



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Franca Deriu

INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE

Responsabile di Indirizzo: Prof. Maria Speranza Desole

XXVI CICLO

**STUDIO ARCHIVISTICO GENEALOGICO DI UNA
FAMIGLIA PORTATRICE DI UNA NUOVA MUTAZIONE DEL
GENE PSEN2 (A85V)**

Direttore:

Prof. Franca Deriu

Tutor:

Dott.ssa Maria Rita Piras

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Federica Cappelli

Anno Accademico 2012 - 2013

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2010/2011 – XXVI ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

INDICE

	<i>pag</i>
1. INTRODUZIONE	1
1.1. La malattia di Alzheimer (AD)	1
1.2. Segni clinici e diagnosi	2
1.3. Diagnosi precoce della malattia	4
1.4. Etiopatologia dell'AD	8
1.5. Biologia della proteina β -amiloide	12
1.5.1. Neuropatogenesi	17
1.5.2. Ruolo delle Preseniline	18
1.5.3. Ruolo della proteina tau	22
1.5.4. Ruolo dell'infiammazione	23
1.5.5. Ruolo dello stress ossidativo	23
1.5.6. Aspetti biochimici	34
1.6. Genetica dell'AD	35
1.6.1. AD familiare (FAD)	35
1.6.2. AD Sporadico (SAD)	38
2. SCOPO DELLA TESI	46
3. MATERIALI E METODI	46
3.1. L'archivio storico come fonte per la ricerca neurogenetica	46
3.2. Metodologia	48
3.3. Valutazione dello stato clinico	49
3.4. Informatizzazione dei dati e programmi di verifica	50
3.5. Dal pedigree alla popolazione fondatrice	51
3.6. Genetica delle demenze in Sardegna	51
3.7. Studio genetico	53

3.8. Descrizione della famiglia PSEN2 A85V	56
3.9. Casi Clinici.....	58
4. RISULTATI.....	74
4.1. Ricostruzione genealogica della famiglia	74
4.2. Albero genealogico della famiglia	75
4.3. Valutazione dello stato clinico.....	77
4.3.1. Il Comune di Ploaghe.....	78
4.3.2. Archivio di Stato di Sassari	87
5. RIASSUNTO.....	90
6. BIBLIOGRAFIA.....	91

1. INTRODUZIONE

1.1 La malattia di Alzheimer (AD)

La malattia di Alzheimer è una sindrome a decorso cronico e progressivo che colpisce circa il 5% della popolazione al di sopra dei 65 anni. Rappresenta la causa più comune di demenza nella popolazione anziana dei paesi occidentali. Il rischio di contrarre la malattia aumenta con l'età: si stima che circa il 20% della popolazione ultra ottantacinquenne ne sia affetta. Non si tratta tuttavia di una malattia che colpisce i soli anziani, esistono infatti casi sporadici di persone che possono presentare un esordio precoce della malattia prima della quinta decade di vita.

Questa malattia prende il nome dal neurologo tedesco Alois Alzheimer (Figura 1) che nel 1907 ne descrisse per primo le caratteristiche. Il tessuto cerebrale dei soggetti da lui osservati presentava riduzione delle cellule nervose e placche senili visibili anche a occhio nudo. Successivamente, con l'utilizzo di procedure di osservazione microscopica con colorazioni chimiche, evidenziò su porzioni predefinite di cervello la presenza di ammassi proteici non degradabili e solubili che compromettono la funzionalità cerebrale. La malattia evolve quindi attraverso un processo degenerativo che distrugge lentamente e progressivamente le cellule cerebrali e provoca un deterioramento irreversibile di tutte le funzioni cognitive superiori, come la memoria, il ragionamento e il linguaggio, fino a compromettere l'autonomia funzionale e la capacità di compiere le normali attività quotidiane. L'inizio è generalmente insidioso e

graduale e il decorso lento, con una durata media di 8-10 anni dalla comparsa dei sintomi.



Figura 1. Alois Alzheimer (1864-1915).

1.2 Segni clinici e diagnosi

I segni clinici, a differenza dei sintomi che sono riferiti dal familiare o dal paziente, riguardano tutti quegli elementi che vengono rilevati dal medico mediante la visita clinica.

Malattia di Alzheimer probabile:

-Demenza stabilita dall'esame clinico e documentata da scale di valutazione che indagano alcuni aspetti del comportamento (come la Dementia Blessed Scale oppure da punteggi medio bassi a test atti a misurare la presenza di decadimento cognitivo, come il Mini Mental State Examination (MMSE) o da esami simili e con la conferma di tali risultati deficitari ad altri test neuropsicologici (*McKhann G. et al, Neurology 1984;34:939-44*).

-Deficit di 2 o più aree cognitive quali, ad esempio, il linguaggio, il ragionamento, la capacità di giudizio eccetera...

-Peggioramento progressivo della memoria e di altre funzioni cognitive.

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

- Assenza di disturbi di coscienza.
- Esordio tra i 40 e i 90 anni, più spesso dopo i 65.
- Assenza di patologie sistemiche o di altre malattie cerebrali responsabili di deficit cognitivi e amnesici di tipo progressivo.

La diagnosi di AD probabile è supportata da:

- Deterioramento progressivo di funzioni cognitive specifiche quali il linguaggio (afasia), la gestualità (aprassia), la percezione (agnosia).
- Compromissione delle attività quotidiane ed alterate caratteristiche di comportamento.
- Familiarità positiva per analoghi disturbi, soprattutto se confermati neuropatologicamente.

La diagnosi di Alzheimer probabile è supportata da risultati nella norma a test strumentali ed esami di laboratorio quali, ad esempio: tracciato EEG normale e/o con aumento aspecifico dell'attività cerebrale lenta, atrofia cerebrale visibile attraverso una TAC e che peggiora visibilmente quando si effettuano ulteriori esami a distanza di tempo l'uno dall'altro, assenza di infezioni nel liquor cerebrospinale. Altre caratteristiche cliniche compatibili con la diagnosi di AD probabile, dopo aver escluso cause alternative di demenza:

- Plateau nella progressione della malattia.
- Sintomi associati quali depressione, insonnia, disturbi di personalità, incontinenza sfinterica, reazioni verbali emotive o fisiche di tipo catastrofico.
- Disturbi sessuali, calo ponderale.
- Altre anomalie neurologiche soprattutto nei casi con malattia in fase avanzata, comprendenti segni motori quali ipertono, mioclonie, disturbi della marcia.

-Crisi epilettiche in fase avanzata di malattia.

-TAC normale per l'età.

Caratteristiche che rendono la diagnosi di AD probabile incerta:

-Inizio improvviso ed eclatante dei disturbi cognitivi: già in una fase precoce della malattia sono presenti segni neurologici focali come, ad esempio, emiparesi, emianestesia, emianopsia, disturbi del cammino all'esordio o in fase iniziale.

-Disturbi della marcia all'esordio o in fase iniziale.

Malattia di Alzheimer possibile:

-Presenza di sintomi tipici della demenza senza che vi siano altri disturbi neurologici, psichiatrici o sistemici (ad esempio malattia di Parkinson, schizofrenia, idrocefalia...) che possano causare demenza e in presenza di variazioni nell'esordio, nella presentazione o nel decorso clinico. Presenza di una patologia neurologica o sistemica concomitante sufficiente a produrre demenza, ma non considerata la vera causa della demenza.

Malattia di Alzheimer certa:

-Presenza dei criteri clinici per la diagnosi di AD probabile e presenza di aggregati di proteina tau e beta amiloide nel cervello insolubili e visibili solo mediante un'autopsia.

1.3 Diagnosi precoce della malattia

La diagnosi di AD precoce non è più così difficile come in passato.

Diversi studi mostrano che è causata dall'accumulo nel cervello di una

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

peptide che diviene neurotossico se prodotto in eccessive quantità , il beta amiloide, l'accumulo del peptide a livello cerebrale avviene decine di anni prima dei tipici disturbi di memoria che nel giro di pochi anni portano a gravi difficoltà nelle usuali attività della vita fino alla totale perdita dell'autosufficienza (Figura 2).

Il riconoscimento e la diagnosi della malattia quando i sintomi e la disabilità sono già manifesti non presenta particolari difficoltà diagnostiche.

Oggi, tuttavia, anche quando il disturbo di memoria è lievissimo e non disabilitante, è possibile riconoscere quando un cervello sta accumulando beta amiloide (Figura 3) e porre diagnosi di malattia di Alzheimer in fase precocissima.

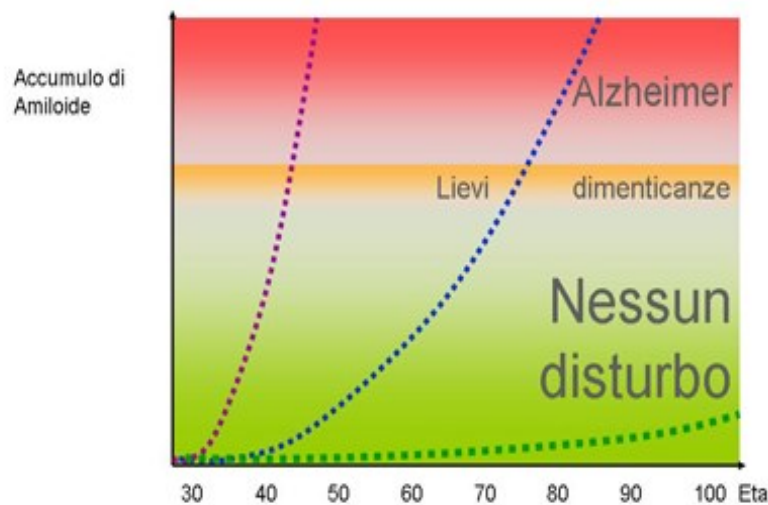


Figura 2. Relazione tra l'accumulo del peptide beta amiloide e comparsa dei sintomi.

DIFFICOLTA' DELLA DIAGNOSI DI ALZHEIMER

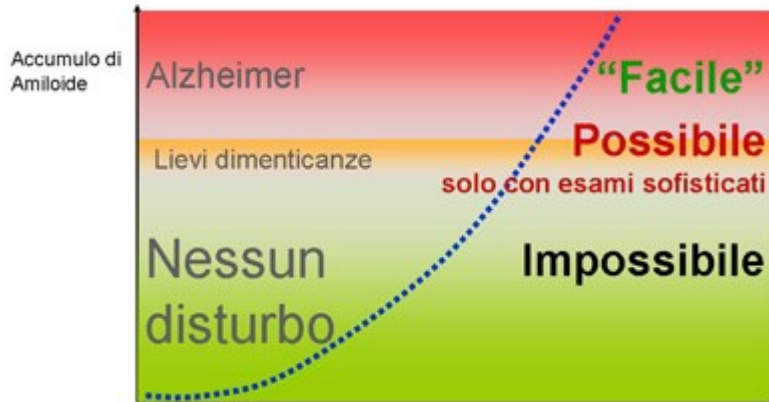


Figura 3. Relazione tra l'accumulo del peptide beta amiloide e difficoltà della diagnosi.

