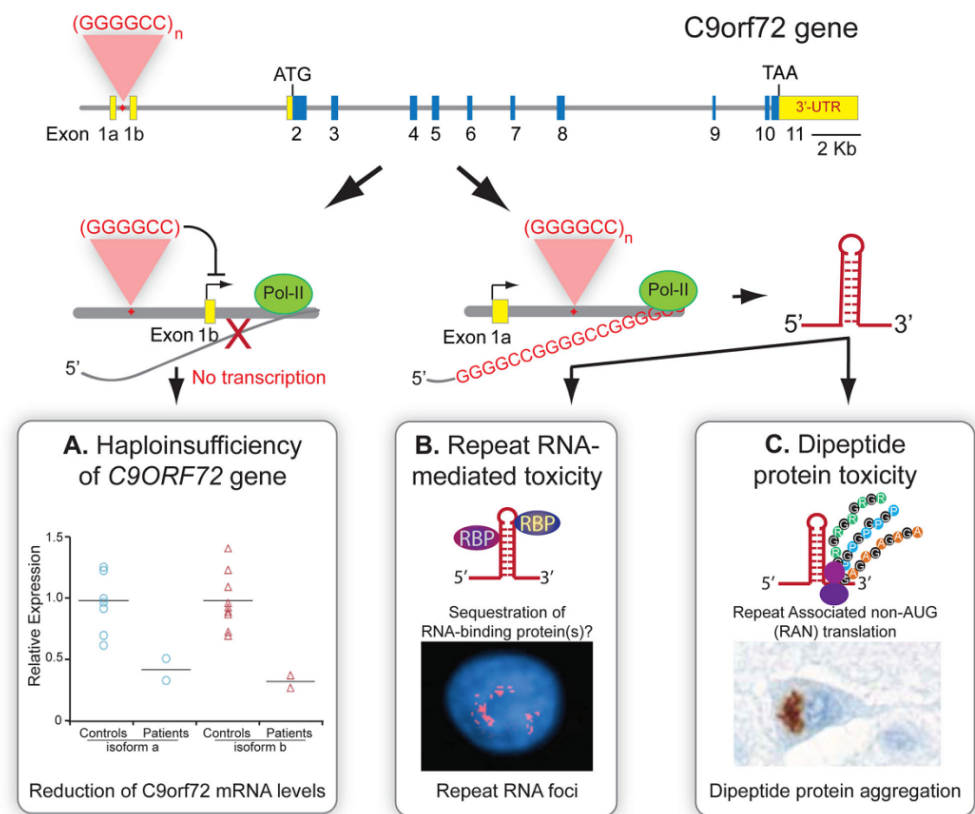


Figura 16. Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi patogenetici causati dalla presenza dell'espansione esanucleotidica nel gene C9orf72 [Ling *et al.*, 2013].

Le tre ipotesi risultano essere molto interessanti, ma ancora non è stato stabilito se solo uno dei tre meccanismi o una loro combinazione sia la vera causa della malattia.

Le caratteristiche neuropatologiche associate alla mutazione in *C9orf72* sono le inclusioni TDP-43 positive (tipo A e tipo B) [Mahoney *et al.*, 2012; Lashley *et al.*, 2014], osservate in molte aree cerebrali, tra cui la corteccia extramotoria cerebrale, l'ippocampo, i gangli della base, i neuroni motori inferiori del tronco encefalico e a livello del midollo spinale [Rademakers *et al.*, 2012]. Tuttavia un altro elemento distintivo e peculiare è rappresentato dalla presenza di inclusioni TDP-43 negative e p62-positive, con morfologia a stella, a livello del cervelletto, dell'ippocampo e della corteccia frontale [Al-Sarraj *et al.*, 2011; Troakes *et al.*, 2012]. Mori e colleghi hanno cercato di caratterizzare tali inclusioni dimostrando che sono principalmente composte da aggregati di 5 diversi poli-dipeptidi (DPR). L'identificazione di questi aggregati proteici nel cervello dei pazienti con espansione *C9orf72* ha aggiunto un altro strato di complessità alla neuropatologia della FTD e della SLA. Questo ha suggerito che pazienti portatori di mutazione in *C9orf72* dovessero essere riclassificati neuropatologicamente in base alla presenza degli aggregati poli-dipeptidici

(FTD-DPR), dal momento che le inclusioni TDP-43 positive non erano sempre presenti [Mackenzie *et al.*, 2014]. Un recente studio ha però dimostrato che non vi è alcuna correlazione diretta tra la quantità di aggregati dei poli-dipeptidi e la neurodegenerazione [Mackenzie *et al.*, 2013], mentre è forte quella con le inclusioni TDP-43.

Nella popolazione generale, il gene contiene il tratto della sequenza esanucleotidica con una lunghezza media di due ripetizioni, ma si ritiene che il range di normalità sia al di sotto di 24 ripetizioni [Gijssels *et al.*, 2012], mentre per i soggetti affetti l'allele espanso può variare da diverse centinaia a migliaia di ripetizioni [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; van Blitterswijk *et al.*, 2013]. Ad oggi, è ormai piuttosto chiaro che le espansioni di diverse centinaia di copie sono decisamente patogenetiche, tuttavia non è stato ancora definito un cut-off preciso per determinare con certezza la patogenicità dell'espansione esanucleotidica, dato che non è stato ancora compreso se anche una espansione più piccola può conferire un rischio per lo sviluppo della malattia. Studi *in vitro*, infatti, hanno dimostrato una correlazione inversa tra il numero di ripetizioni e l'espressione genica a partire da 9 ripetizioni G₄C₂, con una riduzione di espressione del 50% già in presenza di 24 ripetizioni [van der Zee *et al.*, 2013].

Dalla scoperta della mutazione in *C9orf72*, sono stati condotti vari studi epidemiologici su coorti di pazienti in tutto il mondo, che hanno individuato la mutazione nel 37% dei casi con SLA familiare, nel 6% con SLA sporadica, nel 21% con FTD familiare e nel 6% con FTD sporadico. Questi studi hanno dimostrato che l'espansione in *C9orf72* risulta essere la principale causa genetica di SLA familiare ed è comparabile in frequenza alle mutazioni sul gene *GRN* per i casi di FTD familiare [DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011; Chiò *et al.*, 2012; Cruys *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2013].

È stato dimostrato che l'età d'esordio della malattia è variabile (tra i 27 e 83 anni) e significativamente più bassa rispetto ai portatori di mutazioni sul gene *GRN* (età media 55.3 vs. 59.6 anni) e i pazienti con FTD sporadica (età media di 63.1 anni). La sopravvivenza media è invece risultata sovrapponibile a quella degli altri gruppi (valori compresi tra 1.5 e 22 anni), tuttavia la copresenza della SLA è un forte fattore prognostico negativo [Boeve *et al.*, 2012; Chiò *et al.*, 2012; Gijssels *et al.*, 2012].

Il fenotipo clinico è altamente eterogeneo e variabile anche all'interno delle famiglie colpite. La sindrome clinica più frequente è la bvFTD con caratteristiche classiche come apatia, comportamento disinibito e socialmente inappropriato [Rascovsky *et al.*, 2011]. Inoltre, sono frequentemente osservati anche cambiamenti comportamentali con caratteristiche di psicosi, tra cui allucinazioni e deliri [Boeve *et al.*, 2012; Galimberti *et al.*, 2013; Devenney *et al.*, 2014]. I disturbi della memoria sono riportati solo nel 42% dei casi. Raramente l'espansione in *C9orf72* è stata ritrovata in pazienti con disturbi del linguaggio [Saint-Aubert *et al.*, 2014].

Gli studi di neuroimaging strutturale sui pazienti con espansione in *C9orf72* non hanno rivelato un modello caratteristico di atrofia. È stata osservata una atrofia simmetrica bilaterale corticale e sottocorticale che interessa prevalentemente la regione frontotemporale [Boeve *et al.*, 2012; Devenney *et al.*, 2014]. Come nel neuroimaging strutturale, anche quello funzionale con FDG-PET e SPECT ha dimostrato delle alterazioni corticali e sottocorticali che interessano le regioni frontali, temporali e parietali [Boeve *et al.*, 2012; Adeli *et al.*, 2014]. Nei presintomatici, portatori di espansione in *C9orf72*, è possibile individuare alterazioni nelle aree sottocorticali, tra cui talamo, insula e nelle aree corticali posteriori circa 25 anni prima dell'esordio dei sintomi, alterazioni a livello dei lobi frontali e temporali almeno 20 anni prima del previsto inizio dei sintomi e nel cervelletto 10 anni prima dell'inizio previsto [Rohrer *et al.*, 2015].

4. Epigenetica

Conrad Hal Waddington (1905-1975) ha coniato il termine "epigenetica" nel 1942 fondendo i termini "genetica" ed "epigenesi" [Choudhuri 2011] sebbene le origini concettuali risalgano ad Aristotele (384-322 a.C.). Con il termine epigenetica si intende quella branca della biologia molecolare che studia tutte le attività di regolazione dei geni senza, tuttavia, modificarne l'informazione contenuta, ossia senza modificare la sequenza di DNA [Choudhuri 2011]. Negli ultimi anni è stato dimostrato che le modificazioni epigenetiche, quali la metilazione del DNA e le modificazioni delle code istoniche, possono agire a livello della cromatina per alterare e regolare l'espressione genica. Tali cambiamenti possono essere programmati, ad esempio durante la differenziazione cellulare, oppure indotti da fattori ambientali. Inoltre, possono risultare altamente stabili, come quelli derivanti da imprinting genetico, o dinamici come i cambiamenti epigenetici associati alla memoria. Molte di queste modifiche epigenetiche durano per tutta la vita della cellula e possono trasmettersi a generazioni successive attraverso le divisioni cellulari [Handel *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2012]. Pertanto, mentre le alterazioni genetiche riflettono le modifiche permanenti della sequenza di DNA, i cambiamenti epigenetici sono mediati attraverso processi che sono reversibili [Henikoff e Matzke, 1997].

Negli ultimi dieci anni, vari studi hanno valutato il contributo delle modificazioni epigenetiche sull'invecchiamento e sulle malattie neurodegenerative legate all'età, tra cui la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson, generando l'introduzione del termine "neuroepigenetica" [Sweatt 2013]. L'invecchiamento è caratterizzato da cambiamenti mirati dell'espressione genica e le modificazioni epigenetiche rappresentano, quindi, uno dei principali fattori di rischio per molte malattie dell'invecchiamento [Harries *et al.*, 2011; Sikora *et al.*, 2011]. Infatti, se il pattern epigenetico viene modificato, questo può provocare diversi tipi di patologie.

I principali meccanismi epigenetici sono [Adwan e Zawia, 2013]:

- Modificazioni della struttura della cromatina mediante acetilazione e metilazione degli istoni;
- Regolazione espressione genica mediante RNA non codificanti (ncRNA);

- Metilazione e idrossimetilazione del DNA.

I primi studi della metilazione del DNA hanno dimostrato la sua importanza nella proliferazione e differenziazione delle cellule staminali neuronali [Mattson *et al.*, 2003]. Inoltre, è stato anche documentato che la metilazione del DNA ha un ruolo importante per la plasticità sinaptica, la riparazione e la sopravvivenza neuronale oltre che per l'apprendimento e la memoria [Feng *et al.*, 2010; Iskandar *et al.*, 2010]. Tali processi sono dinamici e poiché sono coinvolti nello sviluppo neuronale, i meccanismi epigenetici, ed in particolare la metilazione del DNA, sono un ottimo bersaglio nelle indagini delle malattie neurodegenerative. Negli ultimi dieci anni, ci sono stati molteplici studi riguardanti i meccanismi epigenetici nel sistema nervoso che sono risultati particolarmente rilevanti sia per le malattie multifattoriali con bassa penetranza genetica, come la schizofrenia e la depressione [Petronis, 2010] sia per quelle patologie per cui la genetica non è in grado di spiegare tutte le possibili cause.

4.1 Rimodellamento della cromatina

La cromatina è la forma in cui gli acidi nucleici si trovano all'interno del nucleo cellulare ed è costituita da DNA, RNA e proteine acide e basiche. Gli istoni sono le proteine più abbondanti associate ai cromosomi e il loro ruolo fondamentale è quello di organizzare il DNA, compattandolo in maniera ordinata [Wang *et al.*, 2013]. La conformazione degli istoni determina l'accessibilità al DNA ed eventuali cambiamenti conformazionali possono alterare in modo differenziato l'accesso ad alcuni geni, lasciandolo invece intatto per altri.

I meccanismi con cui gli istoni vengono modificati sono molteplici (metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, citrullinazione, adenosina difosfato (ADP)-ribosilazione, e altre modifiche post-traduzionali degli aminoacidi che compongono le proteine istoniche), tuttavia l'acetilazione degli istoni è uno dei più diffusi e meglio studiati [Jenuwein *et al.*, 2001]. Essa è promossa da una classe di enzimi chiamata HATs (istone acetiltransferasi) e prevede il trasferimento di un gruppo acetile (il donatore è l'acetil-coenzima A) su un residuo amminoacidico di lisina presente all'estremità N-terminale di tutti gli istoni che formano il nucleosoma [Marmorstein *et al.*, 2001]. Mediante l'aggiunta del gruppo acetile, la lisina perde la sua carica positiva e di

conseguenza non è più in grado di legare con alta affinità i gruppi fosfato del DNA. Le istone acetilasi non sono enzimi altamente specifici e sono quindi in grado di modificare più di un residuo amminoacidico. Le principali HATs sono rappresentate in modo ubiquitario e acetilano gli istoni dopo vari stimoli cellulari. La loro attività è particolarmente alta nelle cellule nervose, in quelle del midollo osseo ed in alcune strutture endocrine, cioè in quelle linee cellulari in attiva replicazione o elevato metabolismo.