Recentemente si è scoperto che l'uso combinato della valutazione neuropsicologica e dello studio della struttura, del metabolismo e della biochimica del cervello, appare oggi in grado di documentare la presenza della malattia di Alzheimer con elevata sensibilità e specificità, anche in assenza di una franca demenza [1], quando il paziente è ancora autosufficiente ed ha una buona qualità di vita. Si rendono quindi necessari esami sofisticati quali la Risonanza Magnetica ad alta definizione, la Tomografia a Emissione di Positroni (PET) con Fluorodesossiglucosio (per valutare marcatori biologici della malattia di Alzheimer quali le aree temporo-mesiali e la capacità di metabolizzare il glucosio di aree interessate dalla neuro degenerazione), e una rachicentesi (puntura lombare) con dosaggio

liquorale di beta amiloide e proteina tau per valutare i marcatori biochimici della malattia di Alzheimer (Figura 4).

La diagnosi precoce è preliminare a interventi farmacologici con farmaci attivi sull'acetilcolina volti a mantenere integre le funzioni cognitive per un periodo di tempo fino ad un anno superiore a quanto accadrebbe lasciando il malato a sé stesso, a ritardare l'esordio della disabilità e a permettere l'utilizzo dei nuovissimi farmaci anti-amiloide.

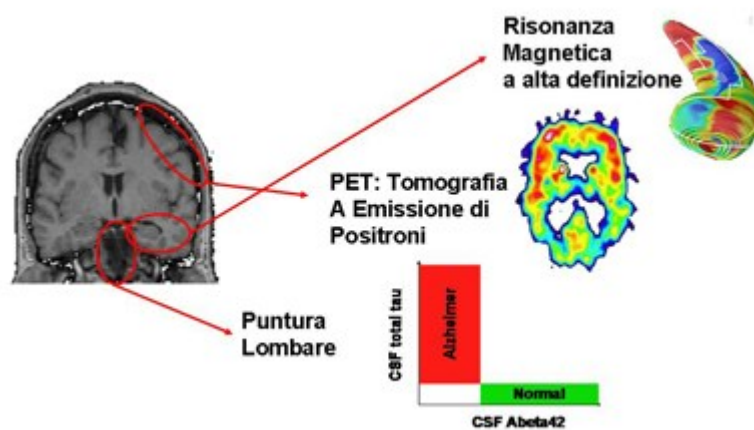


Figura 4. Marcatori dell'AD che consentono la diagnosi precoce della malattia.

1.4 Eziopatologia dell'AD

La maggior parte dei casi di AD sono sporadici. Solo raramente la malattia di Alzheimer è causata da un gene alterato che ne determina la trasmissione da una generazione all'altra. La causa sia dei casi sporadici che di quelli familiari pare risiedere in un'alterazione del metabolismo di una proteina, detta APP (proteina precursore di beta amiloide) che viene metabolizzata in modo alterato, portando all'eccessiva formazione di una sostanza che in elevata concentrazione diviene neurotossica (appunto la beta amiloide) che si accumula lentamente nel cervello portando a morte neuronale progressiva.

Generalmente, le forme ereditarie hanno un'alta penetranza. Inoltre, la maggior parte delle forme ereditarie esordiscono in età relativamente giovanile (prima dei 65-70 anni) e l'età di esordio dei primi disturbi è relativamente stabile all'interno della stessa famiglia. Maggiore è il numero di persone affette nella stessa famiglia e maggiore è la probabilità che la malattia abbia una causa ereditaria, così come più l'età all'esordio è giovanile e maggiore è la probabilità.

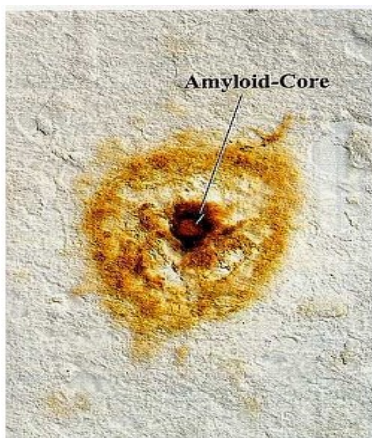
Esistono inoltre fattori ambientali che possono giocare un ruolo importante, come ad esempio, traumi o esposizione a sostanze tossiche (alluminio, idrocarburi aromatici). Il fattore di rischio più rilevante è l'età: come ampiamente dimostrato da numerosi studi, l'incidenza e la prevalenza di questa malattia aumenta marcatamente con l'età.

Un alto grado di istruzione e un'occupazione che richieda un elevato livello di attività cognitiva sembra avere un effetto protettivo sull'insorgenza della demenza, in quanto aumenta l'efficienza dei

circuiti neuronali e la cosiddetta brain reserve, ossia la capacità del cervello di attivare al bisogno circuiti neuronali alternativi. Va però sottolineato che anche persone che non abbiano un livello culturale o occupazionale elevato hanno le medesime possibilità di proteggere la propria efficienza intellettuale mantenendosi mentalmente attivi attraverso attività che tengano il cervello in esercizio e stimolino le capacità cognitive superiori.

La malattia di Alzheimer si caratterizza principalmente per la presenza nel cervello di minuscole ma numerosissime placche di beta amiloide e matasse neurofibrillari di proteina tau iperfosforilata.

1. **Le placche** sono ammassi di sottili filamenti (7-10 nm) che si formano nello spazio extracellulare nel cervello dei malati di



Alzheimer. Sono costituite da un frammento insolubile (β -pieghettato) di una normale proteina transmembranaria del neurone (proteina precursore dell'amiloide, APP) e possono avere un nucleo denso centrale. , hanno inoltre una varietà di determinanti molecolari che

comprendono l'ApoE, l'alfa-Antichimotripsina, glicosaminoglicansolfati e fattori del complemento.

2. **Gli aggregati neurofibrillari** si trovano all'interno dei neuroni e derivano da un'altra proteina (Proteina Tau, Figura 5) che, se fosforilata in maniera anomala, si accumula nel citoplasma e distrugge il neurone innescando un processo infiammatorio.

Particolarmente colpiti dagli aggregati sono i neuroni colinergici, specialmente quelli delle aree corticali e sottocorticali dell'ippocampo.

Entrambe queste sostanze iniziano a danneggiare i neuroni già molti anni prima che compaiano i disturbi di memoria.

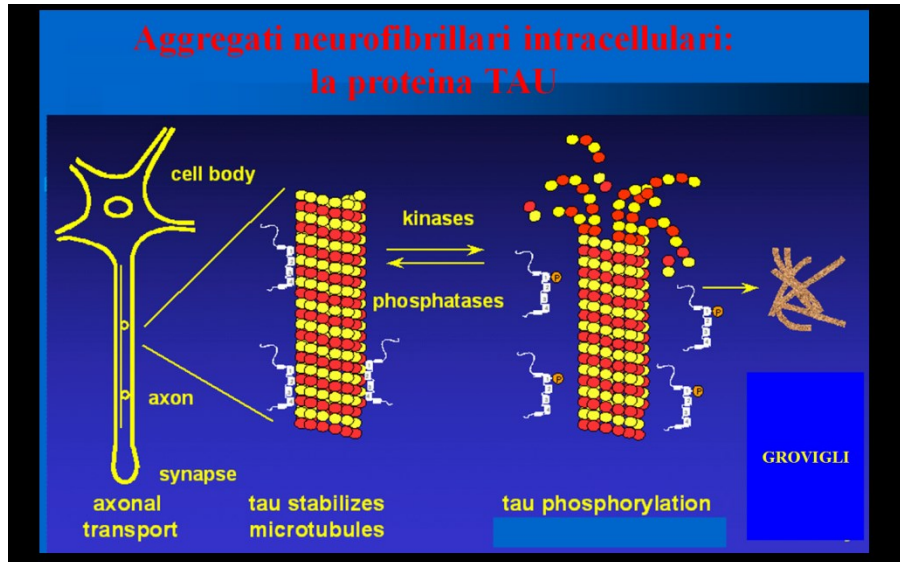


Figura 5. Aggregati neuro fibrillari intracellulari.

Oltre agli aggregati neuro fibrillari esistono altri tipi di inclusioni citoplasmatiche quali i corpi di Lewy e i corpi di Pick che si differenziano tra loro sia per la morfologia che per i determinati antigenici.

I corpi di Lewy sono inclusioni citoplasmatiche ialine concentriche. L'alfa-Sinucleina è il maggior componente filamentoso e sono presenti anche Ubiquitina e Tau. Si ritrovano caratteristicamente nella corteccia di pazienti con Malattia a Corpi di Lewy diffusi e nel tronco encefalico dei pazienti affetti da Malattia di Parkinson, in particolare nella substantia nigra, costituendo l'elemento neuropatologico fondamentale di entrambe le patologie. Si riscontrano frequentemente nella substantia nigra e nell'amigdala di pazienti con diagnosi autoptica di Malattia di Alzheimer in circa il 60% dei casi ed in

particolare nelle forme familiari. I corpi di Lewy possono essere riscontrati anche in altre Tauopatie come nella PSP e nel 10% dei pazienti con diagnosi di Atrofia Multisistemica.

I corpi di Pick sono delle inclusioni intracitoplasmatiche, rotondegianti composte da aggregati filamentosi. Alla immunohistochimica sono positive per la proteina Tau ma anche per l'Ubiquitina e la Cromogranina A. Si riscontrano in circa il 30% delle Demenze Fronto-Temporalis che vengono definite dalla presenza o dall'assenza di inclusioni cellulari Tau-positive o Ubiquitino-positive. Infine, molte delle lesioni neuropatologiche caratteristiche delle malattie neurodegenerative si presentano nel cervello di soggetti con invecchiamento normale. Per esempio l'accumulo di beta amiloide può avversi nel cervello di soggetti anziani normali e di conseguenza può ritrovarsi in soggetti anziani affetti da varie forme di demenza oltre che dall'AD, per esempio nel PD, DLB e nella Malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD). Allo stesso modo altre lesioni come i grovigli neurofibrillari, i corpi di Lewy e i corpi di Pick possono ritrovarsi in un piccolo numero di vecchi, determinando un incremento della difficoltà nel distinguere le diverse forme neuropatologiche di demenza. Al riguardo l'applicazione dei criteri diagnostici dovrebbe essere in grado di distinguere un autentico overlap da alterazioni neuropatologiche legate all'età.

1.5 Biologia della proteina β -amiloide ($A\beta$)

La proteina $A\beta$ deriva dal suo precursore APP a seguito di tagli sequenziali da parte di diversi enzimi. Il termine APP comprende un gruppo eterogeneo di polipeptidi espressi ubiquitariamente nell'organismo, eterogenei sia per la presenza di diverse isoforme (le tre maggiormente rappresentate di 695, 751 e 770 residui) sia per modificazioni post-traduzionali, tra cui glicosilazioni, solfatazioni e fosforilazioni [2,3,4,5,]. Le isoforme contenenti 751 e 770 residui sono largamente espresse sia dalle cellule non neuronali che da quelle neuronali, invece l'isoforma contenente 695 residui è espressa in maggiore quantità dai neuroni [6]. La differenza tra le isoforme 770/751 e 695 consiste nella presenza nelle prime due di un esone codificante un enzima inibitore della serina proteasi (KPI); nelle piastrine umane le isoforme contenenti il dominio KPI hanno la funzione di inibitori del fattore XIa, serina proteasi, implicata nella cascata della coagulazione [7]. La APP è una proteina a singolo dominio transmembrana traslocata in sede tradizionale nel reticolo endoplasmico; sia durante che dopo il transito nella via secretoria può andare incontro a tagli sequenziali con la produzione di derivati secreti nel lume vescicolare o nello spazio extracellulare. Il taglio proteolitico operato dalla α -secretasi[8] porta al rilascio di un grosso frammento solubile (α -APPs) nello spazio extracellulare (o nel lume); residua un frammento transmembranario di 83 residui aminoacidici (C83)[9]. Alternativamente la APP può essere scissa da una β -secretasi, che taglia un frammento solubile di dimensioni ridotte rispetto a quello

generato dalla α -secretasi, residuando un frammento transmembranario di 99 residui (C99)[10]. L'enzima che opera l'attività β -secretasica è stato identificato e denominato BACE [11]. L'attività del BACE risulta essere ottimale a pH acido e l'enzima preferenzialmente è attivo all'interno degli endosomi. Per rispondere a questo requisito è necessario che la APP sia trasportata dalla superficie all'interno della cellula[12]. Il prodotto del BACE può essere in seguito rasferito sulla superficie cellulare dove diventa substrato per la γ -secretasi[13]. L'azione della γ -secretasi sui frammenti transmembranari residuati dall'azione della α e β -secretasi porta al taglio e secrezione di due frammenti proteici: rispettivamente p3 [14] e A β . Il peptide p3 non si trova generalmente nel "core" delle placche di amiloide, ma va soprattutto ad accumularsi in depositi di amiloide in aree selezionate del cervello di pazienti AD[15]. Il peptide A β (che esiste in due isoforme: A β [1-40] e A β [1-42]) è costitutivamente prodotto e rilasciato dalle cellule in condizioni di normalità[10,14], ed è misurabile nel liquido cefalorachidiano (CSF) e nel plasma di soggetti normali durante tutta la vita. Non è ancora precisamente determinato in quale punto della catena sintetica dell'APP avvenga il taglio enzimatico operato dalla α , β o γ -secretasi; una consistente parte della α -APPs può essere generata dall'azione dell' α -secretasi sulla APP inserita nella membrana plasmatica [16], ma può essere generata anche durante la catena sintetica intracellulare della APP [17]. L'azione della β -secretasi può avvenire, almeno in parte, durante le ultime fasi dei processi sintetici post-traduzionali [14] i siti in cui è operato il taglio dei frammenti C99 e C83 da parte della

γ -secretasi sono ancora oggetto di studio. Sembra che i frammenti A β [1-40] e A β [1-42] siano generati in percentuale considerevole durante l'internalizzazione e la processazione endosomiale dell'APP[12]. Vi sono dati contraddittori sul principale sito di produzione della forma A β [1-42], se durante le prime fasi della catena sintetica intracellulare (cioè il reticolo endoplasmatico, il compartimento intermedio e le prime fasi del Golgi) oppure dopo che la APP abbia raggiunto la superficie cellulare. Alcune evidenze suggeriscono che i peptidi di A β generati precocemente durante le fasi intracellulari non siano destinati alla secrezione e vengano catabolizzati all'interno della cellula[18]. Tuttavia è probabile che la maggior parte dei peptidi di A β siano invece destinati alla via secretoria. I livelli di A β nel CSF umano sono compresi nell'intervallo 3–8 Nm[50], mentre la quantità plasmatica è generalmente minore di 500 pM. Sia la forma A β [1-40] che A β [1-42] possono essere identificate nel CSF e nel plasma. È stato dimostrato che i frammenti C99 e C83 (substrati della γ -secretasi) originano da molecole di APP completamente glicosilate[14], suggerendo che l'attività α , β e γ -secretasica avvenga principalmente sulla superficie cellulare o in prossimità di essa, probabilmente in gran parte durante il ricircolo endosomiale[12]. Nella cellula neuronale, che esprime livelli di APP tra i più alti dell'intero organismo (soprattutto APP695), la molecola APP può essere trasportata lungo l'assone sia in senso anterogrado (nella componente veloce del trasporto assonale)[20], sia in senso retrogrado verso il corpo cellulare e essere quindi traslocata sulla superficie somatodendritica[21]. La APP è presente in vescicole nei

terminali assonali, anche se non specificamente nelle vescicole sinaptiche. Nonostante sia stato ipotizzato che il terminale assonale sia uno dei siti principali di produzione della A β , non esistono ancora prove definitive al riguardo, essendo tutt'altro che remota la possibilità che la produzione di A β avvenga durante il ricircolo endosomiale in altri siti neuronali. Inoltre, nonostante il neurone esprima abbondantemente la APP e sia in grado di secernere A β in notevole quantità[14], anche altri stipiti cellulari nel tessuto cerebrale esprimono quantità variabili di APP (astrociti, microglia, cellule endoteliali e muscolari lisce) e potrebbero contribuire al processo di secrezione e deposizione della A β . Inoltre, poiché in periferia praticamente tutte le cellule esprimono APP e sono in grado di generare la A β , ed essendo la A β presente nel plasma, non è da escludere la possibilità che quest'ultima sia in grado di superare la barriera ematoencefalica e depositarsi nel tessuto cerebrale. Vi sono evidenze della capacità della A β di superare in piccola quantità la barriera ematoencefalica mediante un meccanismo di endocitosi mediato da recettori[22]. Della A β è stata provata una neurotossicità sia diretta che, soprattutto, indiretta, mediata da numerosi agenti infiammatori dopo attivazione della microglia.

Sono state proposte numerose funzioni per la famiglia di proteine della APP (APP Like proteins: APPLPs) e dei suoi derivati principali (α -APPs): in particolare α -APPs sembra avere proprietà autocrine[23] ed essere in grado di agire come fattore neuroprotettivo e probabilmente anche neurotrofico[24]. Le isoforme di APP con 751 e 770 residui (contenenti il dominio KPI-inibitore della serina proteasi)

[25] sono in grado, negli studi in vitro, di inibire enzimi con proprietà serina proteasiche come la tripsina e la chimo tripsina[26]; inoltre inibiscono il fattore IXa nella cascata coagulativa. Le isoforme secrete di APP possono conferire proprietà adesive cellula - cellula e cellula - substrato in coltura[27]. È stato suggerito sulla base dei risultati di studi in vitro che la APP inserita nella membrana plasmatica possa avere un ruolo nelle interazioni cellulari. Non vi sono evidenze che nei soggetti affetti da AD vi sia una perdita di funzione della APP, viceversa sembra più probabile che mutazioni conferiscano alla APP proprietà tossiche, incrementando la produzione del frammento A β , potenzialmente citotossico.

Probabilmente l'accumulo di amiloide è solo il punto di confluenza cui giungono vie patogenetiche diverse. Molte ipotesi sono state formulate: alcune propendono per un'eccessiva produzione di A β , altre per un ridotto catabolismo del precursore che provocherebbe la formazione e l'accumulo di molecole con la spontanea tendenza ad aggregarsi (per ridotta attività degli enzimi del catabolismo o a causa di mutazioni della APP che ne ostacolano il metabolismo). Secondo alcuni autori [28] nei soggetti sani la forma A β [1-42] non si accumulerebbe grazie ad una più rapida clearance. La glicazione della molecola di A β può facilitarne l'aggregazione rendendola più resistente alle proteasi e meno solubile[29]. Anche le mutazioni genetiche identificate non sono dirimenti, in quanto, fatta eccezione per quelle riguardanti il gene per APP sul cromosoma 21 che deporrebbero per un problema qualitativo o quantitativo dell'APP, le altre sembrano essere associate ad un'APP normale.

Studi di genetica molecolare relativi all' APP in forme di AD familiare hanno permesso di dimostrare che qualunque mutazione presente nel gene va ad aumentare la tendenza di A β ad aggregare in vitro[30]. Invece studi molto recenti, condotti su topi transgenici Tg2576 (che esprimono la proteina APP mutata e rappresentano il modello murino dell'AD), hanno messo in evidenza che deficit cognitivi significativi nell'AD sono attribuibili direttamente ad una forma di A β secreta naturalmente[31]. L'ipotesi che questa forma di amiloide solubile possa essere importante nella fase di esordio della patologia è attualmente presa in esame da parecchi gruppi[32]. Inoltre in una recente analisi condotta da Postina e colleghi, usando topi transgenici, è stato dimostrato che l' attivazione dell' α -secretasi potrebbe costituire un'idonea opportunità terapeutica che potrebbe ostacolare l'accumulo di A β a livello cerebrale[33]. Infatti dall'azione dell' α - secretasi sull'APP viene liberato un frammento solubile N-terminale (APPsa), che ha proprietà neurotrofiche e neuro protettive[34]. Risulta interessante evidenziare il fatto che è stata sottolineata una evidente riduzione di APPsa nel liquido cerebrospinale di pazienti AD[35].

1.5.1 Neuropatogenesi

La Malattia di Alzheimer è sicuramente una patologia eterogenea dal punto di vista eziopatogenetico e numerosi fattori concorrono al suo

sviluppo. Tra questi fattori le alterazioni anatomopatologiche così come il danno infiammatorio giocano sicuramente un ruolo importantissimo[36].