Al contrario, l'istone deacetilasi (HDAC) trasferisce gruppi acetile dagli istoni acetilati al coenzima A, producendo una cromatina più condensata e quindi diminuendo la trascrizione del gene. Attualmente, sono state individuate 18 diverse HDACs suddivise in quattro diverse classi [Dokmanovic *et al.*, 2007]. Anche se il nome suggerisce che gli istoni sono gli obiettivi primari di questi enzimi, l'analisi filogenetica sulle HDACs indica che il loro sviluppo evolutivo ha preceduto quello degli istoni [Gregoretto *et al.*, 2004]. Ad oggi, sono stati identificati più di 50 obiettivi diversi dagli istoni delle HDACs, tra cui proteine importanti per la proliferazione, la migrazione e la morte cellulare [Marks *et al.*, 2007]. E' stato suggerito quindi che sia per le HATs che per le HDACs sarebbe meglio parlare di lisina acetilasi/deacetilasi e non di istone acetilasi/deacetilasi [Xu *et al.*, 2007].

4.2 RNA non codificanti

Fino a poco tempo fa era opinione diffusa che la maggior parte del genoma umano era composto dal cosiddetto DNA "spazzatura" o DNA non funzionale. È stato poi rivelato che quasi l'intero genoma è trascritto, ma che solo il 2% è in realtà tradotto in proteine [Amaral *et al.*, 2008]. La maggior parte della "spazzatura" è in realtà funzionale ed è principalmente coinvolta nella regolazione dell'espressione genica di solito sotto forma di RNA non codificante (ncRNAs), tra cui i microRNA (miRNA) e i piccoli RNA interferenti (siRNA) [Schouten *et al.*, 2012].

In termini di epigenetica, gli ncRNAs sono attivamente coinvolti nel controllo dell'espressione genica, nell'inattivazione del cromosoma X e nello splicing alternativo [Lisch, 2012].

I microRNA e siRNA sono due classi di molecole ben studiate per la loro associazione con la soppressione genica post-trascrizionale. Infatti, queste molecole di RNA a doppio filamento guidano il riconoscimento e il taglio o la

repressione traduzionale del mRNA bersaglio, a seconda della complementarità del piccolo filamento di RNA con l'mRNA bersaglio. In particolare, queste molecole si legano con mRNA, di solito nella regione 3' non tradotta (UTR), ostacolando l'inizio della traduzione ed influenzando la stabilità dell'mRNA. Quest'ultimo, infine, porta alla down-regolazione del gene che lo ha codificato. I miRNA sono potenzialmente in grado di regolare la traduzione di molteplici geni, e ciascun gene può essere regolato da diverse miRNA, di conseguenza miRNA e sequenza bersaglio non devono essere perfettamente complementari affinché la regolazione abbia effetto. I siRNA vengono elaborati e funzionano allo stesso modo dei miRNA, ma hanno bisogno di una perfetta complementarità con la sequenza bersaglio rispetto a miRNA [Zeng *et al.*, 2003].

Attualmente, sono conosciuti 1881 precursori e 2588 miRNA maturi espressi in tutto l'organismo e particolarmente a livello del cervello, suggerendo un loro ruolo importante nello sviluppo, nel funzionamento e nell'invecchiamento neuronale [Gokey *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2011]. Inoltre, ci sono prove che queste piccole molecole possono avere anche un ruolo nel controllo trascrizionale e nell'organizzazione della cromatina.

4.3 Metilazione del DNA

La metilazione del DNA è la modificazione epigenetica più studiata e caratterizzata ed è una delle più importanti modificazioni post-replicative. Risulta essere essenziale per il normale sviluppo cellulare ed è associata ad alcuni processi chiave, tra cui l'imprinting genomico e l'inattivazione del cromosoma X. Generalmente, è collegata alla repressione trascrizionale e si trova principalmente nella eterocromatina, mentre basse quantità di DNA metilato si ritrovano nella eucromatina. I diversi pattern di metilazione sono in grado, quindi, di regolare l'accensione e lo spegnimento genico, ma con una forte dipendenza dalla posizione della zona metilata rispetto al gene [Ziller *et al.*, 2013]. La metilazione è la modificazione epigenetica più stabile, tuttavia risulta comunque essere molto dinamica [Weaver *et al.*, 2004].

Tale metilazione avviene mediante l'aggiunta di un gruppo metile nella posizione 5 dell'anello pirimidinico delle Citosine creando la 5-metilcitosina (5-mC) che rappresenta il 3-4% di tutte le citosine presenti nel genoma dei mammiferi. Le citosine, che subiscono questa modificazione, sono

localizzate in posizione 5' rispetto alle guanine, in particolari zone chiamate "isole CpG" (Citosina-fosfato-Guanina) che si trovano principalmente nelle regioni regolatrici di molti geni. Le DNA-metiltransferasi (DNMTs) sono gli enzimi responsabili della metilazione del DNA [Mastroeni *et al.*, 2010]. Ci sono 4 diversi tipi di DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b e sono tutte coadiuvate dal coenzima SAM (S-adenosil metionina), come donatore del gruppo metile [Mastroeni *et al.*, 2010]. Il profilo di metilazione è almeno in parte mantenuto ed ereditabile sia a seguito della divisione cellulare, per cui l'informazione specifica su quali geni debbano essere espressi è ereditata dalle cellule figlie, sia a livello transgenerazionale [Guerrero-Bosagna *et al.*, 2012]. La DNMT1 è l'enzima più comune nelle cellule somatiche ed è principalmente coinvolto nel mantenimento del profilo di metilazione, mentre la DNMT3a e la DNMT3b sono responsabili della metilazione *de novo* del DNA.

Oltre alla 5-mC anche altre modificazioni biochimiche della citosina sono state osservate: la 5-idrossimetil-Citosina (hmC), l'ossidazione della metil-Citosina per generare la 5-formil-Citosina e la 5-carbossi-Citosina. Il ruolo funzionale di queste nuove modifiche non è però ancora completamente chiarito.

Mentre la metilazione del DNA è un meccanismo epigenetico ormai consolidato, l'esistenza di un'attiva de-metilazione è stata a lungo un punto controverso [Ooi *et al.*, 2008]. Negli ultimi tempi è stato chiarito che la demetilazione è il processo con cui una citosina in precedenza metilata può subire una riconversione e tornare allo stato non-metilato. Questo meccanismo sembra essere raro nel contesto generale dell'intero genoma, ma particolarmente importante nel sistema nervoso maturo e nello zigote fecondato in fase di generazione di cellule staminali embrionali totipotenti.

4.3.1 C9orf72 e la metilazione del DNA

La presenza dell'espansione esanucleotidica nel gene *C9orf72* è considerata ormai la causa più comune sia della sclerosi laterale amiotrofica che della demenza frontotemporale. Non è ancora però del tutto chiaro in che modo questa espansione possa causare la malattia, ma ci sono dati che supportano 3 diverse ipotesi [Gendron *et al.*, 2014]:

- perdita di funzione a causa di una diminuzione dell'espressione di *C9orf72*;

- guadagno di funzione a causa della presenza di foci di RNA che sequestrano proteine importanti;
- guadagno di funzione a causa dell'espressione di polidipeptidi causati dall'espansione.

L'ipotesi di una perdita di funzione è basata sull'osservazione dei ridotti livelli di *C9orf72* presenti nei portatori dell'espansione mediati, almeno in parte, attraverso i meccanismi epigenetici, tra cui la metilazione del DNA all'interno suo promotore [Xi *et al.*, 2013; Belzil *et al.*, 2014]. Come per la maggior parte dei geni, anche per *C9orf72*, la metilazione del DNA riduce l'espressione genica [Xi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014]. Un aumento dei livelli di metilazione del DNA è stato osservato nei portatori di espansione, ma ancora non è stato definito se si tratta di un effetto protettivo (per ridurre il guadagno-di-funzione) oppure di un effetto sfavorevole (provocando perdita di funzione). Studi recenti hanno dimostrato che nei controlli e nei pazienti con FTD senza espansione in *C9orf72*, il promotore non risulta metilato, al contrario, i portatori di espansione presentavano livelli di metilazione fino a quasi il 40% [Xi *et al.*, 2013; Belzil *et al.*, 2014]. In seguito, McMillan e colleghi hanno studiato il possibile effetto di questa metilazione a livello del promotore di *C9orf72* esaminando il rapporto tra i livelli di metilazione ed il volume della materia grigia alla risonanza magnetica strutturale [McMillan *et al.*, 2014]. I pazienti che presentavano i livelli di metilazione maggiori mostravano un'atrofia minore in diverse regioni del cervello. In seguito, è stata esaminata anche la relazione tra la metilazione del DNA e la perdita neuronale: una più alta metilazione è stata associata ad una minore perdita neuronale sia a livello dell'ippocampo che della corteccia frontale. Questi risultati hanno fornito la prova che la metilazione del DNA nei portatori di espansione in *C9orf72* ha un effetto protettivo e non nocivo [McMillan *et al.*, 2014]. Questi risultati sono coerenti con gli studi dello stesso gruppo che avevano associato agli alti livelli di metilazione del DNA in *C9orf72* una minor presenza di foci di RNA e di polidipeptidi [Liu *et al.*, 2014] ed una durata di malattia più lunga [Russ *et al.*, 2015]. Tuttavia lo studio ha la grande limitazione di essere stato effettuato su un campione piccolo ed eterogeneo soprattutto per il fenotipo clinico (SLA, bvFTD, FTD-SLA e PPA) [McMillan *et al.*, 2014].

Se l'ipermetilazione di *C9orf72* nei pazienti FTD e SLA è neuroprotettiva, una possibile strategia terapeutica potrebbe essere quella di causare un aumento della metilazione del DNA in *C9orf72*. Tuttavia, si potrebbero avere degli effetti indesiderati causati dalla non specificità del processo di metilazione, ma recentemente tecniche di ingegneria epigenetica emergenti consentono la specificità genetica necessaria, almeno in condizioni sperimentali. Sebbene questi approcci saranno utilizzabili solo tra molti anni, tali progressi nella tecnologia evidenziano il potenziale dell'epigenetica come possibile terapia nelle malattie neurologiche.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo scopo del presente studio è valutare il ruolo della genetica e dell'epigenetica nello sviluppo della Demenza Frontotemporale.

In particolare, lo studio è stato suddiviso in due parti:

1. Analisi genetica nei tre geni principali della demenza Frontotemporale (*MAPT*, *GRN* e *C9orf72*) in una coorte di 287 pazienti con FTD;
2. Analisi dei livelli di metilazione dell'isola CpG presente all'interno del promotore di *C9orf72* nelle strette vicinanze dell'espansione esanucleotidica in 45 pazienti FTD e 41 soggetti sani.

MATERIALI E METODI

6.1 Soggetti

Per lo studio sono stati analizzati 287 pazienti con diagnosi di Demenza Frontotemporale (152 femmine, 135 maschi con età di esordio di 62.79 ± 10.02 anni) e 172 volontari sani (99 femmine, 73 maschi con età media al prelievo di 72.04 ± 7.7).

Tutti i pazienti, afferiti presso la Clinica Neurologica I dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi (AOUC) di Firenze, hanno seguito un iter diagnostico costituito da: accurata anamnesi familiare, esame obiettivo neurologico, test laboratoristici di routine, valutazione neurocognitiva (per valutare memoria, linguaggio e prassia), risonanza magnetica (MRI: Magnetic Resonance Imaging) oppure tomografia computerizzata (TC) e, all'occorrenza, tomografia computerizzata ad emissione di positroni (PET: Positron Emission Tomography). Il grado del deficit cognitivo è stato valutato con il Clinical Dementia Rating (CDR) e il punteggio del MMSE. La diagnosi di FTD è stata posta in accordo con i criteri in uso [Rascovsky et al. 2011, Gorno-Tempini et al. 2011]. I soggetti di controllo provengono dalla stessa regione dei pazienti e sono paragonabili per sesso ed età. È stata verificata la loro storia clinica dopo un accurato esame obiettivo generale e neurologico che permettesse di escludere l'eventuale presenza di un deterioramento delle funzioni cognitive.

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

6.2 Analisi genetica

6.2.1 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto da sangue venoso periferico (7 ml) utilizzando delle provette contenenti acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) come anticoagulante. Il campione è stato diluito 1:3 in un tampone di emolisi a pH 7.4. In seguito a centrifugazione (2000 g per 2 minuti), il pellet è stato risospeso in 3 ml di tampone di lisi cellulare (NaCl 75 mM, EDTA 24 mM agente chelante) e in 1 ml di tampone per la precipitazione della componente proteica. La lisi è stata effettuata mediante azione meccanica (vortex) e mantenendo il campione per circa 40 minuti in ghiaccio. In seguito ad una ulteriore centrifugazione (2000 g per 6 minuti) il DNA è stato isolato trasferendo il sovrantante in 3 ml di alcol isopropilico. Il DNA genomico ottenuto è stato poi messo in sospensione con 250 μ l di TE buffer. Il controllo di quantità e qualità è stato effettuato allo spettrofotometro valutando l'assorbanza a 260 nm e il rapporto delle assorbanze a 260 e 280 nm.

6.2.2 Amplificazione tramite PCR

La PCR o reazione a catena della polimerasi è un metodo rapido e semplice per ottenere *in vitro* un elevato numero di copie di uno specifico tratto di DNA; tale metodica consente di generare una serie di copie del frammento genico di interesse secondo un esponenziale 2 del numero di reazioni (cicli) fatte avvenire in un termociclatore a partire da una piccola quantità di DNA genomico. Ad oggi rappresenta lo strumento di partenza per qualsiasi tipo di indagine genetica.

Per la reazione di amplificazione oltre al DNA stampo sono necessari:

- dNTP (i deossiribonucleotidi tri-fosfati precursori; ATP, CTP, GTP, TTP);
- Primer (sequenze complementari agli estremi della sequenza da amplificare);
- TAQ (una polimerasi estratta da un termofilo, in grado di resistere alle alte temperature);

- Buffer (contenente i tamponi necessari alla reazione di elongazione).