1.5.2 Ruolo delle Preseniline

Negli anni '90, mediante studi di linkage, sono stati identificati due geni denominati PSEN1 e PSEN2, le cui mutazioni sono causali delle forme familiari di AD ad esordio precoce, caratterizzate da una trasmissione autosomica dominante. Fino ad oggi sono state identificate 185 mutazioni in 405 per la PSEN1 e 13 mutazioni in 22 famiglie per PSEN2 (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>); tutte mostrano un elevato grado di penetranza e sono state trovate in soggetti che presentano sintomi in età precoce (<< 65 anni). PSEN1 e PSEN2 sono localizzati rispettivamente sul cromosoma 14 (14q42.2) e sul cromosoma 1 (1q42.2); in particolare, PSEN2 è stata identificata per l'elevata omologia (67%) con PSEN1[67]. PSEN1 e PSEN2 codificano per due proteine integrali di membrana formate rispettivamente da 467 e 448 aminoacidi. La loro struttura tridimensionale è costituita da 6 a 9 possibili domini transmembranosi (TM) e da un largo loop idrofilico intracellulare tra il sesto (TM-VI) e il settimo (TM-VII) dominio transmembrana; le estremità N- e C-terminale della proteina sono entrambe rivolte verso l'ambiente citoplasmatico [37]. Ancora oggi non si è riusciti a risolvere completamente la struttura delle preseniline. PSEN1 e

PSEN2 sono proteine espresse in maniera ubiquitaria all'interno dell'organismo; in base ad un meccanismo tessuto-specifico possono differenziare la loro struttura, tramite modificazioni post-trascrizionali e splicing alternativi. La principale forma in cui le preseniline si trovano a livello cellulare e tissutale sembra essere quella frammentata. Infatti, in forma di oloproteina, la presenilina (del peso di circa 44 kDa) va incontro costitutivamente ad endoproteolisi in una sua regione ad α -elica citoplasmatica, in molti tessuti tra cui anche il cervello, generando due frammenti: uno più grande N-terminale e l'altro più piccolo C-terminale, che insieme formano la proteina funzionale. Gli eterodimeri stabili risultanti, svolgono un ruolo chiave nella modulazione del Ca^{2+} intracellulare necessario per il rilascio dei neurotrasmettitori presinaptici [38]. Inoltre, i livelli medi dei frammenti N- e C-terminali sembrano essere rigidamente controllati anche in caso di aumentata espressione del gene PSEN1 in topi transgenici o in cellule transfettate, infatti la loro quantità non varia significativamente ed il loro eccesso è rapidamente rimosso, soprattutto dai proteosomi [39,40].

Studi effettuati su topi knock-out hanno portato a riconoscere alle preseniline diverse funzioni cellulari. Il primo ruolo è implicato nella segnalazione cellulare mediata da Notch, il quale è un fattore coinvolto nello sviluppo embrionale, nel differenziamento neuronale, nella miogenesi, nella ematopoiesi e nella differenziazione delle cellule T immunitarie. Si è valutato che la crescita di embrioni deficienti in PSEN1 è severamente ritardata rispetto agli embrioni wt. In contrasto gli embrioni knock-out per PSEN2 sono vitali, fertili e sviluppano solo delle moderate fibrosi polmonari ed emorragie con

l'aumentare dell'età. Sebbene le funzioni e le disfunzioni della PSEN1 siano state ben studiate, poco si sa ancora sul suo omologo PSEN2 in vivo; quello è certo è che, seppur in misura minore, anche quest'ultimo è associata allo sviluppo embrionale dei mammiferi mediato da Notch [41]. Il secondo ruolo risiede nel fatto che, sebbene in piccola quantità, le preseniline entrano a far parte di complessi molecolari localizzati in corrispondenza della superficie cellulare, in associazione alla nicastrina [42] e a proteine della famiglia delle caderine [43], entrambe implicate nella adesione cellulare. In particolare la nicastrina è una proteina transmembrana, contenente siti di glicosilazione multipli, che è stata copurificata con le preseniline, poiché è implicata nel loro trasporto dal reticolo endoplasmatico alla superficie cellulare, dove può modulare l'attività del complesso della γ -secretasi.

Il terzo ruolo è associato al processamento dell'APP [44,45]. Utilizzando neuroni ottenuti da topi knock-out si è dimostrato che la PSEN1 costituisce una parte essenziale dell'attività proteolitica della γ -secretasi che taglia il precursore dell'amiloide. Infatti, mutazioni puntiformi sono associate ad un aumento selettivo del peptide A β (1-42), tossico per la cellula. Al contrario, in topi knock-out per la PSEN2, l'assenza sembra non provocare variazioni evidenti nel processamento dell'APP. Questi risultati indicano perciò che non è tanto l'assenza dei geni in analisi a provocare un danno, bensì sono le mutazioni causali (soprattutto nella PSEN1 ma anche nella PSEN2) ad essere associate a malattia, poiché provocano una "gain of abnormal function" delle proteine da essi codificate [41].

Nei decenni scorsi si è dibattuto molto sul reale ruolo svolto dalla famiglia delle preseniline nel complesso della γ -secretasi. Venivano proposte due ipotesi differenti: la prima, basandosi sulla capacità delle preseniline e APP di coprecipitare, suggeriva che queste facessero parte del complesso catalitico presumibilmente come cofattori [46]; la seconda invece rifiutava il ruolo attivo delle preseniline e supponeva che avessero solo un ruolo nel traffico di membrana di alcune proteine, inclusi i componenti della reazione della γ -secretasi [47,48]. Ad oggi sembra ormai evidente che l'ipotesi corretta sia quella per cui la presenilina non solo abbia un ruolo centrale, ma che sia essa stessa a coincidere con il complesso della γ -secretasi, il quale altro non è che una proteasi intramembrana attivata mediante autoproteolisi sui residui conservati di aspartato propri della presenilina. In particolare la secretasi costituisce un complesso multiproteico formato da altri tre elementi oltre la presenilina, quali la NTC, la Aph-1 e PEN-2, in modo da consentire un'efficiente attività di trasporto nonché di proteolisi al complesso enzimatico stesso [41,48] (Figura 6). Un recente lavoro di Spasic e collaboratori [49] fornisce una forte evidenza per cui la PSEN1 presenta una struttura a nove tratti transmembrana. In dettaglio, a seguito della sua scissione, la presenilina si unisce al complesso della secretasi, prima che quest'ultima si sia inserita nella membrana plasmatica.

Studi di knockout e knockdown condotti sugli organismi modello hanno dimostrato che tutti e quattro i componenti del complesso risultano importanti per l'attività enzimatica [48,50,51]. Tramite i recenti studi, innumerevoli progressi sono stati ottenuti sulla conoscenza della struttura, funzione, regolazione e assemblamento dei

differenti componenti della γ -secretasi, ma non si conosce ancora abbastanza sul loro esatto ruolo nel legare i substrati e sulla cinetica di proteolisi, mediata dai differenti componenti del complesso enzimatico [41].

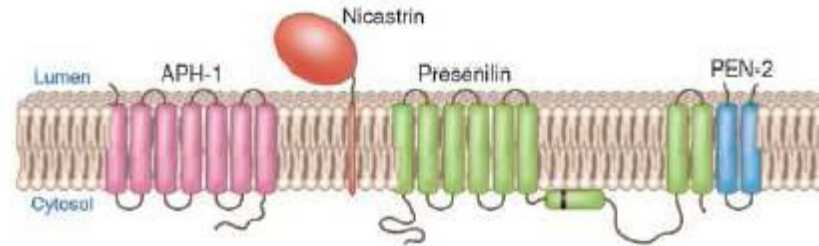


Figura 6. Complesso delle preseniline.

1.5.3 Ruolo della proteina tau

La proteina tau è presente in tutte le cellule dell'organismo e il suo ruolo fondamentale è quello di legare e stabilizzare i microtubuli a livello del citoscheletro. La proteina tau esiste in 6 isoforme diverse composte da 352-441 aminoacidi. Il gene che codifica per tau (MAPT) è localizzato sul cromosoma 17 e comprende 16 esoni. Lo splicing alternativo a livello degli esoni 2,3 e 10 genera sei diverse isoforme di tau all'interno della cellula. La forma di tau patologica è abnormemente fosforilata e tale fenomeno comporterebbe una perdita della normale funzione di tale proteina, cioè si arriverebbe a una riduzione della capacità di assemblare i microtubuli. Recentemente topi transgenici portatori di mutazioni nei geni APP, PSEN1 e MAPT

avrebbero sviluppato una forma di AD molto aggressiva con la formazione di elevati livelli di grovigli neurofibrillari.

Un numero elevato di PDPKs, tra cui la GSK-3B e la Cdk5, potrebbero essere coinvolte nella fosforilazione in vivo della proteina tau ed essere quindi associate alla produzione di grovigli neurofibrillari nell'AD. l'equilibrio tra fosforilazione da parte delle chinasi e defosforilazione da parte di fosfatasi sembra essere cruciale.

Infatti nei cervelli affetti da Ad vi è una riduzione dell'attività di fosfatasi; in particolare la fosfatasi PP-2A è ridotta del 20%-30% nell'AD. Anche l'attività di Pin1, un enzima capace di regolare le funzioni di tau e il processamento di APP, sembra essere ridotta in cervelli di soggetti affetti da AD. Le diverse isoforme fisiologiche determinano la generazione di due diverse isoforme di tau iperfosforilata, denominate 4R e 3R. Diverse patologie neurodegenerative mostrano differenti rapporti tra 4R tau e 3R tau, per esempio nella patologia di Alzheimer osserviamo un distribuzione più o meno equivalente tra livelli di 4R tau e 3R tau, nella degenerazione corticobasale e nella paralisi sopranucleare progressiva si osserva, invece, una prevalenza della forma 4R [52].

1.5.4 Ruolo dell'inflammazione

Le evidenze che, al quadro della malattia di Alzheimer, contribuisca in misura importante una distruzione dei neuroni sono ormai ampie e ben documentate. Il danno a carico della cellula neuronale è mediato

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

dall'attivazione del sistema immunitario dell'ospite, senza tuttavia un coinvolgimento quantitativamente significativo della componente anticorpale o della attivazione dei linfociti T e B che classicamente accompagnano la risposta immunitaria specifica[53]. È quindi improprio parlare di autoimmunità, concetto che presuppone una risposta immune umorale o cellulomediata specifica. Si può invece definire questa risposta dell'organismo "autotossica", mediata dai meccanismi immunitari innati, aspecifici, che non richiedono l'attivazione e la espansione di cloni linfocitari né il riconoscimento di determinanti che siano bersaglio della risposta immune. Se l'attivazione di questo sistema avviene nei confronti di strutture dell'organismo, il quadro finale può essere simile a quello della risposta autoimmunitaria, sebbene il percorso patogenetico sia radicalmente differente[54]. Quando si parla di tessuto nervoso anche il concetto di infiammazione va ridefinito e analizzato nello specifico: infatti la mancata risposta vascolare, la presenza della barriera ematoencefalica e l'assenza di fibre nocicettrici all'interno del cervello non permettono lo svilupparsi dei segni classici dell'infiammazione. Il ruolo del processo infiammatorio nella patogenesi dell'AD è testimoniato dal riscontro che la microglia presente nelle placche senili contiene una proteina associata all'infiammazione l'HLA-DR, proteina del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II. Numerosi altri mediatori della flogosi sono stati riscontrati in associazione con la placca: tra questi anche l'interleukina-1b(IL-1b), l'interleukina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale a (TNF-a)[55]. Ulteriori dati sono stati forniti da evidenze epidemiologiche e studi retrospettivi che ipotizzano un effetto

protettivo della terapia antinfiammatoria non ancora confermato in studi clinici[56]. Poiché la maggior parte delle molecole infiammatorie non sono in grado di superare la barriera ematoencefalica, la loro presenza all'interno del tessuto nervoso implica che questo sia in grado di produrle: infatti le proteine infiammatorie nel SNC originano principalmente dalla microglia e dalla astrogliataivate. La lista dei mediatori che intervengono durante il processo autotossico nel tessuto cerebrale è ampia e comprende le proteine del complemento e i loro inibitori, le citochine infiammatorie e i rispettivi recettori, i componenti della via della coagulazione e una serie di proteasi e inibitori specifici.

La Ab è in grado di attivare la cascata del complemento, supportando l'idea che nella malattia di Alzheimer la componente infiammatoria potrebbe essere una reazione aspecifica indipendente da una reazione immunitaria mirata e che potrebbe essere una risposta alle alterazioni neuropatologiche presenti, eventualmente facilitandone la progressione. L'affinità del C1q per la Ab è massima quando questa si trova conformata a foglietto b. Il complesso C1q - Ab è inoltre più facilmente aggregabile, ed è in grado di avviare la nucleazione delle fibrille di amiloide a loro volta capaci di attivare il complemento: è quindi anche possibile che il processo patologico sia in grado di autoamplificarsi. Anche il complemento è fortemente implicato nella distruzione neuronale. Nei soggetti AD si possono in effetti evidenziare frammenti del complemento in forma attivata a livello della placca senile e in associazione alla membrana dei neuriti distrofici è stata addirittura osservata la presenza del complesso di attacco[57]. L'azione litica del complemento è modulata da una serie

di inibitori, tra cui la vitronectina, la clusterina e il CD59. Una deregolazione di queste molecole potrebbe contribuire alla patogenesi dell'AD. In particolare è stato osservato che la Ab è in grado di inibire l'espressione del CD59 e che nella corteccia frontale e nell'ippocampo di soggetti AD i livelli di quest'ultimo sono ridotti. In coltura la lisi di cellule neuronali mediata dal complemento è inversamente proporzionale alla capacità del neurone di produrre CD59. La microglia, la astroglia e anche gli stessi neuroni sono in grado di secernere in condizioni di normalità interleuchine in piccola quantità, ma quando la microglia è attivata, per esempio dopo un trauma o in seguito a stress ossidativo, è in grado di produrre elevate quantità di IL-1b e TNF-a. In seguito la IL-1b e il TNF-a inducono la espressione di svariate proteine da parte degli astrociti, come la GFAP, la ApoE, la sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS), la α 1-antichimotripsina, IL-6, IL-1b e TNF-a [58]. La IL-1a, la IL-1b, la IL-6 e il TNF-a sono tra le più potenti interleuchine proinfiammatorie, e sono presenti in aumentata quantità nel cervello di soggetti AD. La famiglia della IL-1 è composta da tre molecole: IL-1a, IL-1b e l'antagonista del recettore dell'IL1 (IL-1RA), il quale funziona come fisiologico inibitore della IL-1. Dai risultati di alcuni studi longitudinali che hanno valutato nel tempo un campione di soggetti sani, in quelli che in seguito hanno sviluppato AD, si può riscontrare, nelle sedi tipiche delle lesioni, una notevole espressione di cellule microgliali attivate e secernenti IL-1a, che testimoniano il ruolo di questo mediatore nelle fasi iniziali della patologia. Apparentemente l'attivazione delle cellule microgliali da parte della Ab sarebbe sufficiente a stimolare la produzione di IL-1 e di numerose altre citochine[59]. La IL-1 svolge numerose attività

nell'organismo e nel SNC alcune delle quali potrebbero essere implicate nella patogenesi dell'AD: promuove la sintesi e processazione della APP [60] nei neuroni e nelle cellule gliali, incrementando la produzione di Ab, aumenta l'espressione e l'attività delle acetilcolinesterasi (AChE), spiegando forse in parte il deficit di questo neurotrasmettitore, stimola come fattore autocrino la produzione di IL-1 da parte delle cellule microgliali e agisce sugli astrociti attivandoli e promuovendo l'espressione di α 1-antichimotripsina. Essa inoltre incrementa l'espressione da parte degli astrociti della S100B, una citochina neurotrofica e gliotrofica, che stimola la crescita neuritica ed aumenta i livelli intracellulari di calcio e l'espressione di APP[61]. Tale molecola è anche in grado di stimolare la nitrossidosintetasi astrogliale, con produzione di NO, radicale libero dell'ossigeno potenzialmente neurotossico. L'aumentata espressione di IL-1 potrebbe dunque spiegare molte delle alterazioni che si osservano durante la degenerazione neuronale, quali l'aumentata crescita dei neuriti distrofici, la sovra espressione della APP e i meccanismi citotossici come l'eccessiva presenza di calcio intracellulare e i livelli tissutali aumentati di ossido nitrico. La conseguenza di questa cascata è un'aumentata produzione di Ab, che a sua volta può stimolare la produzione di interleuchine da parte della microglia[59]. Il-6 è una citochina coinvolta in molti processi cellulari, va a mediare la risposta immunitaria e le reazioni infiammatorie relative alla crescita cellulare e alla differenziazione nel sistema nervoso centrale. Queste funzioni sono possibili grazie ad interazioni con specifici recettori, solubili o di membrana, che sono in grado di andare a costituire il complesso IL-6–recettore (IL-6RC)

biologicamente attivo. Un innalzamento acuto della IL-6 sembra essere neuroprotettivo, mentre livelli aumentati cronicamente sarebbero lesivi: infatti la IL-6 è in grado di indurre gliosi, stimolare la sintesi di fattori del complemento, delle proteasi, delle prostaglandine (PG) e delle proteine di fase acuta di classe II, contribuendo ad amplificare la risposta infiammatoria con ulteriore deposizione di Ab e relativa lesione neuronale. L'interferon g (IFNg), prodotto dai linfociti T attivati, è in grado di amplificare notevolmente la risposta della microglia. In quest'ottica le lesioni tipiche dell'AD potrebbero quindi anche derivare, almeno parzialmente, da un'aumentata espressione di IFNg, che stimolando la microglia come la Ab agirebbe in modo ad essa sinergico sia stimolando la produzione di TNFa, che inducendo l'accumulo di NO e di intermedi azotati neurotossici. A sua volta il TNFa può stimolare, come fattore autocrino, la microglia, innescando un processo capace di autoalimentarsi. Quindi in tutti questi processi risulta fondamentale il ruolo della microglia, in assenza della quale i danni cellulari non sembrano verificarsi.

Le prostaglandine sono acidi grassi insaturi a lunga catena, con molteplici funzioni nell'organismo, tra cui la mediazione dei processi infiammatori. Esse derivano dall'acido arachidonico mediante l'azione degli enzimi COX-1 e COX-2 (Cicloossigenasi: COX). La COX-1 è espressa costitutivamente dalla maggioranza dei tessuti e nel SNC si trova espressa soprattutto dalla microglia. La COX-2 è un enzima poco espresso dai tessuti umani, ma può essere facilmente indotto da stimoli infiammatori, come IL-1. Nel SNC è espressa prevalentemente dai neuroni ed ha un ruolo nell'infiammazione nell'intero organismo, nonché una funzione protettiva per svirati

tessuti, tra cui quello renale e verosimilmente anche quello nervoso: è quindi possibile che la COX-2 sia coinvolta solo in minima parte nei processi degenerativi all'interno del SNC, il che spiegherebbe il fallimento dei tentativi di trattamento con inibitori selettivi della COX-2. Anche gli steroidi sembrano, secondo alcuni studi, non essere efficaci, e anzi, possono essere lesivi per il neurone, mentre altri lavori riportano risultati contrastanti[56]. Risulta interessante evidenziare che numerosi studi epidemiologici suggeriscono un ruolo protettivo dal rischio di sviluppare l'AD è rappresentato dalle terapie antinfiammatorie croniche assunte per altre patologie, che confermerebbero la possibilità di intervenire sulla patogenesi della malattia interferendo con quei meccanismi infiammatori che mediano il danno cellulare e tissutale e che verosimilmente sono capaci di amplificare la neurodegenerazione, anche stimolando la produzione e la deposizione di Ab [62].

1.5.5 Ruolo dello stress ossidativo

Tra i fattori genetici solo l'allele e4 del gene dell'Apolipoproteina E (ApoE) è stato dimostrato rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza dell'AD sporadico [63], comunque si stanno studiando altri geni che possono aumentare la suscettibilità di sviluppo alla patologia. Molti di questi sono coinvolti nel processo dello stress ossidativo, che risulta giocare un ruolo rilevante nell'eziopatogenesi dell'AD. Lo stress ossidativo è causato da uno squilibrio tra i livelli di

antiossidanti e le concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno[64]. I depositi di beta amiloide (Ab) nel cervello di pazienti AD comporta la produzione di radicali superossido, che, combinati con l'ossido nitrico (NO), formano perossinitrito che a sua volta, induce la morte cellulare. Lo stress ossidativo può insorgere per svariate ragioni: per un inadeguato apporto di antiossidanti dovuto ad una dieta sbagliata, per l'azione di tossine presenti nel corpo a causa di agenti esterni, quali l'inquinamento ambientale o il fumo da sigaretta, o per un'attivazione inappropriata di fagociti, che si può verificare in caso di infiammazione cronica [64]. Le cellule sotto stress ossidativo perdono la loro capacità di funzionare a causa di modificazioni dovute alle specie reattive dell'ossigeno a carico dei lipidi, delle proteine e del DNA. Ad esempio, l'anione radicalico superossido e il perossido di idrogeno, rilasciati da cellule fagocitiche, possono interagire con metalli di transizione e produrre quantità elevate di radicali idrossilici altamente reattivi, comportando modificazioni alle proteine, formando lipidi saturi e acidi grassi poliinsaturi e causando un esteso danno tissutale[65]. Dal momento che lo stress ossidativo può comportare un declino funzionale, è di conseguenza importante stimare il significato dello stress ossidativo nel processo patologico. Si è iniziato a considerare lo stress ossidativo come un fattore implicato nell'eziopatogenesi dell'AD nel 1986 [66]; da allora molte altre indagini sono state condotte al riguardo, in vari stadi ed in vari processi della patologia[67,68]. Dal 1992, numerose analisi hanno permesso di stabilire che alti livelli di stress ossidativo sono presenti nei neuroni morti nei cervelli di pazienti AD[69,70]. Molti studi hanno anche permesso di evidenziare che le placche di amiloide sono un