E' necessario conoscere le regioni che fiancheggiano il frammento di DNA da amplificare (DNA target) al fine di sintetizzare chimicamente due iniziatori oligonucleotidici (primer) complementari ai tratti di DNA al 3' del target, uno per ciascuno dei due filamenti di DNA (primer *forward* e *reverse*). I primer per l'analisi dei geni *GRN* e *MAPT* sono stati disegnati mediante il programma "primer 3" (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) e ricoprono gli esoni e le giunzioni introne/esone.

La PCR avviene in una serie di cicli composti da tre fasi, con tempi e temperature definiti:

- Denaturazione: la doppia catena del DNA si apre a formare singoli filamenti, rendendo accessibile la specifica regione da amplificare. Questa fase avviene a circa 94 °C e dura pochi secondi;
- Annealing (fase di ibridazione): i due primer, presenti in eccesso, si appaiano alle sequenze complementari fiancheggianti il DNA target. Questa fase avviene ad una temperatura variabile, compresa tra i 40 ed i 65 °C, a seconda della sequenza dei primers. Questi sono in grado di fornire alla DNA polimerasi un gruppo 3'-ossidrile libero, dal quale inizia la sintesi del nuovo filamento di DNA che rappresenta la terza fase della reazione;
- Estensione: è svolta da una polimerasi termostabile, il più delle volte è rappresentata dalla *Taq* polimerasi del batterio termostabile *Thermus Aquaticus*, che svolge la sua azione ad una temperatura ottimale di 68-72°C (1min/Kb), ma è anche in grado di resistere all'esposizione prolungata a temperature superiori ai 96 °C ed è quindi attiva anche dopo la fase di denaturazione.

Ognuno di questi passaggi è ripetuto per 30-40 cicli. Alla fine dei cicli di amplificazione la temperatura è mantenuta a 72°C per circa 10 minuti, in modo da consentire all'enzima *Taq* di compiere la reazione di *fill-in*, dopo di che scende a 4°C e vi rimane per un tempo indefinito

6.2.3 Analisi di prescreening HRM

L'HRMA è una metodica di screening allestita sul Rotor Gene™ 6000 Instrument (Corbett Research, Sydney, Australia) ed è utilizzata per caratterizzare campioni di DNA in base al percorso tracciato dalla curva di

melting. Possiede numerosi vantaggi, tra cui i tempi ridotti di analisi e la bassa possibilità di inquinamento dei campioni.

Viene effettuata sui prodotti della PCR che inizialmente sono sottoposti a tre step di denaturazione per favorire la formazione di eteroduplex:

- Primo step: 8 minuti a 95°C;
- Secondo step: 6 minuti a 75°C;
- Terzo step: 6 minuti a 55 °C.

I dati delle curve di melting per ciascun amplicone vengono acquisiti in un ristretto intervallo di temperatura (75-85°C) con un incremento di 0,1°C/sec ed analizzati utilizzando il software dello strumento. Il programma fornisce le informazioni sulla reazione di amplificazione mediante la visualizzazione dell'andamento della fluorescenza dei campioni nel tempo, generando curve di melting.

Il confronto delle curve di melting dei campioni da studiare con la curva di un campione di cui si conosce già il genotipo, consente di identificare sia gli eterozigoti, individuati da un cambiamento della curva di melting, sia gli omozigoti che invece presentano la stessa forma della curva e sono differenziati principalmente da uno shift sull'asse delle temperature.

Per quanto riguarda l'identificazione di mutazioni, maggiore è la variazione di sequenza presente, maggiore sarà il potere risolutivo dell'HRM; perciò inserzioni e delezioni, che causano talvolta il cambiamento di più paia di basi, verranno identificate più facilmente con questa tecnica.

6.2.4 Trattamento con bisolfito

Il trattamento con bisolfito di sodio rappresenta il metodo migliore per valutare il grado di metilazione di una sequenza di DNA. Il bisolfito di sodio reagisce facilmente con la citosina ma poco con la metilcitosina. La citosina sulfonata è deaminata a uracile sulfonato, da cui il gruppo sulfonato può essere rimosso in ambiente alcalino per formare uracile che è riconosciuto come timina dalla Taq polimerasi. Pertanto, dopo la PCR, la citosina rimane solo nella posizione in cui è metilata nel DNA di partenza.

Il DNA del campione in esame è stato convertito mediante il kit EpiTect Bisulfite 96-well Plates® (Qiagen). Il kit permette una prima fase in cui il DNA viene convertito e una seconda fase di purificazione per

l'eliminazione di tutti i reagenti utilizzati al fine di ottenere un DNA puro da utilizzare nella successiva reazione di PCR.

6.2.5 Analisi di Sequenza

L'analisi di sequenza è stata effettuata sia sui campioni di DNA dei soggetti che presentavano variazioni nelle curve di melting all'HRM sia sui campioni di DNA trattati con bisolfito.

I prodotti della PCR sono stati purificati mediante QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). La reazione di sequenza è stata realizzata in un volume di 20 μ l utilizzando 2 μ l di prodotto purificato di PCR, 1 μ l di primer 5 μ M e 4,5 μ l di Dye terminator mix (Big Dye terminator Cycle Sequencing Kit v.1.1., Applied Biosystems, Foster City, CA).

La miscela di reazione è stata quindi posta in un termociclatore automatico ad una temperatura iniziale di denaturazione di 95°C per 5 minuti, seguiti da 30 cicli a 95°C per 30 secondi, 55°C per 10 secondi e 60°C per 4 minuti. Ogni prodotto della reazione di sequenza è stato quindi purificato mediante l'uso del DyeEx™ 2.0 Spin Kit, risospeso in Template Suppression Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA) e caricato su sequenziatore ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

L'analisi di sequenza è in grado di fornire delle immagini, chiamate elettroferogrammi, che consentono la visualizzazione delle singole basi del DNA, e sulle quali è possibile andare a riscontrare la presenza di mutazioni; ed è proprio attraverso l'attenta analisi dei suddetti elettroferogrammi che è stato possibile riscontrare la presenza di mutazioni nei nostri campioni.

Per valutare il livello di metilazione del promotore del gene *C9orf72* è stato utilizzato il sequenziamento diretto a seguito del trattamento con bisolfito dei campioni di DNA. La sequenza analizzata presenta al suo interno 26 siti CpG (Figura 17).

agggtttgtagtgaggatgtttgaatgtatttaaatagtgttta^{yg}gtaaaaataaaattt
 tatttattaattatgtggttgag^{yg}ttttattgtttattaagtataaaataaaattatttaa
 aatta^{yg}aaat^{yg}tttttttttttttt^{yg}atttagtagtttttttttattaagggtt^{yg}ta
 ta^{yg}ttattg^{yg}ttaa^{yg}tttttttagag^{yg}ggttttaagataaaagaataggataagt
 tgttt^{yg}ttttattt^{yg}tttagttt^{yg}tgagaaaa^{yg}ttat^{yg}tatatagaaaatagata
 ga^{yg}taattta^{yg}gtgttt^{yg}ttaggaaagagaggtg^{yg}ttaaatag^{yg}ataagttt^{yg}
 tttta^{yg}taaaagatga^{yg}tttgggtgtgttagt^{yg}tttttggttgtt^{yg}ggtgtttttttt
 ttggggg^{yg}gggttttagtaagagttaggtgtgggttttaggaggtg

Figura 17. Siti CpG analizzati nella valutazione dei livelli di metilazione del promotore gene *C9orf72*.

Per evitare errori di quantificazione dovuti dalla misurazione dell'altezza relativa dei picchi sono state usate tre livelli di metilazione:

- non metilato: quando era presente solo il picco della timina;
- metilato: quando era presente contemporaneamente il picco della timina e della citosina;
- metilato 100%: quando era presente solo il picco della citosina.

Per ciascun campione è stato ottenuto il numero di siti CpG metilati

6.2.6 Genotipizzazione delle ripetizioni G_4C_2 in *C9orf72*

Per valutare la presenza della regione espansa ripetuta G_4C_2 in *C9orf72*, è stata eseguita una reazione di PCR utilizzando i seguenti primers:

- Orf F CAAGGAGGGAAACAACCGCAGCC
- Orf R GCAGGCACCGCAACCGCAG

I prodotti sono stati separati su gel di agarosio al 3.5% che è stato interpretato come segue (Figura 18):

- se si visualizzano 2 bande con peso molecolare di circa 138bp, il paziente è contiene un numero limitato di espansioni inferiore alle 30 ripetizioni su entrambi gli alleli;
- se si visualizza un'unica banda con peso molecolare di circa 138 pb, si presume che un allele contenga un numero di ripetizioni inferiori a 30 mentre l'altro possa essere costituito da un numero di ripetizioni talmente ampio da non essere amplificato durante la PCR di pre-screening.

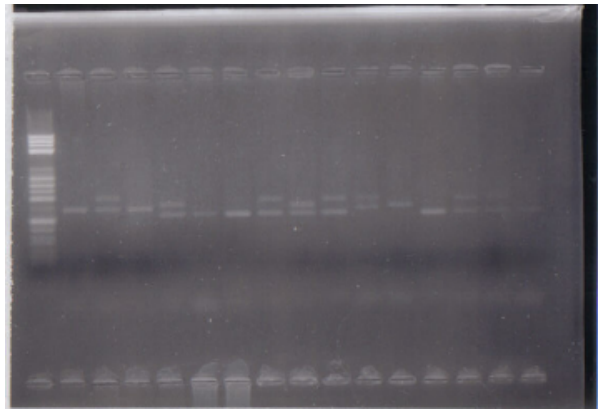


Figura 18. Visualizzazione su gel di agarosio al 3,5% del prodotto di PCR

Nel secondo caso, si procede con una Repeat Primed PCR ed analisi dei frammenti per la rilevazione dell'espansione. Per la Repeat Primed PCR si utilizza di una miscela di tre primers:

- *C9orf72P1*, primer forward marcato in 5' con un fluoroforo (FAM), di 41pb;
- *C9orf72P2* primer reverse di 54 bp che presenta all'estremità 3' la sequenza ripetuta per 4 volte;
- *C9orf72P3* primer reverse di 18pb.

C9orf72P2 e *C9orf72P3* condividono una coda in 5' (sequenza definita di ancoraggio).

Nella miscela di reazione, *C9orf72P2* è in concentrazioni limitanti rispetto a P3 (1:10); per cui durante i primi cicli di amplificazione il primer *C9orf72P2* si legherà ai siti espansi multipli presenti nella regione d'interesse. Viene perciò generata una miscela di ampliconi con lunghezze differenti, rilevabili grazie al primer *C9orf72P1* legato al fluorocromo FAM. Esaurito il primer *C9orf72P2*, il primer *C9orf72P3* tenderà a legarsi all'estremità 3' degli ampliconi ottenuti.

Gli ampliconi ottenuti vengono sottoposti all'analisi dei frammenti effettuata mediante l'utilizzo del sequenziatore (ABI PRISM 3500 genetic analyzer, Applied Biosystems) e i dati ottenuti analizzati tramite il software Gene Mapper (ABI).

In presenza di un elevato numero di espansioni esanucleotidiche, si ottiene un profilo tipico definito a "dente di sega", dove sono evidenziati i frammenti che si ripetono con una periodicità di 6 paia di basi. Tale metodologia però consente solo di poter discriminare tra pazienti non

portatori e pazienti portatori di un numero patologico di ripetizioni, dato che non permette però di discriminare più di 60 ripetizioni.

6.2.7 Analisi del polimorfismo dell'APOE

La tipizzazione del genotipo dell'Apo E è stata eseguita secondo la metodica di Hixson e Vernier (1990). Il DNA è stato amplificato in PCR nella regione del IV esone del gene Apo E utilizzando oligonucleotidi specifici fiancheggiati la sequenza nucleotidica polimorfica:

- **ApoE-f** 5'-TCG-GCC-GCA-GGG-CGC-TGA-TGG-3'
- **ApoE-r** 5'-CTC-GCG-GGC-CCC-GGC-CTG-GTA-3'.

Il prodotto amplificato di 332 bp è stato digerito con l'enzima di restrizione *HhaI* a 37°C per 4 ore. *HhaI* taglia a livello della sequenza GCGC, corrispondente all'112arg (E4) e 158arg (E3, E4), ma non la sequenza GTGC codificante la 112cys (E2, E3) e la 158cys (E2). I frammenti ottenuti, la combinazione dei quali risulta unica per ogni genotipo, sono stati separati tramite gel-elettroforesi su gel al 3% di agarosio che consente di separare frammenti che differiscono fra loro per poche paia di basi.

6.3 Dosaggio progranulina plasmatica

Per determinare l'espressione della progranulina nei campioni di plasma umano è stato impiegato "Human Progranulin ELISA Kit" (Adipogen Inc, Seoul Korea), seguendo le istruzioni del produttore.

Livelli plasmatici di progranulina inferiori a 112 ng/ml distinguono i portatori di mutazioni in *GRN* dai non portatori, mentre livelli inferiori a 61.55 ng/ml depongono per la presenza di una mutazione loss of function a carico di *GRN* [Ghidoni *et al.*, 2012]. Al fine di incrementare l'accuratezza, tutti i campioni sono stati analizzati due volte in due procedure indipendenti usando campioni di controllo per la standardizzazione.

6.4 Analisi bioinformatica e statistica

L'effetto delle mutazioni sulla stabilità e sulla funzionalità proteica è stato valutato utilizzando diversi software online. L'analisi mediante programma SIFT ha considerato l'effetto della sostituzione aminoacidica sulla funzione proteica in base all'omologia di sequenza presente nel punto in cui è situata la variante identificata e le proprietà fisiche degli aminoacidi coinvolti nella sostituzione. I programmi MUpro e I-Mutant2.0 sono stati impiegati per stabilire come la mutazione aminoacidica modifichi la stabilità della proteina. Altri due software, Homologene e ClustalW sono stati utilizzati per valutare la conservazione della sequenza proteica attraverso l'allineamento di multiple sequenze target (la sequenza della proteina umana è stata allineata con la proteina di dieci diverse specie di mammiferi).