centrofocale di ossidazione cellulare e molecolare[71]. Nei casi di AD con una implicazione genetica, l'inferiore capacità di difesa contro i radicali liberi che si verifica con l'avanzamento dell'età, sembra essere ulteriormente compromessa, probabilmente a causa di fonti addizionali di radicali liberi che risultano dalla suscettibilità genetica e/o dalla presenza di mutazioni nei geni dell'APP e PS1[69]. Parecchi studi hanno dimostrato che il peptide Ab esiste in due isoforme: Ab [1-40] e Ab [1-42]. L' Ab [1-40] è decisamente più solubile rispetto all'Ab 1-42, che, quindi, tende a formare aggregati, originando placche di amiloide. Il peptide Ab riveste un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione dell'AD ed è stato dimostrato che conferisce neurotossicità, inducendo la produzione di radicali liberi. E' stato dimostrato che Ab causa l'accumulo di perossido di idrogeno (H₂O₂) in colture di neuroni ippocampali [24] e induce la perossidazione lipidica ed inoltre può causare un'eccessiva produzione di radicali superossido per interazione con cellule vascolari endoteliali [72]. Questi studi vanno a supportare la teoria che lo stress ossidativo vada ad incidere sul processo di amiloidogenesi. Un aumento di produzione di b-amiloide può contribuire ad una produzione a ciclo continuo di stress ossidativo. Il cervello ha un'elevata attività metabolica che è alimentata dal glucosio. Studi specifici hanno permesso di evidenziare la presenza di anormali bassi livelli di proteine trasportatrici di glucosio nei cervelli di pazienti AD[73] e questo fatto sembra essere una conseguenza della perossidazione lipidica[74]. I livelli di b-amiloide risultano aumentati in funzione dell'avanzamento dell'età, della dieta, dei livelli ormonali e della componente genetica. Tutti questi parametri vanno ad incidere

sulla formazione di radicali liberi e sull'aumento di molecole infiammatorie, comportando un incremento nella produzione di APP e dei livelli di b-amiloide. Si viene così a creare un circolo vizioso di stress ossidativo e diproduzione di Ab. I mitocondri sono le centrali energetiche delle cellule, comprese quelle nervose, in quanto producono l'energia necessaria allo svolgimento delle proprie funzioni. Tali organelli sono molto suscettibili al danno indotto da radicali liberi, che sono continuamente prodotti dalla catena respiratoria[75]. Disfunzioni a livello mitocondriale possono comportare necrosi e apoptosi cellulare[76]. Recenti analisi morfometriche di biopsie cerebrali, specialmente di pazienti AD, hanno dimostrato una notevole riduzione del numero di mitocondri e un aumento del contenuto citoplasmatico di DNA mitocondriale nei neuroni contenenti un alto livello di composti ossidati, supportando la teoria nell'eziopatogenesi dell'AD sono presenti anomalie mitocondriali[77]. L'attivazione infiammatoria di microglia ed astrociti evidenziata attorno alle placche di b-amiloide e la conseguente aumentata espressione di citochine e chemochine, consente di affermare che il fattore preponderante nella patogenesi dell'AD è rappresentato dall'infiammazione. Il rischio di sviluppare la patologia può aumentare nel caso in cui determinati soggetti siano portatori di polimorfismi o mutazioni in geni-chiave[78]. Recenti studi hanno permesso di collegare l'infiammazione con un'aumentata produzione di radicali liberi e stress ossidativo [79]. Tutti i fattori qui discussi, quali appunto l'incremento di produzione di b-amiloide, il ridotto metabolismo del glucosio, il danno mitocondriale e l'infiammazione, causati da una produzione eccessiva di radicali liberi

e dallo stress ossidativo, rappresentano una delle cause principali di neurodegenerazione nell'AD. Dal momento che è stato testato sperimentalmente che la restrizione calorica, l'esercizio fisico e l'attività intellettuale promuovono la sopravvivenza neuronale, abbinando un apporto equilibrato di antiossidanti naturali (come vitamine C ed E, beta-carotene e melatonina) si potrebbe costituire una delle strategie più efficaci per la prevenzione dell'AD[80].

1.5.6 Aspetti biochimici

Il sistema colinergico è particolarmente colpito sia nell'invecchiamento normale sia nel processo patologico sottostante la malattia di Alzheimer. Nell'ippocampo e nella neocorteccia di pazienti con AD vi è, infatti, una marcata riduzione sia della colinoacetil-transferasi (ChAT) che dell'acetilcolina. La maggior parte dell'attività della ChAT della neocorteccia si riscontra nelle terminazioni presinaptiche del sistema ascendente originante dal nucleo basale di Meynert, i cui neuroni colinergici ricevono afferenze dall'ipotalamo, dall'amigdala, dal nucleo peripeduncolare, dal mesencefalo e dai nuclei del tronco encefalico. Essi proiettano a loro volta alla neocortex, alla corteccia entorinale, all'amigdala, all'ippocampo, al bulbo olfattivo, al talamo, all'ipotalamo e al tronco encefalico. Inizialmente, la riduzione dell'attività colinergica è stata attribuita a perdita neuronale a carico del nucleo basale di Meynert e correlata con la presenza delle alterazioni istopatologiche dell'AD.

Dottoranda Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Tale ipotesi è stata poi ridimensionata, in seguito al riscontro di una riduzione dell'attività della ChAT anche in zone prive d'alterazioni istopatologiche tipiche, come il nucleo caudato, dove non si riscontrano, infatti, né placche senili né ammassi neurofibrillari. In antitesi alla stessa ipotesi è anche l'evidenza che, non raramente, in pazienti AD manca la degenerazione del nucleo di Meynert, e che i deficit colinergici divengono apparenti relativamente tardi nel corso della patologia[81]. La specificità stessa delle alterazioni delle proiezioni colinergiche corticali a partenza dal nucleo basale è stata messa in discussione da alcuni autori. Inoltre, è possibile dimostrare nel cervello dei soggetti colpiti da AD una perdita anche di neuroni monoaminergici e delle funzioni noradrenergiche, GABAergiche, glutammatergiche e serotoninergiche. A carico della corteccia colpita inoltre è riscontrabile una marcata riduzione della concentrazione di numerosi neurotrasmettitori neuropeptidici quali la sostanza P, la colecistochinina e la somatostatina; tuttavia ancora non è chiaro quale delle sopra elencate anomalie (comprese quelle a carico del sistema colinergico) sia primaria o secondaria alla perdita neuronale, che è stato osservato, risulta essere così eterogenea.

1.6 Genetica dell'AD

L'AD si può presentare in diverse forme; si distinguono infatti le forme familiari e quelle sporadiche. Negli ultimi decenni è diventato sempre più evidente che l'AD può essere considerata come una patologia genetica, riscontrata in molte famiglie, nelle quali viene trasmessa di generazione in generazione in maniera autosomica dominante. Numerosi studi hanno documentato un aumento significativo del rischio di sviluppare l'AD, apparentemente sporadico, tra i congiunti di primo grado dei pazienti affetti. Nonostante quanto detto, si calcola che in una percentuale non superiore al 5-7% dei casi, si osserva un pattern ereditario per cui le forme genetiche rappresentano una minoranza nel panorama medico. E' doveroso aggiungere che dal punto di vista fenotipico le forme familiari FAD e i casi sporadici SAD, sono molto simili e spesso indistinguibili tra loro, se non per l'età d'esordio che risulta più ravvicinato nel tempo nelle forme autosomi che dominanti conosciute.

1.6.1 Forme familiari di Alzheimer

Nelle forme FAD (circa il 7-10% dei casi) più persone della stessa famiglia vengono colpite dalla malattia, per cui risultano presenti più portatori. In questo caso, il pattern di trasmissione della patologia è di tipo autosomico dominante.

Benché l'AD sia tipicamente una patologia tardiva legata all'invecchiamento vi sono casi ad insorgenza precoce. Questo ha permesso di suddividere la malattia in forme ad esordio precoce e quelle ad esordio tardivo. In particolare, la forma precoce familiare EOAD si manifesta nei casi di malattia che si verificano prima dei 65 anni e costituiscono circa 1% dei casi totali [50]. Al contrario, la forma tardiva familiare LOAD, si diagnostica nelle famiglie con più casi di malattia che però si manifestano dopo i 65 anni. E' noto dalla letteratura che le forme autosomi che dominanti di AD sono causate da mutazioni in diversi geni candidati, come APP [83], PSEN1 [84] e PSEN2 [85].

Il gene che codifica per la proteina precursore dell'amiloide è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 (21q21.22) e codifica per la proteina transmembrana che viene processata, dando origine ai frammenti A β . Nel 1991 è stata descritta la prima mutazione missenso a livello di questo gene [83] e da allora, sono state descritte 32 differenti mutazioni in 89 famiglie. Tutte queste mutazioni determinano una sostituzione aminoacidica a livello di ipotetici siti di clivaggio per le secretasi, alterando così il processamento e favorendo la netta prevalenza di prodotti amiloidogenetici tossici [86]. Un'altra possibilità secondo cui alterazioni nella APP predispongono allo sviluppo di AD riguarda la sua overespressione, come di fatto si verifica nella Trisomia 21. In questi pazienti si presentano infatti, sin dalla giovane età, depositi di soli peptidi A β 1-42 e solo verso la fine della terza decade di vita iniziano ad associarsi anche: accumuli di A β 1-40, microgliosi, astrocitosi, neuriti distrofiche e ammassi neurofibrillari. Sono proprio le lesioni tipiche dell'AD che in questi

soggetti spesso si mettono in relazione con la perdita progressiva delle funzioni cognitive e ad alterazioni comportamentali a partire dalla quarta decade di vita [87]. Sebbene sia difficile dimostrare che le alterazioni neuropatologiche nei soggetti con Trisomia 21, siano da attribuire specificamente alla duplicazione del gene APP e non ad altri loci sul cromosoma 21 che comunque resta sovranumerario, indizi sono forniti da casi di traslocazione di questo cromosoma che portano alla non duplicazione del gene APP: tale condizione genetica pur producendo un fenotipo compatibile con Sindrome di Down, non porta alle alterazioni neuropatologiche e comportamentali tipiche dell'AD. Nel 2009 si è scoperta la prima mutazione (A763V) nel gene APP, in grado di causare la patologia solo nello stato di omozigosi, mentre i portatori eterozigoti risultano non affetti da FAD, suggerendo un'eredità mendeliana anche di tipo recessivo. Tale mutazione è in grado di influenzare il processamento di APP, che porta ad un'aumentata produzione della proteina A β ed alla formazione di fibrille di amiloide in vitro [88].

Gli altri due geni implicati nelle forme autosomiche dominanti di malattia sono PSEN1 (14q24.3) e PSEN2 (1q31-q42). Come detto, le preseniline costituiscono componenti fondamentali della γ -secretasi e loro mutazioni sembrerebbero in grado di sbilanciare la via enzimatica di APP in senso amiloidogenetico. Fino ad oggi sono state descritte 185 mutazioni in 405 per la PSEN1 e 13 mutazioni in 22 famiglie per PSEN2 (<http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations>); tutte mostrano un elevato grado di penetranza e generalmente le mutazioni che colpiscono la PSEN1 provocano le forme più aggressive di AD. La maggior parte delle mutazioni che colpiscono questi geni sono

missenso e provocano una sostituzione aminoacidica più o meno grave a livello della proteina; solo raramente si tratta di delezioni di singole basi. La conseguenza patogenetica di queste mutazioni porta verosimilmente ad un guadagno di funzione che coinvolge la subunità protesica dell'enzima γ -secretasi, che a sua volta si ripercuote sul rapporto fisiologico tra A β 1-42 e A β 1-40. In particolare si determina un aumento dei frammenti tossici A β 1-42, i cui livelli raddoppiano sia nel plasma che nel medium di coltura di fibroblasti di pazienti affetti [47, 89,92]. La maggior parte dei pazienti portatori di mutazioni a livello di uno di questi due geni sviluppano precocemente (età media 50 anni) una forma di AD fenotipicamente indistinguibile dai casi sporadici.

1.6.2 AD Sporadico (SAD)

Le forme SAD sono la maggioranza (circa il 90%): tutti i casi di malattia che non presentano familiarità, vengono considerati come sporadici, per cui la malattia colpisce un solo membro di una famiglia e l'esordio avviene tra i 65-70 anni. La SAD riconosce un'eziologia multifattoriale in cui giocano un ruolo importante, oltre che assetti genetici predisponenti o fattori di suscettibilità, anche fattori non genetici, al momento non completamente identificati, tra cui: il basso tasso di scolarità, il trauma cerebrale, le malattie cardiovascolari, gli alti livelli di colesterolo e il fumo. Nessuno di questi tuttavia si è dimostrato essere il fattore causale della patologia. L'unico fattore di

rischio accertato è l'invecchiamento, anche se la probabilità di sviluppare AD oltre i 95 anni di età risulta essere molto bassa.

Fra i fattori genetici predisponenti, diversi geni candidati sono stati proposti. Ad oggi, il fattore di rischio più noto è rappresentato dall'allele $\epsilon 4$ del gene ApoE. Tale gene normalmente codifica per una proteina coinvolta nel trasporto del colesterolo, poiché è capace di interagire coi recettori epatici (recettori LDL), ma anche nella sintesi di vari tipi di lipoproteine in una grande varietà di tessuti [95]. Più recentemente il gene ApoE è stato descritto anche come fattore associabile alle forme di Alzheimer sporadico in gran parte della popolazione. Il locus dell'ApoE è situato sul cromosoma 19 ed è un gene polimorfico che esiste, cioè, nella popolazione in tre differenti forme o alleli denominati rispettivamente $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$; ogni individuo ha due copie del gene, quindi vi possono essere diverse combinazioni, ognuna delle quali influenza in modo diverso la predisposizione dell'individuo all'AD. La relazione AD ed ApoE è stata confermata da più di 100 studi condotti in differenti gruppi di popolazioni. In particolare viene riconosciuto nel mondo scientifico che l'allele $\epsilon 4$ si presenta con una frequenza maggiore nei soggetti con AD, rispetto alla popolazione generale; inoltre è associato con un aumentato rischio di sviluppare la malattia nonché con una più precoce età d'insorgenza, rispetto ai soggetti che invece presentano gli alleli $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$ [93,94]. Altre evidenze riconoscono infatti nell'allele $\epsilon 2$ un fattore protettivo per l'AD [93]. Studi longitudinali svolti sulla popolazione caucasica hanno dimostrato che portatori eterozigoti di $\epsilon 4$ hanno un rischio doppio di sviluppare SAD, rispetto alla popolazione non portatrice. La

condizione di omozigosi per $\epsilon 4$ sarebbe, addirittura, associata ad un rischio circa 5 volte maggiore e ad un esordio precoce di malattia.

Nonostante quanto evidenziato sin qui, è doveroso sottolineare che il genotipo per ApoE non è da considerarsi come una caratteristica predittiva, né tantomeno un metodo di diagnosi per l'AD: indica importante, oltre che assetti genetici predisponenti o fattori di suscettibilità, anche fattori non genetici, al momento non completamente identificati, tra cui: il basso tasso di scolarità, il trauma cerebrale, le malattie cardiovascolari, gli alti livelli di colesterolo e il fumo. Nessuno di questi tuttavia si è dimostrato essere il fattore causale della patologia. L'unico fattore di rischio accertato è l'invecchiamento, anche se la probabilità di sviluppare AD oltre i 95 anni di età risulta essere molto bassa. E' importante comunque ricordare che i dati inerenti ai geni sui quali è stata evidenziata un'eventuale predisposizione, possono essere applicati come supporto in diagnosi differenziali. Per cui ad una persona che presenta segni di demenza, è più probabile che venga diagnosticato correttamente l'AD se ci sono alti fattori di suscettibilità per il morbo stesso, come l'aver genotipo ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$. Dalle conoscenze acquisite sino ad ora, è chiaro che il gene ApoE risulta in stretta associazione con i depositi di $A\beta$ nel tessuto cerebrale di pazienti portatori dell'allele $\epsilon 4$. Il meccanismo mediante il quale questo allele favorisce un'aumentata produzione di amiloide non è facile da riconoscere; non esistono evidenze provata su cellule, che l'espressione di $\epsilon 4$ rispetto a $\epsilon 3$ o $\epsilon 2$ provochi un significativo aumento della produzione di $A\beta$, invece sembra che ApoE $\epsilon 4$ sia in grado di aumentare i livelli medi dei peptidi $A\beta$ nel tessuto cerebrale, presumibilmente riducendone la clearance dal

tessuto stesso. Ciò designa l'allele $\epsilon 4$ come marcatore di suscettibilità che agendo sinergicamente con altri fattori genetici o ambientali, è in grado di incrementare il rischio d'insorgenza della patologia.

Diversi studi di associazione di tipo genome-wide (GWAS: Genome-Wide Association Studies) di recente pubblicazione, hanno evidenziato la presenza di altri possibili loci di suscettibilità che potrebbero indurre l'insorgenza dell'AD, tra cui ad esempio i cromosomi 9,10 e 12 [95,96]. Questi tipi di studio sono basati sull'analisi di Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) presenti nell'intero genoma, ovvero di quelle sequenze di DNA che variano da individuo ad individuo e che si pensano responsabili della suscettibilità individuale a manifestare determinate malattie. Molti di questi studi si sono focalizzati su geni codificanti per molecole infiammatorie (citochine e chemochine) o coinvolte nei meccanismi di stress ossidativo, entrambi considerati i maggiori protagonisti della patogenesi dell'AD. Le varianti alleliche più rilevanti sono state individuate in particolari geni tra cui : CLU, PICALM (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) e CR1 (fattori 3b/4b del complemento). Inoltre, numerosi studi si sono focalizzati su geni codificanti per fattori dell'infiammazione, sottolineando il ruolo che questa e, in particolare lo stress ossidativo, avrebbero nella patogenesi della patologia. Una delle prove più forti a sostegno di questa ipotesi è l'evidenza che varianti polimorfiche del gene che codifica per IL-1, localizzato sul cromosoma 2 (2q14-21), sarebbero associate ad un aumentato rischio di sviluppare AD in popolazioni differenti [97,98]. Il gene codifica per IL1- α , IL1- β e la proteina antagonista del recettore di IL1 (IL-1Ra); per quanto riguarda

il gene IL-1 α il genotipo 2/2 sembrerebbe conferire un incremento del rischio di sviluppo di malattia [99]. Tale studio mostra inoltre che soggetti omozigoti per l'allele 2 dell'IL1- α e l'allele 2 dell'IL1- β presentano il rischio maggiore. Il polimorfismo T/C dell'IL1- α è stato indagato in una popolazione AD Italiana. Dai risultati è emerso che il genotipo T/T è fortemente associato con la forma EOAD [100]. Il Polimorfismo T/C nell'IL1- β è risultato associato all'insorgenza della AD in studi condotti su popolazioni appartenenti ad etnie differenti quali la popolazione AD Giapponese [99], Italiana [101] e Australiana [102]. Tali variazioni potrebbero influenzare l'espressione del gene provocando un'ulteriore attivazione della microglia. Questi risultati non sono stati però replicati nella popolazione Cinese [103].

Grande attenzione è stata rivolta anche al gene che codifica per l'IL-6; localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 7 (7p21), IL-6 codifica per l'omonima citochina proinfiammatoria e presenta polimorfismi nella regione promoter e a livello della regione non tradotta all'estremità 3', sotto forma di ripetizioni tandem (VNTR). Per entrambe le regioni studi caso-controllo hanno dimostrato un'associazione positiva con AD [104]. Studi di screening genomico hanno fornito prove a favore di un possibile ruolo del fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α) e della α 2-macroglobulina (A2M). TNF- α è codificato da un gene localizzato sul cromosoma 6 (6p21.3) e un suo ruolo come fattore predisponente è stato dimostrato, oltre che nell'AD, anche in numerose malattie infiammatorie e autoimmuni [105]. A2M, invece, è codificata da un gene localizzato sul braccio corto del cromosoma 1; gli studi condotti da Blacker e collaboratori hanno dimostrato una forte associazione tra polimorfismi genici

coinvolgenti questa regione e lo sviluppo di AD [106]. Tra i geni codificanti per le chemochine, MCP-1 e RANTES, sono stati a lungo studiati come loci di suscettibilità per numerose malattie neurodegenerative [107]. Studi finalizzati a rilevare la prevalenza della variante polimorfica A-2518 G in popolazioni affette da AD e in controlli sani hanno dimostrato una mancanza di associazione di questa variante con la malattia, escludendo quindi la possibilità che si tratti di un fattore di rischio per lo sviluppo di malattia. È stato, inoltre, dimostrato come la presenza di almeno un allele polimorfico G non aumenti il rischio di sviluppare AD ma correli con più alti livelli sierici di MCP-1 [108]. Il polimorfismo -403 A/G della regione promoter di RANTES è stato positivamente associato a numerose malattie autoimmuni, senza, però, mostrare un'associazione positiva con la Malattia di Alzheimer [107]. I geni CCR2 e CCR5, codificanti rispettivamente per i recettori di MCP-1 e RANTES, sono stati, recentemente presi in considerazione; una singola sostituzione amminoacidica, valina con isoleucina, a livello del codone 64 di CCR2 (CCR264I) e una delezione di 32 paia di basi a livello della regione codificante di CCR5 (CCR32) sono stati protagonisti di molti studi. Per quanto riguarda la sostituzione amminoacidica, è stata messa in evidenza una diminuita prevalenza della variante e l'assoluta assenza di una condizione di omozigosi per l'allele polimorfico nella popolazione affetta da AD, potendo quindi suggerire un ruolo protettivo del polimorfismo [109]; al contrario, non è stata dimostrata alcuna rilevanza di CCR5_32 nei pazienti affetti da AD rispetto ai controlli [109]. IP10 è un'altra chemochina recentemente testata per un possibile ruolo nell'insorgenza di AD. La ricerca di nuove varianti