I dati relativi ai livelli di metilazione del promotore del gene *C9orf72* sono stati analizzati col programma SPSS ver. 21 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). In particolare è stato usato il test ANOVA per valutare le differenze tra le medie relativamente al pattern di metilazione tra casi e controlli ed il test Spearman per valutare eventuali correlazioni.

RISULTATI

7.1 Screening di mutazioni autosomiche dominanti

Nel presente studio sono stati analizzati 459 campioni di DNA di soggetti suddivisi in 287 provenienti da pazienti affetti da Demenza Frontotemporale (46 con familiarità positiva per demenza) e 172 da soggetti di controllo. Le caratteristiche clinico-demografiche della popolazione oggetto di studio sono riportate in tabella 3.

Tabella 3. Caratteristiche clinico-demografiche dei soggetti analizzati nello studio

	FTD	Controlli
Totale campione	287	172
Età (media ± DS)	62.72±10.01	72.04±7.71
Diagnosi		
FTD (%)	267 (93.04%)	
FTD/ALS (%)	20 (6.96%)	
Femmine	152 (52.96%)	99 (57.55%)
ApoE:		
ε4 -	207 (72.2%)	137 (79.6%)
ε4 +	80 (27.8%)	35 (20.4%)

7.1.1 Gene *MAPT*

Nei 287 pazienti FTD studiati, l'analisi molecolare della regione codificante del gene *MAPT*, comprese le giunzioni esone-introne, ha permesso di identificare 6 variazioni di sequenza, di cui solo una sicuramente patogenetica. Le varianti di sequenza identificate sono riportate in tabella 4.

Tabella 4. Varianti di sequenza riscontrate nel gene *MAPT*.

Sede	Cambiamento nucleotidico	Cambiamento proteico	Frequenza eterozigoti % (n/N) ^a	Referenza ^b
Esone 1	c. 121 G>A	p.Ala41Thr	0.35% (1/287)	Rs115239819
Esone 9	c. 1686 A>G	p.Ala227	6.96% (20/287)	Rs1052553
Esone 9	c.1770T>C	p.Asn255	6.96% (20/287)	Rs17652121
Esone 9	c.1815G>A	p.Pro270	6.96% (20/287)	Rs11568305
Esone 10	c.1908G>A	p.Pro301	0.35% (1/287)	Rs63751395
Esone 12	c.2092G>A	p.Val363Ile	0.35% (1/287)	Munoz <i>et al.</i> , 2007 Anfossi <i>et al.</i> , 2008

^a Frequenza riferita al numero di portatori (n) su tutti i campioni analizzati (N). ^bSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

La mutazione p. Val363Ile già descritta in un caso di afasia progressiva non-fluente [Munoz *et al.*, 2007], è stata osservata in una donna con diagnosi clinica di demenza semantica ad esordio giovanile (età esordio dei sintomi: 46 anni). La paziente è deceduta all'età di 73 anni, con una durata di malattia di 27 anni. Durante l'anamnesi della paziente è emerso che non era presente nessun familiare affetto da demenza.

7.1.2 Gene *GRN*

L'analisi molecolare della regione codificante del gene *GRN*, comprese le giunzioni esone-introne, ha permesso di identificare nei 287 pazienti FTD studiati 9 variazioni di sequenza, di cui 4 sicuramente patogenetiche ed 1 con natura patogenetica non definita. Le varianti di sequenza identificate sono riportate in tabella 5.

Tabella 5. Varianti di sequenza riscontrate nel gene GRN.

Sede	Cambiamento nucleotidico	Cambiamento proteico	Frequenza eterozigoti % (n/N) ^a	Referenza ^b
Esone 2	c.99 C>T	Asp33	0.69% (2/287)	rs63750742
Esone 4	c.328C>T	Arg110X	0.35% (1/287)	Van Deerlin, <i>et al.</i> , 2007
Esone 5	c.384T>C	Asp128	2.09% (6/287)	rs25646
Esone 5	c.415T>C	Cys139Arg	0.69% (2/287)	Brouwers, <i>et al.</i> , 2008
Esone 6	c.545C>T	Thr182Met	0.35% (1/287)	rs63750479
Esone 8	c.813_816delCACT	Thr272fs	1.04% (3/287)	Benussi <i>et al.</i> , 2008
Esone 11	c.1201C>T	Gln401X	0.35% (1/287)	Le Ber <i>et al.</i> , 2007
Esone 11	c.1297C>T	Arg433Trp	0.69% (2/287)	rs63750412
Esone 12	c.1477C>T	Arg493X	0.35% (1/287)	Huey <i>et al.</i> , 2006

^a Frequenza riferita al numero di portatori (n) su tutti i campioni analizzati (N). ^bSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

Tre diverse mutazioni patogenetiche che causano una proteina tronca sono state identificate in 6 dei nostri pazienti:

- 3 pazienti sono risultati portatori della mutazione più frequente in Italia (p. Thr272fs). I pazienti presentavano fenotipi clinici eterogenei (variante comportamentale e demenza semantica) ed un ampio range di età di esordio (56-75 anni);
- 1 paziente con diagnosi clinica di demenza frontotemporale comportamentale (esordio dei sintomi all'età di 50 anni) è risultato portatore della mutazione p.Arg110X;
- 1 paziente con deficit cognitivi e cambiamenti di personalità, caratterizzati soprattutto da apatia ed impulsività dall'età di 58 anni è risultato portatore della mutazione p. Gln401X;
- 1 paziente con esordio a 54 anni e storia familiare per demenza frontotemporale è risultato portatore della p.Arg493X.

Tutti e 6 i pazienti presentavano livelli di progranulina nel plasma di circa 50 ng/ml.

La variante p.Cys139Arg è già stata riportata in letteratura con una patogenicità non ancora ben definita [Brouwers *et al.*, 2008 Finch *et al.*, 2009 Bernardi *et al.*, 2009]. Questa variante, al contrario di tutte le mutazioni

presenti sul gene *GRN*, non causa un'aploinsufficienza della proteina, ma ne altera la conformazione tridimensionale. Infatti al suo interno sono presenti dei motivi ricchi in cisteine che permettono la formazione di ponti disolfuro.

Ricostruendo la storia familiare delle due pazienti portatrici della variante è emerso che solo una delle due presentava una familiarità per la malattia.

Durante l'anamnesi della paziente 1 CI è emerso che la madre fosse affetta da demenza caratterizzata da alterazioni del comportamento e deceduta a 85 anni mentre lo zio materno, deceduto a 92 anni, affetto da demenza e parkinsonismo; il Goldman score è pari a 3 (Figura 19). Non è stato possibile effettuare l'analisi genetica a nessun membro della famiglia per poter dimostrare la segregazione della variante con la patologia.

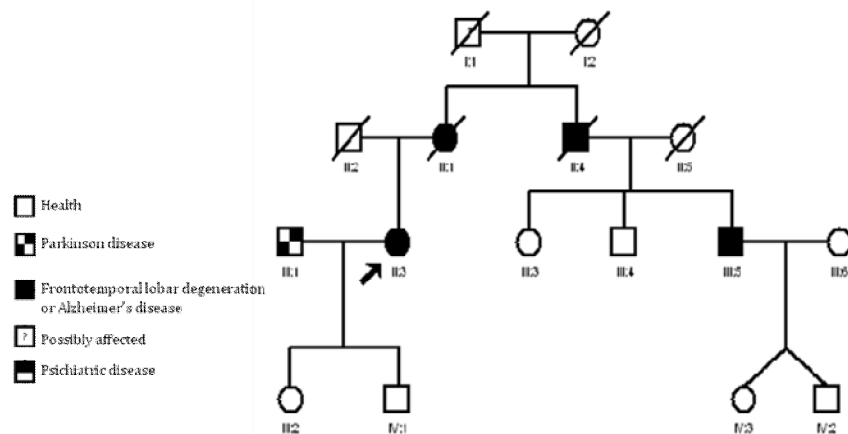


Figura 19. Pedigree del paziente 1 (CI) con familiarità positiva per demenza. La freccia nel pedigree segnala il probando.

L'anamnesi della paziente 2 TM non ha evidenziato familiarità per demenza (Goldman score 4). Il padre della paziente è deceduto in un incidente d'auto, mentre la madre ha avuto ad un importante episodio ischemico cerebrale all'età di 62 anni ed è morta all'età di 66 anni. È emerso inoltre che uno zio ed un cugino paterno soffrivano di disturbo bipolare (Figura 20). In questo caso è stato possibile effettuare la ricerca della variante in tutti i cugini paterni non affetti da demenza. L'analisi genetica non ha evidenziato la presenza della mutazione Cys139Arg in nessuno degli altri membri della famiglia analizzati.

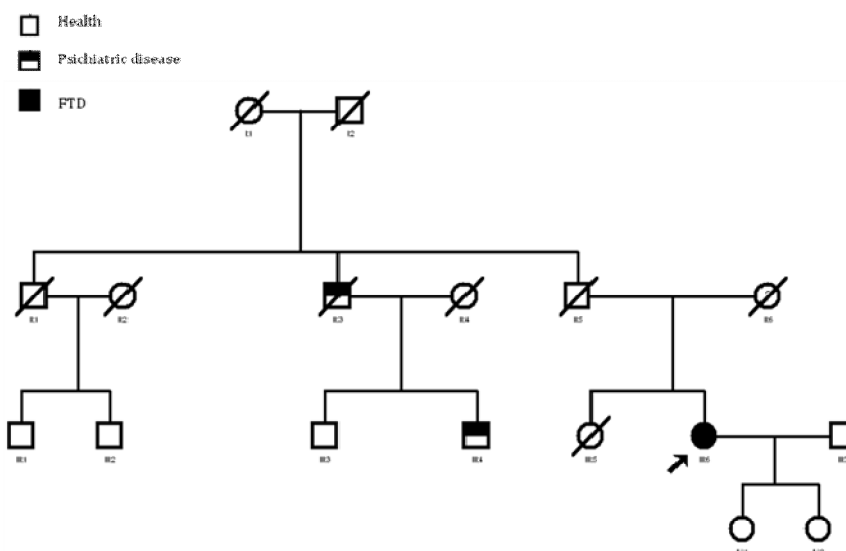


Figura 20. Pedigree del paziente 2 (TM) senza familiarità per demenza. La freccia nel pedigree segnala il probando

Nelle due pazienti si distingueva un differente sottotipo clinico di FTD: in particolare per la paziente 1 CI la diagnosi finale è stata di demenza semantica con età di esordio di 78 anni, mentre per la paziente 2 TM di FTD comportamentale con esordio dei sintomi all'età di 55 anni.

I livelli di progranulina nel plasma per entrambe le pazienti sono risultati essere intorno ai 100 ng/ml, in particolare 97.5 ng/ml per la paziente 1 CI e 110.2 ng/ml per la paziente 2 TM.

Per escludere la possibilità che questa variante rappresenti un polimorfismo raro e non patogenetico, sono stati analizzati 172 soggetti di controllo mediante analisi HRM; nessuno è risultato portatore della variante allelica descritta.

L'analisi bioinformatica è stata eseguita per valutare la patogenicità della variante Cys139Arg. Sono stati utilizzati vari software online che possono stimare eventuali alterazioni causate dalla variante nella stabilità e nella funzionalità della proteina. Il programma SIFT ha evidenziato che tale modificazione aminoacidica non è tollerata dalla proteina (Figura 21). I programmi MUpro e I-Mutant 2.0 hanno mostrato una diminuzione della stabilità in seguito alla sostituzione della cisteina. Infine Homologene e ClustalW, hanno permesso di capire come il residuo di cisteina in posizione 139 è altamente conservato nelle dieci specie di mammiferi prese in esame (Figura 21).

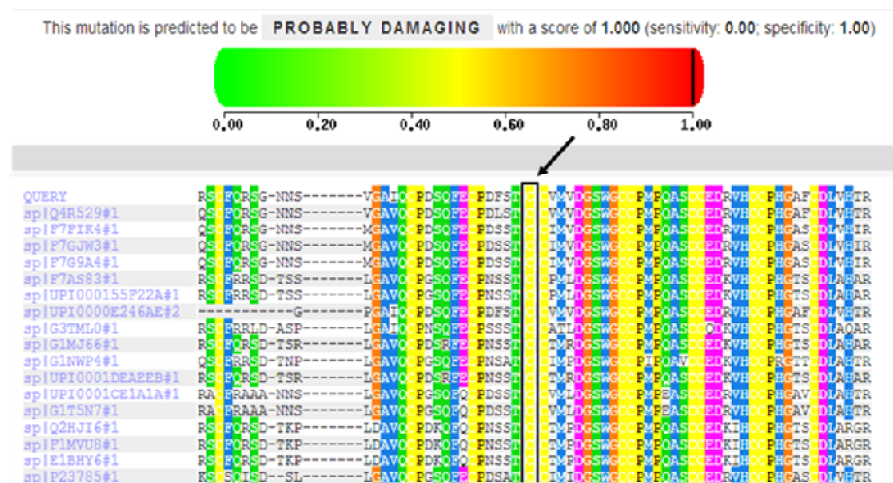


Figura 21. Predizione di mutazione patogenetica ed omologia di sequenza a livello dell'aminoacido 139 in 17 specie diverse rispetto ad *homo sapiens*.

7.1.3 L'espansione C9orf72

Lo studio dello screening del gene *C9orf72* ha permesso di identificare 17 pazienti con FTD (7 maschi e 10 femmine) portatori dell'espansione patologica per una frequenza di circa il 6%. L'età media di insorgenza dei sintomi nei pazienti portatori di mutazione è di 60.3 ± 10.1 anni che non risulta essere statisticamente differente tra portatori e non portatori dell'espansione (60.3 ± 10.1 anni; range 42-74 versus 64 ± 10.91 anni; range 41-87; *pvalue*: 0,174), così come non sono state individuate differenze significative con i pazienti portatori di mutazioni in *GRN* e *MAPT* (*pvalue*: 0.793). Sette pazienti su diciassette portatori di espansione presentavano demenza frontotemporale associata a sclerosi laterale amiotrofica (41.1%). È stato inoltre effettuato lo screening dei 41 soggetti di controllo utilizzati nell'analisi di metilazione del DNA. Lo screening dei controlli non ha mostrato nessun risultato positivo.

Le figure 22 e 23 mostrano i plots ottenuti tramite l'analisi dei frammenti di un paziente sano e di uno portatore dell'espansione esanucleotidica che presenta il tipico profilo a dente di sega.

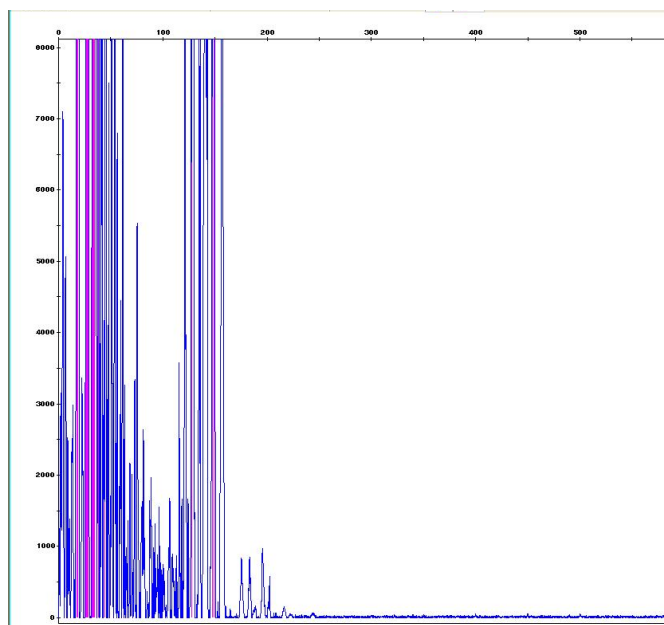


Figura 22. Analisi dei frammenti ottenuta da un paziente non portatore di un'espansione patologica in *C9orf72*

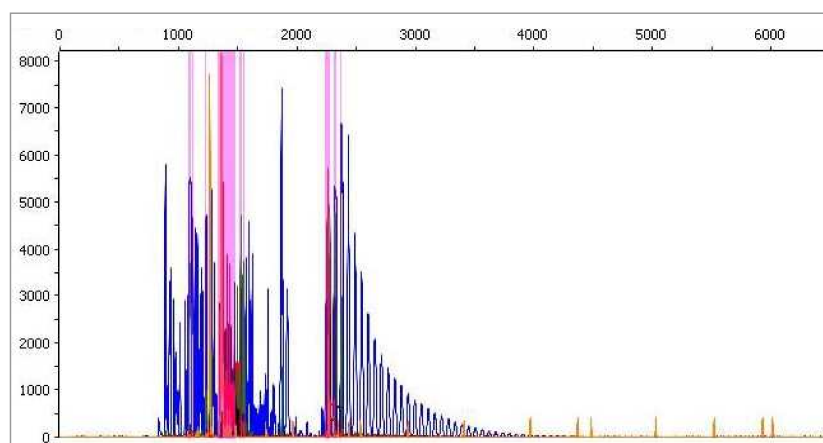


Figura 23. Analisi dei frammenti ottenuta da un paziente portatore di un'espansione patologica in *C9orf72* con profilo a dente di sega

7.3 Livelli di metilazione del promotore del gene *C9orf72*

Lo studio del livello di metilazione del promotore del gene *C9orf72* è stato effettuato su 86 campioni di DNA provenienti da 17 pazienti FTD portatori di espansione in *C9orf72*, 28 pazienti FTD non portatori di mutazioni nei geni *MAPT*, *GRN* e *C9orf72* e da 41 soggetti di controllo. Le caratteristiche clinico-demografiche della popolazione oggetto di studio sono riportate in tabella 6.

Tabella 6. Caratteristiche clinico-demografiche dei soggetti analizzati nello studio.

	FTD		Soggetti di controllo
	<i>C9orf72</i> +	<i>C9orf72</i> -	
Totale campione	17	28	41
Età esordio (media ± DS)	60.3±10.1	65.4±6.5	-
Età al prelievo (media ± DS)	62.6±10.1	68.6±6.6	73.15±7.9
Femmine	58.8%	39.3%	58.5%
Diagnosi			
FTD (%)	58.9%	85.7%	-
FTD/ALS (%)	41.1%	14.3%	-
Range of G₄C₂			
Allele 1	2-8 ripetizioni	2-12 ripetizioni	2-8 ripetizioni
Allele 2	>50 ripetizioni	2-15 ripetizioni	2-18 ripetizioni

Cromatogrammi rappresentativi delle sequenze metilate e non metilate sono mostrati nella figura 24.

I livelli di metilazione sono stati suddivisi in tre diversi sottogruppi in base al livello massimo di siti CpG metilati osservati nel gruppo di controllo:

- No metilazione: 0 siti CpG metilati;
- Bassa metilazione: 1-3 siti CpG metilati;
- Alta metilazione: 4-26 siti CpG metilati.

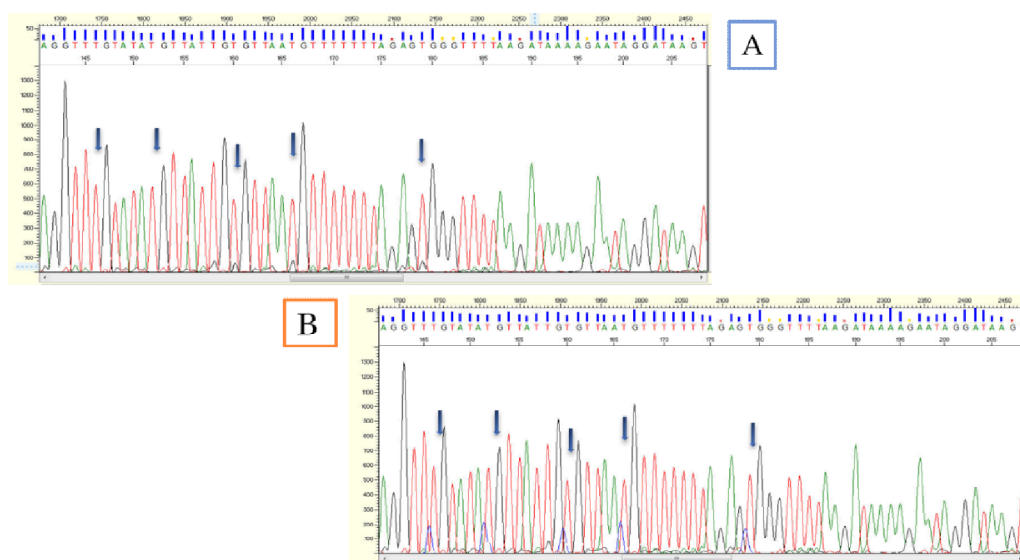


Figura 24. Cromatogramma rappresentativo di una sequenza contenente 5 siti CpG di un campione non metilato (A) e di un campione metilato (B).

I risultati dell'analisi di metilazione nel promotore del gene *C9orf72* nei nei tre gruppi analizzati sono riportati in Tabella 7. Nel gruppo dei non portatori di espansione (pazienti e soggetti di controllo), il 94% dei campioni (n=65) risulta non metilato (siti CpG metilati: 0). Al contrario, il 58.8% dei pazienti portatori di espansione presenta più di 1 sito CpG metilato e la metilazione è stata ritrovata in tutti i 26 siti CpG.

Tabella 7. Livelli di metilazione nei pazienti portatori di espansione *C9orf72*, nei pazienti non portatori di mutazioni e nei soggetti di controllo.

Numero di siti CpG metilati	FTD-FTD/SLA portatori di espansione N (Frequenza %)	FTD-FTD/SLA non portatori di espansione N (Frequenza %)	Controlli N (Frequenza %)
0 No metilazione	7 (41.17%)	27 (96.42%)	38 (92.68%)
1-3 Bassa Metilazione	6 (35.29%)	1 (3.57%)	3 (7.31%)
4-26 Alta metilazione	4 (23.52%)	0	0
Total	17	28	41
Pvalue: Rispetto ai pazienti portatori di espansione		<0,0001*	<0,00001*
Pvalue: Rispetto ai pazienti non portatori di espansione			0,641

Una differenza statisticamente significativa è stata trovata tra i livelli di metilazione dei portatori di espansione e i non portatori (pazienti portatori di espansione vs. pazienti non portatori di espansione, $pvalue < 0.0001$; pazienti portatori di espansione vs. soggetti di controllo, $pvalue < 0.00001$), mentre nessuna differenza è stata riscontrata tra i gruppi dei non portatori di espansione e i soggetti di controllo ($pvalue=0.641$) (Tabella 7, Figura 25).

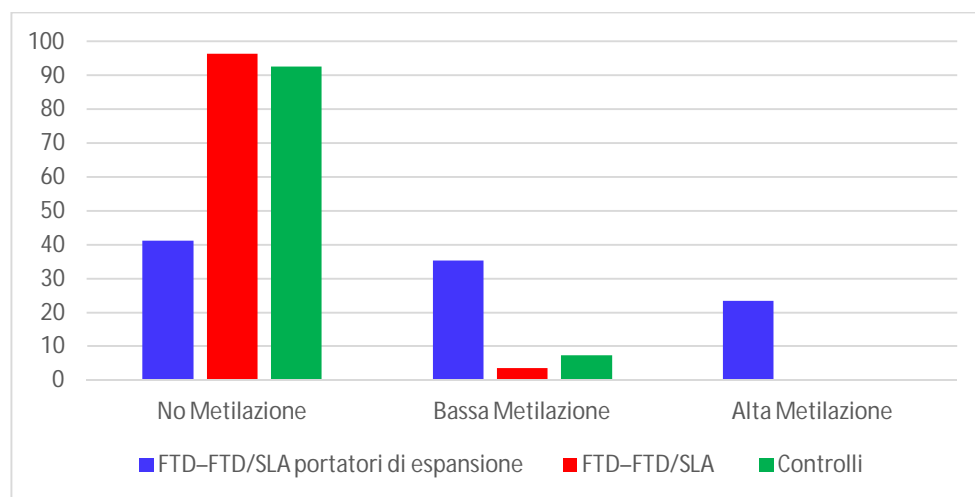


Figura 25. Grafico rappresentativo dei livelli di metilazioni nel promotore del gene C9orf72 nei tre gruppi di soggetti analizzati

Inoltre all'interno del gruppo dei pazienti portatori di espansione, nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra i pazienti FTD rispetto ai pazienti FTD/SLA ($pvalue=0,6941$).

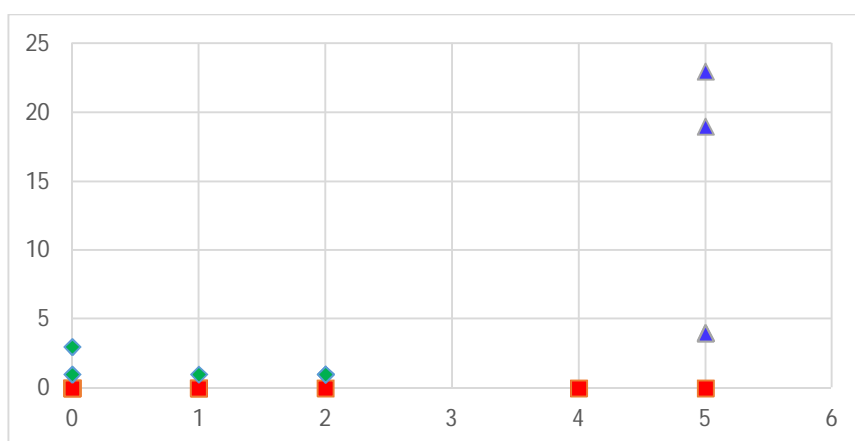


Figura 26. Grafico rappresentativo dei livelli di metilazione in base all'intervallo di tempo tra età di esordio ed età al prelievo.

I livelli di metilazione non correlano né con l'età di esordio dei sintomi (range di età 42-74 anni; coefficiente del test Spearman= -0.16176, *pvalue* = 0.53) né con l'età al momento del prelievo (range di età 42-76 anni; coefficiente del test Spearman= -0.01612, *pvalue*= 0.95).

Inoltre non è stata trovata nessuna correlazione statisticamente significativa tra i livelli di metilazione e l'intervallo di tempo tra l'età di esordio e l'età al momento del prelievo (coefficiente del test Spearman=0.44882, *pvalue*=0.07074. Tuttavia, si osserva una più alta metilazione nei pazienti con intervallo di tempo tra età di esordio ed età prelievo più ampio (Figura 26).

DISCUSSIONE

La demenza Frontotemporale rappresenta la seconda forma di demenza più frequente nella popolazione di età inferiore ai 65 anni, preceduta soltanto dalla Malattia di Alzheimer ed è globalmente responsabile del 5-15% di tutti i casi di demenza. È una patologia neurodegenerativa eziologicamente molto complessa e coinvolge fattori sia genetici che ambientali. Dopo oltre un secolo dalla descrizione della malattia, numerosi sforzi sono stati compiuti per individuare la componente genetica responsabile dell'insorgenza della patologia.

Sul piano clinico, la FTD comprende un ampio spettro di patologie neurodegenerative ed è caratterizzata dalla comparsa di progressive alterazioni del comportamento e della personalità del soggetto, di deficit delle funzioni esecutive e/o compromissione del linguaggio; in base ai segni e ai sintomi clinici preminenti si possono riconoscere principalmente tre forme: variante comportamentale, afasia progressiva non fluente e demenza semantica. Possono comparire inoltre manifestazioni legate al coinvolgimento del sistema extrapiramidale oppure malattia del motoneurone.

Alla grande variabilità clinica corrisponde anche un'ampia variabilità istopatologica che, secondo la più recente classificazione, distingue tre forme più frequenti: FTD-tau con inclusioni tau positive, FTD-TDP con inclusioni Tar DNA Binding Protein 43 (TDP 43) positive e FTD-FUS con inclusioni FUS positive; a queste si aggiungono poi dei quadri istopatologici più rari (FTD-UPS, FTD-IF e FTD-ni).

Circa il 40% dei pazienti con FTD presenta una storia familiare positiva per decadimento cognitivo e, in circa la metà dei casi, si può evidenziare un pattern di trasmissione autosomico dominante. Negli ultimi anni sono stati identificati diversi geni, le cui mutazioni sono associate alla FTD: *MAPT* responsabile di 0-50% dei casi, *GRN* che causa 3-26% di tutte le forme, *C9orf72* riscontrato nel 6-48% dei casi familiari, *VCP*, *TARDBP-42*, *FUS/TLS* e *CHMP2B* responsabili di 1-2% delle forme. Recentemente, mediante il sequenziamento del genoma di 104 pazienti FTD-TDP confermati patologicamente e risultati negativi per le mutazioni in *C9orf72* e *GRN* sono stati identificati due nuovi geni: optineurin (OPTN) e TANK-binding kinase 1 (TBK1)[Pottier *et al.*, 2015].

Quest'ultimo, ad oggi, è considerato la terza causa più frequente di FTD in Belgio, dopo *C9orf72* e *GRN* [Gijssels *et al.*, 2015].

La demenza frontotemporale è considerata una patologia eziologicamente molto complessa e lo studio della genetica non è in grado di spiegare tutti i suoi aspetti. Le modificazioni epigenetiche, in particolare la metilazione del DNA, potrebbero essere la chiave per comprendere al meglio la patogenesi della malattia.

La metilazione delle Citosine, appartenenti ai dinucleotidi CpG, è una importante modificazione epigenetica e l'ipermetilazione di questi siti causa principalmente il silenziamento dell'espressione genica. In letteratura, si conoscono molti geni con espansioni di ripetizioni trinucleotidiche che presentano livelli di metilazioni anomali e di conseguenza una riduzione dell'espressione genica, come ad esempio nell'Atassia di Friedreich [Greene *et al.*, 2007].

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare il ruolo della genetica e dell'epigenetica nello sviluppo della Demenza Frontotemporale.

Lo screening genetico condotto su 287 soggetti affetti da FTD, ha confermato la presenza di mutazioni causali nei geni *GRN*, *MAPT* e *C9orf72* in un totale di 26 pazienti.

Circa il 65% dei pazienti risultati portatori di mutazioni (17 pazienti) e il 6% dell'intera popolazione, risultano portatori dell'espansione esanucleotidica in *C9orf72*; la seconda percentuale risulta in accordo con la frequenza riportata in letteratura [Crutz *et al.*, 2013], in cui la frequenza delle mutazioni in *C9orf72* è intorno al 6%. Mentre, per quanto riguarda la frequenza di mutazioni nei geni *GRN* e *MAPT*, la percentuale ritrovata nella nostra popolazione di studio è più bassa rispetto a quella riportata in letteratura (*GRN* 3% vs 5-10%; *MAPT* 0,3% vs 2-11%) [Crutz *et al.*, 2012], probabilmente perché la maggior parte dei nostri casi risultano essere sporadici (solo il 16 % presentava storia familiare per demenza).

Tutte le mutazioni identificate sono state descritte in precedenza; tuttavia la descrizione delle pazienti portatrici della mutazione nell'esone 5 in *GRN* (p. Cys139Arg, c.415T>C) ha portato ulteriori prove sulla patogenicità della variante. In questo studio, abbiamo segnalato due pazienti FTD con diversi quadri clinici (bvFTD e SD) e differenti età di esordio (55-78 anni). I nostri risultati, insieme a quelli dei casi precedentemente descritti [Bernardi *et*

al., 2009; Brouwers *et al.*, 2008; Finch *et al.*, 2009] confermano l'eterogeneità dei fenotipi clinici associati a mutazioni nel gene *GRN*. I livelli plasmatici di PGRN nei due casi sono compresi tra 97,2 e 110,2 ng/ml e sono comparabili con livelli plasmatici riportati in letteratura per i portatori della stessa variante [Bernardi *et al.*, 2009; Brouwers *et al.*, 2008; Finch *et al.*, 2009]. Questi valori risultano essere intermedi tra quelli misurati nei soggetti di controllo (>112 ng/ml) e nei portatori di mutazione di PGRN nulle (<61.55 ng/ml), mostrando una riduzione parziale della proteina nel plasma. Sebbene questi valori plasmatici possano porre dubbi su un effettivo ruolo patogenetico di questa variante, non possiamo però escluderne la possibilità data la parziale perdita di funzione della proteina. Il residuo di Cisteina alterato si trova all'interno di un peptide granulina (GRN F) ed è conservato tra le diverse specie, suggerendo la sua importanza nella funzionalità della GRN F. Infatti, la variante Cys139Arg colpisce un motivo altamente conservato di 12 residui di cisteina che formano sei ponti disolfuro richiesti per la struttura tridimensionale della proteina.

Tuttavia, il ruolo funzionale sia di PGRN che dei peptidi prodotti a seguito di taglio proteolitico è poco conosciuto e questo rende difficile determinare la patogenicità delle varianti che interessano solo uno di questi peptidi. Sfortunatamente non è stato possibile fornire la prova della segregazione della variante con la patologia, a causa dell'assenza di pazienti in vita in entrambe le famiglie studiate. Tuttavia, la variante non è stata osservata in nessuno dei familiari sani studiati e in più di 1.000 soggetti di controllo (907 soggetti precedentemente descritti [Cruts *et al.*, 2012] e altri 172 analizzati in questo studio); questo potrebbe rafforzare l'ipotesi di un possibile ruolo patogenetico della Cys139Arg.

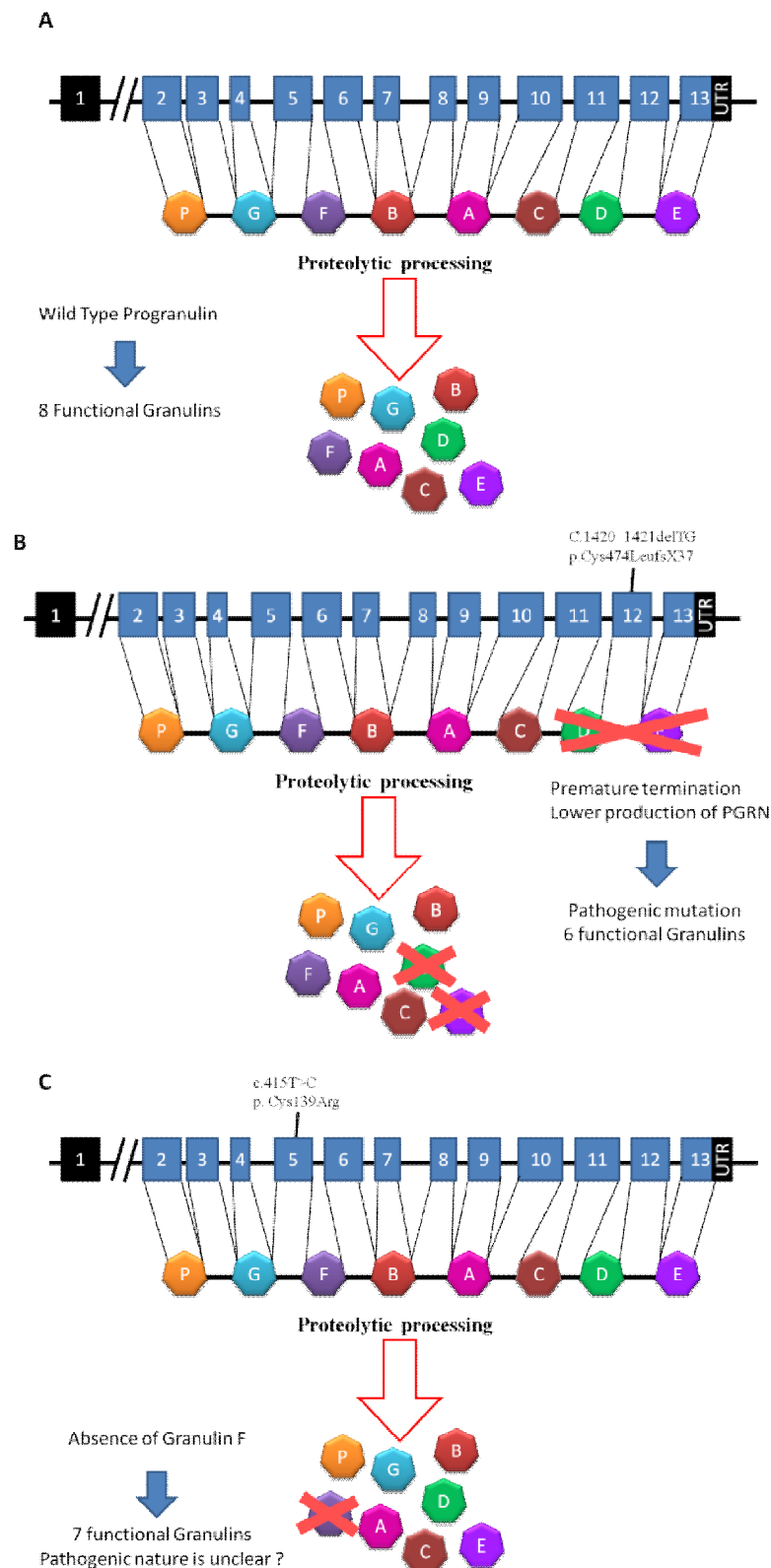


Figura 27. Rappresentazione schematica della struttura genica, proteica e segmentazione proteolitica della GRN. (A) Dopo la secrezione, la proteina *wild type* è segmentata in 8 peptidi. (B) Esempio di mutazione patogenetica: la mutazione dell'esone 12 (C.1420_1421delTG; p.Cys474LeufsX37) causa ridotta secrezione della proteina e una scissione incompleta si perdono i peptidi GRN D e GRN E. (C) Mutazione nell'esone 5 (c.415T> C, pag. Cys139Arg). Dopo la secrezione, la progranulina mutante può essere scissa in 7 peptidi, si perde GRN F.

Il nostro studio ha esaminato inoltre i livelli di metilazione nel promotore del gene *C9orf72* nella demenza frontotemporale. L'analisi è stata effettuata su una coorte di 86 soggetti mediante la tecnica del sequenziamento diretto a seguito della conversione con bisolfito dei campioni di DNA. La valutazione dei livelli di metilazione dell'isola CpG nelle strette vicinanze della ripetizione G₄C₂ ha permesso di approfondire uno dei possibili meccanismi di malattia, ovvero la riduzione del 50% del mRNA di *C9orf72* nei pazienti portatori di espansione.

Anche nel nostro studio, i livelli di metilazione nel promotore di *C9orf72* sono risultati significativamente più alti nei pazienti portatori di espansione rispetto ai non portatori (sia soggetti di controllo che pazienti). È importante sottolineare che l'isola CpG indagata è mappata all'interno del promotore di *C9orf72* e nessun altro gene è strettamente adiacente, pertanto, l'ipermetilazione colpisce probabilmente solo il gene da noi studiato.

Lo studio è limitato al DNA isolato dal sangue, dal momento che il tessuto cerebrale non era disponibile per la nostra coorte clinica di pazienti FTD. Tuttavia, i dati di metilazione ottenuti dal DNA del sangue probabilmente riflettono il grado di metilazione nel tessuto cerebrale, dal momento che in un precedente studio effettuato su pazienti SLA è stata osservata una forte concordanza tra i livelli di metilazione nei diversi tessuti (sangue, corteccia frontale e cervicale midollo spinale) [Xi *et al.*, 2013].

L'analisi combinata sui pazienti FTD e FTD/SLA ha rivelato che l'ipermetilazione è espansione specifica, dal momento che non è stata osservata in nessuno dei 69 non portatori di espansione, a prescindere dal loro stato di malattia (FTD, FTD/SLA o controlli). La dimensione della ripetizione potrebbe essere, però, la spiegazione dei vari livelli di metilazione rilevati nei portatori di espansione. Infatti, una correlazione diretta tra metilazione delle isole CpG ed il numero di ripetizioni è stata osservata nell'ataxia di Friedreich, in cui il grado di metilazione aumentava gradualmente insieme al numero ripetizioni [Greene *et al.*, 2007]. Tuttavia, la valutazione del numero di ripetizione presenti in *C9orf72* è tecnicamente difficoltosa a causa dell'alto contenuto di GC. La Repeat Primed PCR riesce solo in parte a risolvere questa difficoltà permettendo la stima della dimensione esatta solo per espansioni fino a 50 ripetizioni. Risulta quindi probabile che la variabilità dei livelli di metilazione osservata all'interno del gruppo dei pazienti portatori di

espansione correli con l'eterogeneità presente nel gruppo di pazienti analizzati nel numero di ripetizioni. Futuri studi dovranno stabilire se il livello di metilazione rispecchia veramente la dimensione delle ripetizioni. Le differenze in termini di grandezza di espansione e del grado di metilazione potrebbero condizionare le presentazioni cliniche e neuropatologiche altamente eterogenee fino ad oggi osservate.

In conclusione, lo studio ha confermato che l'espansione esanucleotidica in *C9orf72* è la causa genetica più frequente nei pazienti con demenza frontotemporale (circa 6%), sia sporadici che familiari, seguita dalle mutazioni del gene *GRN* (circa 3%) e del gene *MAPT* (circa 0.3%). Oltre a questo, i nostri dati hanno ampliato la conoscenza sullo spettro eterogeneo di fenotipi clinici associati alla variante Cys139Arg della PGRN, rafforzando l'ipotesi di un suo possibile coinvolgimento nella patogenesi della FTD. Inoltre, dato che la variante Cys139Arg non causa alleli nulli o errori nella secrezione della proteina, ma la perdita del peptide GRN F, si ipotizza che oltre all'alterazione dell'attività della proteina PGRN anche l'alterazione dell'attività di uno dei suoi prodotti di scissione possa portare alla neurodegenerazione.

Infine, abbiamo condotto un'indagine epigenetica che ha evidenziato come la presenza di livelli di metilazione anomali nel promotore di *C9orf72* siano espansione-specifici in quanto non sono stati rilevati nei soggetti non portatori di espansione. Inoltre, un più elevato grado di metilazione è risultato correlato con durata della malattia più lunga, anche se non statisticamente significativo, indicando che può essere associato con una minore gravità della malattia. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per ampliare la casistica e convalidare i risultati ottenuti. Questi dati possono essere la base per un futuro approccio diagnostico per la Demenza frontotemporale causata da mutazione nel gene *C9orf72*.

BIBLIOGRAFIA

- Adeli A, Savica R, Lowe VJ, *et al.* The GGGGCC repeat expansion in C9ORF72 in a case with discordant clinical and FDG-PET findings: PET trumps syndrome. *Neurocase* 2014; 20: 110–120.
- Almeida, M. R., Baldeiras, I., Ribeiro, M. H., Santiago, B., Machado, C., Massano, J., *et al.* (2013). Progranulin peripheral levels as a screening tool for the identification of subjects with progranulin mutations in a Portuguese cohort. *Neurodegener. Dis.* 13, 214–223.
- Al-Sarraj S, King A, Troakes C, *et al.* p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta Neuropathol.* 2011; 122: 691–702.
- Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR *et al.* The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science* 2008; 319: 1787–1789.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992; 31: 10626–10633.
- Anfossi M, Bernardi L, Gallo M, *et al.* Tau V363I mutation: pathogenic or not? *Alzheimer's & Dementia* 2008; 4 Supp 2: T603
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, *et al.* TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351(3):602-611
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, *et al.* Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006; 442: 916-919.
- Bateman A and Bennett HPJ. The granulin gene family: from cancer to dementia. *Bioessays* 2009; 31: 1245–1254.
- Beck J, Rohrer JD, Campbell T, *et al.* A distinct clinical, neuropsychological and radiological phenotype is associated with progranulin gene mutations in a large UK series. *Brain* 2008; 131: 706–720.
- Belzil VV, Bauer PO, Gendron TF, *et al.* Characterization of DNA hypermethylation in the cerebellum of c9FTD/ALS patients. *Brain Res* 2014; 1584:15–21
- Belzil VV, Valdmanis PN, Dion PA, *et al.* Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations. *Neurology* 2009; 73: 1176–1179.
- Benussi L, Binetti G, Sina E *et al.* A novel deletion in progranulin gene is associated with FTDP-17 and CBS. *Neurobiology of Aging* 2008; 29: 427-435.
- Bernardi L, Tomaino C, Anfossi M, *et al.* Novel PSEN1 and PGRN mutations in early-onset familial frontotemporal dementia. *Neurobiology of Aging* 2009; 30: 1825-1833.

- Blair IP, Williams KL, Warraich ST, *et al.* FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2010; 81: 639–645
- Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, *et al.* Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain* 2012; 135: 765–783.
- Boeve BF, Tremont-Lukats IW, Waclawik AJ, *et al.* Longitudinal characterization of two siblings with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 associated with the S305N tau mutation. *Brain* 2005; 128: 752–772.
- Borrioni B, Alberici A, Archetti S, *et al.* New insights into biological markers of frontotemporal lobar degeneration spectrum. *Curr Med Chem* 2010; 17 (10): 1002-1009
- Borrioni B, Archetti S, Del Bo, *et al.* TARDBP mutations in frontotemporal lobar degeneration: frequency, clinical features, and disease course. *Rejuvenation Res* 2010; 13: 509–517.
- Borrioni B, Bonvicini C, Alberici A, *et al.* Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Hum. Mutat.* 2009; 30: E974–E983.
- Borrioni B, Brambati SM, Agosti C, *et al.* Evidence of white matter changes on diffusion tensor imaging in frontotemporal dementia. *Arch Neurol.* 2007; 64(2):246-251
- Broustal O, Camuzat A, Guillot-Noël L, *et al.* FUS mutations in frontotemporal lobar degeneration with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Alzheimers Dis.* 2010; 22: 765–769.
- Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S, *et al.* Genetic variability in progranulin contributes to risk for clinically diagnosed Alzheimer disease. *Neurology* 2008; 71: 656-664.
- Brun A, Englund B, Gustafson L, *et al.* Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57:416-418
- Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front. Biosci* 2008; 13:867–878.
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, *et al.* Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 2007; 114 (1): 5-22
- Chen-Plotkin AS, Martinez-Lage M, Sleiman PMA, *et al.* Genetic and clinical features of progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Arch. Neurol.* 2001; 68: 488–497.
- Chiò A, Borghero G, Restagno G, *et al.* Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain* 2012; 135: 784–793.
- Choudhuri S. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicol.Mech. Methods* 2011; 21: 252–274.

- Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, *et al.* Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006; 442:920-924.
- Cruts M, Gijselinck I, Van Langenhove T, *et al.* Current insights into the C9orf72 repeat expansion diseases of the FTLD/ALS spectrum. *Trends Neurosci.* 2013; 36(8):450-459.
- Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum. Mutat.* 2012; 33: 1340–1344.
- Cruts M, Van Broeckhoven C. Loss of progranulin function in frontotemporal lobar degeneration. *Trends Genet.* 2008; 24: 186–194.
- Daniel R, Daniels E, He Z and Bateman A. Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Dev. Dyn* 2003; 227:593–599
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, *et al.* Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245–256.
- Devenney E, Hornberger M, Irish M, *et al.* Frontotemporal dementia associated with the C9ORF72 mutation: a unique clinical profile. *JAMA Neurol.* 2014; 71: 331–339.
- Di Fabio R, Tessa A, Simons EJ, *et al.* Familial frontotemporal dementia with parkinsonism associated with the progranulin c.C1021T (p.Q341X) mutation. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2010; 16: 484–485.
- Dickson DW, Rademakers R, Hutton ML. Progressive supranuclear palsy: pathology and genetics. *Brain Pathol.* 2007; 17: 74–82.
- Doi H, Koyano S, Suzuki Y, *et al.* The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases. *Neurosci. Res.* 2010; 66: 131–133.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res.:* 2007; 5: 981–989.
- Elamin M, Phukan J, Bede P *et al.* Executive dysfunction is a negative prognostic indicator in patients with ALS without dementia. *Neurology* 2011; 76: 1263-1269.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, *et al.* Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat. Neurosci.* 2010; 13: 423–430.
- Finch N, Baker M, Crook R, *et al.* Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain.* 2009; 132(Pt 3):583-591.
- Fontana F, Siva K, Denti MA. A network of RNA and protein interactions in Fronto Temporal Dementia. *Front Mol Neurosci.* 2015; 8: 1-30.
- Frank AR, Wszolek ZK, Jack CR, Boeve BF. Distinctive MRI findings in pallidopontonigral degeneration (PPND). *Neurology* 2007; 68: 620–621

- Froelich S, Basun H, Forsell C, *et al.* Mapping of a disease locus for familial rapidly progressive Frontotemporal dementia to chromosome 17q12-21. *Am J Med Genet.* 1997; 74(4):380-385.
- Galimberti D, Fenoglio C, Serpente M, *et al.* Autosomal dominant frontotemporal lobar degeneration due to the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: late-onset psychotic clinical presentation. *Biol. Psychiatry* 2013; 74: 384–391.
- Gelpi E, van der Zee J, Turon Estrada A, *et al.* TARDBP mutation p.Ile383Val associated with semantic dementia and complex proteinopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2014; 40: 225–230
- Gendron TF, Belzil VV, Zhang YJ *et al.* Mechanisms of toxicity in C9FTLD/ALS. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 359-376.
- Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, *et al.* Invited review: frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2015; 41: 24–46.
- Ghetti B, Spina S, Murrell JR, *et al.* In vivo and postmortem clinicoanatomical correlations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Neurodegener. Dis.* 2008; 5: 215–217.
- Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, *et al.* Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2008; 71: 1235–1239.
- Gijselinck I, Sleegers K, Engelborghs S, *et al.* Neuronal inclusion protein TDP-43 has no primary genetic role in FTD and ALS. *Neurobiol. Aging* 2009; 30: 1329–1331.
- Gijselinck I, Van Langenhove T, van der Zee J, *et al.* A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol.* 2012; 11: 54–65.
- Gijselinck I, Van Mossevelde S, van der Zee J, *et al.* Loss of TBK1 is a frequent cause of frontotemporal dementia in a Belgian cohort. *Neurology.* 2015; 85:2116-2125.
- Gitcho MA, Bigio EH, Mishra M, *et al.* TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 633–645.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, *et al.* Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3: 519–526
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, *et al.* 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: 393–399
- Gokey NG, Srinivasan R, Lopez-Anido C, *et al.* Developmental regulation of microRNA expression in Schwann cells. *Mol. Cell. Biol.* 2012; 32: 558–568.

- Goldman JS, Farmer JM, Wood EM, *et al.* Comparison of family histories in FTLN subtypes and related tauopathies. *Neurology* 2005; 65 (11): 1817–1819
- Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, *et al.* Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011; 76(11):1006-1014
- Greene E, Mahishi L, Entezam A, *et al.* Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 3383–3390
- Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 2004; 338: 17–31.
- Grimmer T, Diehl J, Drzezga A, *et al.* Region-specific decline of cerebral glucose metabolism in patients with frontotemporal dementia: a prospective 18F-FDG-PET study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 18(1):32-36.
- Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012; 354: 3–8.
- Gustafson L. Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type, II: clinical picture and differential diagnosis. *Arch Gerontol Geriatr* 1987; 6: 209-223
- Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. *Trends Mol. Med.* 2010; 16: 7–16.
- Harries LW, Hernandez D, Henley W, *et al.* Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging Cell* 2011; 10: 868-878.
- Hayashi S, Toyoshima Y, Hasegawa M, *et al.* Late-onset frontotemporal dementia with a novel exon 1 (Arg5His) tau gene mutation. *Ann. Neurol.* 2002; 51: 525–530.
- He Z and Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J. Mol. Med.* 2003; 81:600–612.
- Henikoff S, Matzke MA. Exploring and explaining epigenetic effects. *Trends Genet.* 1997; 13: 293–295.
- Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, *et al.* VCP gene analyses in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis identify a new mutation. *Neurobiol. Aging* 2015; 36: e1–e6.
- Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, *et al.* Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* 2004; 56: 399–406
- Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, *et al.* Survival in fronto- temporal dementia. *Neurology* 2003; 61 (3): 349-354
- Hodges JR, Patterson K. Nonfluent progressive aphasia and semantic dementia: a comparative neuropsychological study. *J Int Neuropsychol Soc* 1996; 2: 511–524

- Holm IE, Isaacs AM, Mackenzie IRA. Absence of FUS immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 719–720.
- Hu HY, Guo S, Xi J, *et al.* MicroRNA expression and regulation in human, chimpanzee, and macaque brains. *PLoS Genet.* 2011; 7: e1002327.
- Hu XL, Wang Y, Shen Q. Epigenetic control on cell fate choice in neural stem cells. *Protein Cell* 2012; 3: 278–290.
- Hudson AJ. Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, parkinsonism and other neurological disorders: a review. *Brain* 1981; 104: 217-247.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393: 702–705.
- Ikeda M, Ishikawa T, Tanabe H. Epidemiology of Frontotemporal Lobar Degeneration. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 17: 265-268
- Iskandar BJ, Rizk E, Meier B, *et al.* Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J. Clin. Invest.* 2010; 120: 1603.
- Janssen JC, Warrington EK, Morris HR, *et al.* Clinical features of frontotemporal dementia due to the intronic tau 10(+16) mutation. *Neurology* 2002; 58: 1161–1168.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074–1080.
- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, *et al.* Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 2010; 68: 857–864.
- Josephs KA, Petersen RC, Knopman DS, *et al.* Clinicopathologic analysis of frontotemporal and corticobasal degenerations and PSP. *Neurology* 2006; 66: 41–48.
- Josephs KA. Predicting functional decline in behavioural variant frontotemporal dementia. *Brain* 2011; 134: 432-448
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, *et al.* TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 2008; 40: 572–574.
- Karageorgiou E, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: a clinical approach. *Semin Neurol.* 2014; 34(2):189-201.
- Knibb JA, Xuereb JH, Patterson K, Hodges JR. Clinical and pathological characterization of progressive aphasia. *Ann Neurol* 2006; 59:156–165
- Knopman DS, Roberts RO. Estimating the number of persons with frontotemporal lobar degeneration in the US population. *J Mol Neurosci* 2011; 45 (3): 330-335
- Kovacs GG, Murrell JR, Horvath S, *et al.* TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea. *Mov. Disord.* 2009; 24: 1842–1847.
- Kramer JH, Jurik J, Sha SJ, *et al.* Distinctive neuropsychological patterns in frontotemporal dementia, semantic dementia, and Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol* 2003; 16(4): 211-218.

- Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205–1208.
- Lashley T, Rohrer JD, Bandopadhyay R, *et al.* A comparative clinical, pathological, biochemical and genetic study of fused in sarcoma proteinopathies. *Brain* 2011; 134(Pt 9):2548–2564
- Lashley T, Rohrer JD, Mahoney C, *et al.* A pathogenic progranulin mutation and C9orf72 repeat expansion in a family with frontotemporal dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2014; 40: 502–513.
- Le Ber I, Camuzat A, Hannequin D *et al.* Phenotype variability in progranulin mutation carriers: a clinical, neuropsychological, imaging and genetic study. *Brain* 2008; 131: 732-746
- Le Ber I. Genetics of frontotemporal lobar degeneration: an up-date and diagnosis algorithm. *Rev. Neurol.* 2013; 169: 811–819.
- Lillo P, Garcin B, Hornberger M. Neurobehavioral features in frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology* 2010; 67: 826-830.
- Lisch D. Regulation of transposable elements in maize. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012; 15: 511–516.
- Luty AA, Kwok JB, Thompson EM, *et al.* Pedigree with frontotemporal lobar degeneration--motor neuron disease and Tar DNA binding protein-43 positive neuropathology: genetic linkage to chromosome 9. *BMC Neurol.* 2008; 8:32.
- Mackenzie IR, Arzberger T, Kremmer E, *et al.* Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol.* 2013; 126: 859–879.
- Mackenzie IR, Frick P, Neumann M. The neuropathology associated with repeat expansions in the C9ORF72 gene. *Acta Neuropathol.* 2014; 127: 347–357
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, *et al.* Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of Frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):1-4.
- Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, *et al.* Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol* 2009; 117 (1): 15-18
- Mackenzie IR, Shi J, Shaw CL, *et al.* Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta Neuropathol.* 2006; 112(5):551-559.
- Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, *et al.* Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012; 135: 736–750
- Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 84–90.

- Marmorstein R, Roth SY. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001; 11: 155–161
- Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, *et al.* Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol. Aging* 2010; 31: 2025–2037.
- Mattson MP. Methylation and acetylation in nervous system development and neurodegenerative disorders. *Ageing Res. Rev.* 2003; 2: 329–342.
- McKhann GM, Albert MS, Grossman M, *et al.* Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol* 2001; 58: 1803–1809
- McMillan CT, Russ J, Wood EM, *et al.* C9orf72 promoter hypermethylation is neuroprotective: neuroimaging and neuropathologic evidence. *Neurology* 2015; 84: 1622–1630.
- Mesulam M, Johnson N, Krefft TA, *et al.* Progranulin mutations in primary progressive aphasia. *Arch. Neurol.* 2007; 64:43
- Mesulam MM. Primary Progressive aphasia. *Ann Neurol* 2001; 49: 425-432
- Miller BL, Ikonte C, Ponton M, *et al.* A study of the Lund-Manchester research criteria for frontotemporal dementia: clinical and single-photon emission CT correlations. *Neurology* 1997; 48(4):937-942
- Mitsuyama Y. Presenile dementia with motor neuron disease. *Dementia* 1993; 4:137-142.
- Momeni P, Schymick J, Jain S, *et al.* Analysis of IFT74 as a candidate gene for chromosome 9p-linked ALS-FTD. *BMC Neurol.* 2006; 6: 44.
- Momeni P, Wickremaratchi MM, Bell J, *et al.* Familial early onset frontotemporal dementia caused by a novel S356T MAPT mutation, initially diagnosed as schizophrenia. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2010; 112: 917–920.
- Moreno F, Rabinovici GD, Karydas A, *et al.* A novel mutation P112H in the TARDBP gene associated with frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease and abundant neuritic amyloid plaques. *Acta Neuropathol. Commun.* 2015; 3: 542.
- Morita M, Al-Chalabi A, Andersen PM, *et al.* A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology.* 2006; 66(6): 839-844.
- Munoz DG, Neumann M, Kusaka H, *et al.* FUS pathology in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 617–627
- Munoz DG, Ros R, Fatas M, *et al.* Progressive Nonfluent Aphasia Associated With a New Mutation V363I in Tau Gene. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias* 2007; 22: 294-299
- Murray ME, DeJesus-Hernandez M, Rutherford NJ, *et al.* Clinical and neuropathologic heterogeneity of c9FTD/ALS associated with hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *Acta Neuropathol* 2011; 122(6):673–690

- Nalbandian A, Donkervoort S, Dec E, *et al.* The multiple faces of valosin-containing protein-associated diseases: inclusion body myopathy with paget's disease of bone, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Neurosci.* 2011; 45: 522–531.
- Neary D, Snowden JS, Gustafson L, *et al.* Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51 (6): 1546-1554
- Neumann M, Roeber S, Kretzschmar H, *et al.* Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 605–616.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314 (5796): 130-133
- Nicholson AM, Gass J, Petrucelli L, Rademakers R. Progranulin axis and recent developments in frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimers Res Ther* 2012; 4(1):4.
- Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 2008; 133: 1145–1148.
- Pearson JP, Williams NM, Majounie E, *et al.* Familial frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis and a shared haplotype on chromosome 9p. *J Neurol.* 2011; 258(4):647-655.
- Peelaer H, Klijnsma KY, de Koning I, *et al.* Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *J. Neurol.* 2010; 257:747–753
- Petronis A. Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature.* 2010; 465: 721–727.
- Pick A. Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prag Med Wochenschr* 1892; 17:165–167.
- Pickering-Brown SM, Rollinson S, Plessis Du D, *et al.* Frequency and clinical characteristics of progranulin mutation carriers in the Manchester frontotemporal lobar degeneration cohort: comparison with patients with MAPT and no known mutations. *Brain* 2008; 131: 721–731.
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, *et al.* Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* 1998; 43: 815–825.
- Pottier C, Bieniek KF, Finch N, *et al.* Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta Neuropathol.* 2015; 130:77-92.
- Premi E, Padovani A, Borroni B. Frontotemporal Lobar Degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 724: 114-127.
- Rademakers R, Cruts M, Van Broeckhoven C. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum Mutat* 2004; 24: 277–295.

- Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR. Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurol.* 2012; 8: 423–434.
- Rademakers R, Roeber S, Baker M, *et al.* A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 2009; 132: 2922–2931.
- Rakowicz WP, Hodges JR. Dementia and aphasia in motor neuron disease: an underrecognised association? *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 1998; 65:881-889.
- Ramanan VK, Saykin AJ. Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am J Neurodegener Dis.* 2013; 2(3):145-175.
- Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, *et al.* Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 2011; 134(Pt 9):2456
- Rascovsky K, Rohrer JD, Hodges JR, *et al.* Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* 2011; 134: 2456–2477.
- Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR: The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 2002; 58:1615–1621.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, *et al.* A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALSFTD. *Neuron* 2011; 72: 257–268.
- Roberson ED, Hesse JH, Rose KD, *et al.* Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology* 2005; 65:719–725
- Rohrer JD, Crutch SJ, Warrington EK and Warren JD. Progranulin associated primary progressive aphasia: a distinct phenotype? *Neuropsychologia* 2010 48, 288–297.
- Rohrer JD, Guerreiro R, Vandrovцова J, *et al.* The heritability and genetics of Frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 2009; 73: 1451-1456
- Rohrer JD, Nicholas JM, Cash DM, *et al.* Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the genetic frontotemporal dementia initiative (GENFI) study: a cross-sectional analysis. *Lancet Neurol.* 2015; 14: 253–262.
- Rohrer JD, Paviour D, Vandrovцова J, *et al.* Novel L284R MAPT mutation in a family with an autosomal dominant progressive supranuclear palsy syndrome. *Neurodegener. Dis.* 2011; 8:149–152.
- Rohrer JD, Ridgway GR, Modat M, *et al.* Distinct profiles of brain atrophy in frontotemporal lobar degeneration caused by progranulin and tau mutations. *Neuroimage* 2010; 53: 1070–1076.
- Rohrer JD, Rossor MN and Warren JD. Syndromes of nonfluent primary progressive aphasia: a clinical and neurolinguistic analysis. *Neurology* 2010; 75: 603–610.
- Rollinson S, Snowden JS, Neary D, *et al.* TDP-43 gene analysis in frontotemporal lobar degeneration. *Neurosci. Lett* 2007; 419: 1–4.
- Rosen HJ, Gorno-Tempini ML, Goldman WP, *et al.* Patterns of brain atrophy in frontotemporal dementia and semantic dementia. *Neurology* 2002; 58(2):198-208.

- Rosso SM, Kamphorst W, de Graaf B, *et al.* Familial frontotemporal dementia with ubiquitin-positive inclusions is linked to chromosome 17q21–22. *Brain* 2001; 124:1948–1957.
- Russ J, Liu EY, Wu K, *et al.* Hypermethylation of repeat expanded C9orf72 is a clinical and molecular disease modifier. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 39–52.
- Saint-Aubert L, Sagot C, Wallon D, *et al.* A case of logopenic primary progressive aphasia with C9ORF72 expansion and cortical florbetapir binding. *J. Alzheimers Dis.* 2014; 42: 413–420.
- Schofield EC, Halliday GM, Kwok J, *et al.* Low serum progranulin predicts the presence of mutations: a prospective study. *J. Alzheimers Dis.* 2010; 22: 981–984.
- Schouten M, Buijink MR., Lucassen PJ *et al.* New neurons in aging brains: molecular control by small non-coding RNAs. *Front. Neurosci.* 2012; 6: 25.
- Seelaar H, Rohrer JD, Pijnenburg YA, *et al.* Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2011; 82 (5): 476-486
- Seltman R, Matthews B. Frontotemporal Lobar Degeneration Epidemiology, Pathology, Diagnosis and Management. *CNS drugs* 2012; 26 (10): 841-870
- Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev* 2011; 10: 146-152.
- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, *et al.* Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.* 2005, 37: 806–808.
- Sleegers K, Van Damme P, Engelborghs S, *et al.* Serum biomarker for progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Ann. Neurol.* 2009; 65: 603–609.
- Snowden JS, Neary D, Mann DM: Frontotemporal dementia. *Br J Psychiatry* 2002; 180:140–143
- Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 2013; 12: 609–622.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, *et al.* Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 1998; 95: 7737–7741.
- Stevens M, van Duijn CM, Kamphorst W, *et al.* Familial aggregation in frontotemporal dementia. *Neurology* 1998; 50 (6): 1541-1545
- Strong MJ, Grace GM, Freedman M *et al.* Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 2009; 10: 131-146.
- Sultan FA, Day JJ. Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. *Epigenomics.* 2011; 3(2):157-181.
- Sweatt JD. The emerging field of Neurepigenetics. *Neuron* 2013; 80: 80(3):624-632
- Ticozzi N, Silani V, LeClerc AL, *et al.* Analysis of FUS gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology* 2009; 73: 1180–1185.

- Troakes C, Maekawa S, Wijesekera L, *et al.* An MND/ALS phenotype associated with C9orf72 repeat expansion: abundant p62-positive, TDP-43-negative inclusions in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum but without associated cognitive decline. *Neuropathology* 2012; 32: 505–514.
- van Blitterswijk M, DeJesus-Hernandez M, Niemantsverdriet E, *et al.* Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9ORF72 repeat expansions (Xpansize-72): a cross-sectional cohort study. *Lancet Neurol.* 2013; 12: 978–988.
- Van Deerlin VM, Wood EM, Moore P, *et al.* Clinical, genetic, and pathologic characteristics of patients with frontotemporal dementia and progranulin mutations. *Archives of Neurology* 2007; 64: 1148-1153.
- Van der Zee J, Borroni B, Gijselinck I, *et al.* A Pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTLD: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Hum. Mutat.* 2013; 34: 363–373
- Van der Zee J, Pirici D, Van Langenhove T, *et al.* Clinical heterogeneity in 3 unrelated families linked to VCP p.Arg159His. *Neurology* 2009; 73: 626–632.
- Van Swieten J, Spillantini MG. Hereditary frontotemporal dementia caused by tau gene mutations. *Brain Pathol.* 2007; 17: 63–73.
- Van Swieten JC and Heutink P. Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 2008; 7: 965–974.
- Van Swieten JC, Stevens M, Rosso SM, *et al.* Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations. *Ann. Neurol.* 1999; 46: 617–626
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, *et al.* Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009; 323: 1208–1211.
- Wade-Martins R. Genetics: The MAPT locus-a genetic paradigm in disease susceptibility. *Nature Reviews Neurology* 2012; 8:477-478
- Wang J, Van Damme P, Cruchaga C, *et al.* Pathogenic cysteine mutations affect progranulin function and production of mature granulins. *J Neurochem* 2010; 112: 1305-1315.
- Wang J, Yu JT, Tan MS, *et al.* Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Ageing Res. Rev.* 2013; 12: 1024–1041
- Wang Q, Song C, and Li C-C H. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J. Struct. Biol.* 2004; 146: 44–57.
- Watts GDJ, Wymer J, Kovach MJ, *et al.* Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* 2004; 36: 377–381.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004; 7: 847–854

- Weihl CC. Valosin-containing protein associated fronto- temporal lobar degeneration: clinical presentation, pathologic features and pathogenesis. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8(3):252–260
- Whitwell JL, Avula R, Senjem ML, *et al.* Gray and white matter water diffusion in the syndromic variants of Frontotemporal dementia. *Neurology* 2010; 74(16):1279-1287.
- Whitwell JL, Jack CR, Boeve BF, *et al.* Voxel-based morphometry patterns of atrophy in FTLD with mutations in MAPT or PGRN. *Neurology* 2009; 72: 813–820.
- Womack KB, Diaz-Arrastia R, Aizenstein HJ, *et al.* Temporoparietal hypometabolism in frontotemporal lobar degeneration and associated imaging diagnostic errors. *Arch Neurol* 2011; 68:329–337.
- Xi Z, Zinman L, Moreno D, *et al.* Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72expansion. *Am J Hum Genet* 2013; 92:981–989.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; 26: 5541–5552.
- Yamanaka K, Sasagawa Y and Ogura T. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1823: 130–137.
- Yan J, Deng HX, Siddique N, Fecto F, *et al.* Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology* 2010; 75: 807–814.
- Yu C-E, Bird TD, Bekris LM, *et al.* The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration. *Arch. Neurol.* 2010; 6: 161–170.
- Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100: 9779–9784.
- Ziller MJ, Gu H, Muller F, *et al.* Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 2013; 500: 477–481.