alleliche nella regione codificante del gene in pazienti on AD, ha dimostrato la presenza di due polimorfismi già riportati nell'esone 4 (G/C e C/T) e di un nuovo polimorfismo raro nell'esone 2 (C/T). Successivamente questi SNPs sono stati analizzati attraverso uno studio caso-controllo che non ha dato alcun risultato significativo [110]. Sono stati analizzati anche geni coinvolti nello stress ossidativo, un processo coinvolto nella patogenesi dell'AD. Tra questi sono stati presi in considerazione i geni codificanti per il complesso di sintesi dell'ossido nitrico (NOS). Un polimorfismo già depositato nel gene *NOS3* (*NOS endoteliale*) caratterizzato dalla transizione di una timina in una citosina e positivamente associato con patologie vascolari, analizzato nei pazienti AD non ha riportato nessuna differenza significativa rispetto ai controlli. L'espressione di NOS3 in cellule del sangue periferico sembrerebbe, però, essere notevolmente influenzata dalla presenza del polimorfismo in modo dose dipendente. L'influenza che questo polimorfismo ha sull'espressione di NOS3 supporta l'ipotesi di un effetto benefico esercitato nell'AD dove contribuirebbe a ridurre il danno ossidativo [111]. Un'altra variante nel gene NOS3 è stata analizzata nei pazienti con AD, essa consiste in un cambiamento di una singola base che produce una sostituzione aminoacidica in posizione 298 (Glu298Asp). Uno studio pubblicato nel 1999 ha dimostrato che l'omozigosi per l'allele wild-type è molto più frequente nei casi di LOAD [111]. Un secondo studio, pubblicato nel 2003, ha dimostrato che i soggetti omozigoti presentano elevate concentrazioni sanguigne di omocisteina. Dato che l'isoforma maggiormente espressa nel cervello è NOS1 (la forma neuronale), è stato analizzato il gene che codifica per questa proteina.

L'analisi genetica ha dimostrato che il genotipo omozigote del polimorfismo sinonimo nell'esone 29 di *NOS1* rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di EOAD [112], mentre il polimorfismo nel 3'UTR di *NOS1* non risulta essere associato con l'AD [113]. Un unico studio, condotto da Feulner e collaboratori nel 2009, ha replicato l'associazione di quattro geni candidati: *GAB2*, *PCBD1*, *PCK1* e *LMNA* [114]. Tra questi, l'unico estesamente studiato è *GAB2* (11q14.1) che codifica per una proteina coinvolta in numerose vie di proliferazione e differenziazione cellulare. [115]. Una recente metanalisi che riunisce tutti gli studi pubblicati su *GAB2* conferma una significativa associazione di questo gene con l'AD [116]. È interessante notare come alcuni studi abbiano riportato un effetto additivo di *GAB2* e dell'allele *APOε4* sul rischio di sviluppo di malattia [115].

2. SCOPO DELLA TESI

Scopo della tesi è la descrizione di un' ampia famiglia originaria del nord Sardegna in cui è stata riscontrata la nuova mutazione PSEN2 A85V, la ricostruzione dell'albero genealogico della famiglia e la raccolta di quante più informazioni possibili allo scopo di risalire al fondatore della mutazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1. L'archivio storico come fonte per la ricerca neurogenetica

Le malattie genetiche hanno un impatto rilevante sulla salute pubblica in termine di morti precoci e/o grandi disabilità.

Sul catalogo WEB del McKusick [116] sono censite 11596 malattie delle quali solo 6131 ha un gene isolato. Circa il 50% delle malattie genetiche interessa e coinvolge il Sistema Nervoso Centrale ma è probabile che il loro numero sia in realtà ancora maggiore. Questo dipende dal fatto che, se per alcune patologie è facile intravedere l'ereditarietà mendeliana (malattie dominanti, recessive o legate al cromosoma X) per altre, definite come complesse o multifattoriali, i fattori genetici e ambientali si combinano in termini indecifrabili.

Nelle malattie mendeliane, presupposto indispensabile è la accurata (e quanto più vasta possibile) ricostruzione dell'albero genealogico sia in orizzontale (lungo le fratrie) che in verticale (lungo le generazioni) tale che sia possibile il calcolo della modalità di trasmissione della malattia che non sempre è definita, o definibile, con certezza. Le malattie ereditarie sono peraltro rare e i pazienti relativamente pochi. Per il raggiungimento di risultati statisticamente significativi è necessario, sovente, studiare insieme più famiglie con la stessa malattia. Questa modalità però, se efficace nell'aumentare il numero degli affetti, rischia di creare molteplici problemi poiché si dà per scontato che ad uno stesso quadro clinico corrisponda una stessa anomalia genetica (problema dell'eterogeneità). Inoltre mentre quando si lavora sui batteri è discretamente facile seguire gli effetti di una certa mutazione (data la rapidità con cui gli stessi si replicano), in genetica umana per osservare effetti di mutazioni su ampi campioni bisogna aspettare secoli (una generazione ogni 25 anni circa).

Rarità di patologie e relativo scarso numero di affetti, problemi di eterogeneità, scarse certezze di genetica formale e difficoltà nella ricostruzione dei pedigrees rendono quindi generalmente molto difficili tali studi.

La Sardegna si pone invece come terreno ideale per lo studio di queste malattie, ritrovandosi contemporaneamente e straordinariamente insieme una serie di condizioni favorevoli.

La Sardegna grazie alle caratteristiche geografiche della regione e alle scarse vie di comunicazione, ha favorito una "consanguineità" di popolazione, tale da dar luogo alla comparsa di malattie geniche rarissime quali la Malattia di Alzheimer ereditaria (MA) 4. La

difficoltà delle vie di comunicazione ed il relativo isolamento della popolazione hanno prodotto un meccanismo noto in genetica come “effetto fondatore”, per cui i discendenti di un individuo affetto, vissuto in epoche remote, sono ancora oggi tutti vicini geograficamente.

3.2. Metodologia

Indipendentemente dal tipo di malattia in studio, che comunque necessita di un corretto inquadramento clinico, il primo momento fondamentale per appurare l’ereditarietà, è costituito dall’anamnesi familiare che fornisce informazioni importanti ma spesso parcellari e, in ipotesi fortunate, permette di ricostruire solo poche generazioni. La necessità di ricostruire più generazioni e di validare i dati ottenuti con l’anamnesi, impone l’utilizzo di fonti neutre [117].

Gli Atti dello Stato Civile, disponibili nei comuni all’incirca dal 1809, sono i primi ad essere esplorati. Ma se si ravvisa la necessità di risalire ancora indietro nei secoli, gli Archivi Parrocchiali divengono lo strumento indispensabile.

Accessibili e discretamente ben conservati, anche se questa non è una regola generale, risalgono al 1600 circa e, in casi molto fortunati, al secolo prima.

Un particolare tipo di documento parrocchiale è rappresentato dagli Status Animarum, sorta di anagrafi, compilate dai parroci in periodo

pre-pasquale, per controllare che i fedeli ottemperassero al precetto dei sacramenti.

Poiché riportano integralmente la strutturazione della famiglia nucleare con il capofamiglia, la moglie e i figli, si rivelano particolarmente utili nella ricostruzione delle genealogie. Altra fonte, preziosa ed inestimabile ma eccessivamente ampia da studiare sistematicamente, è rappresentata dagli Archivi Notarili. Per la ricostruzione genealogica vale il principio definito “a tappeto” [117]. Vanno cercati e acquisiti contemporaneamente i dati su tutte le branche della famiglia che provengono dagli atti di nascita, matrimonio, morte (battesimo e sepoltura quando rilevati dagli archivi parrocchiali). Tutti i soggetti legati alla famiglia che è in osservazione, non solo da relazioni genetiche (genitore - figlio) ma anche da relazioni di parentela acquisite via matrimonio, vengono inseriti nello studio. La modalità “a tappeto” consente di creare una coorte di soggetti di pari età ed epoca storica che sono indispensabili come soggetti di controllo.

3.3. Valutazione dello stato clinico

Le informazioni indirette sullo stato di salute dei soggetti, recuperabili attraverso le fonti neutre (atti di morte, sepoltura, cause di morte) sono relativamente poche e generalmente non sufficienti. La fonte individuata come ottimale in Calabria è l'Archivio dell'Ospedale Psichiatrico (OP) di Girifalco che, aperto nel 1881, ha visto e

Dottorssa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

ospedalizzato per un secolo ammalati di patologie “nervose e mentali”. Circa 16.000 cartelle cliniche che per accuratezza anamnestica, storia e presentazione degli ammalati, hanno permesso la definizione di “affetto” per soggetti genealogicamente studiati e vissuti in epoche precedenti. Se le informazioni cliniche “storiche” sono “recuperabili” per pazienti ricoverati nell’OP di Girifalco fino al 1980 circa, diventa particolarmente complesso l’accertamento (se non già il solo sospetto clinico) per individui vissuti prima di tale epoca. In Sardegna, purtroppo, non disponiamo di un simile ospedale di conseguenza il recupero di informazioni riguardanti lo stato clinico è molto più complesso.

3.4. Informatizzazione dei dati e programmi di verifica

L’acquisizione e gestione di una grande quantità di dati provenienti dallo studio genealogico, richiede l’utilizzo dell’informatica con la costruzione e implementazione progressiva di una base dati definita sulla relazione “genitori-figlio”. Tutti i soggetti di cui si hanno informazioni (neutre e non) vengono implementati. Ciascuno riceve un numero progressivo e casuale che manterrà per sempre. Il numero garantisce la privacy, facilita il trattamento dei dati e annulla il problema dell’omonimia. Il record del soggetto è organizzato secondo il principio della tripletta “genitori-figlio”: un soggetto esiste nella base dati in quanto figlio di due genitori (se non noti vengono dati loro dei record fittizi e vengono definiti fondatori). Sono riportate nel

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

singolo record tutte le informazioni fondamentali (data di nascita, matrimonio, morte) del soggetto e di entrambi i genitori, la provenienza dei dati, possibili notizie aggiuntive utili alla migliore identificazione del soggetto, notizie mediche se esistenti.

3.5. Dal pedigree alla popolazione fondatrice

Il risultato del lavoro genealogico informatico così condotto non è più la ricostruzione del solo pedigree bensì quella di una popolazione geneticamente e genealogicamente legata che, grazie agli Archivi storici viene ricostruita indietro nei secoli fino a dove esistono gli atti [118]. Dall'identificazione di pazienti sardi, affetti da AD è stato possibile ricostruire una grande famiglia fino al 1700. La vastità del lavoro ha comunque permesso l'identificazione del gene PSEN2 in cui la mutazione A85V è causa di questa infausta patologia.

3.6. Genetica delle demenze in Sardegna

Lo studio è stato rivolto alla caratterizzazione di una popolazione geneticamente isolata quale quella proveniente dalla Sardegna che mostra peculiarità genetiche rispetto ad altre regioni italiane, dovute al suo isolamento territoriale.

Sono stati arruolati pazienti affetti sia dalla forma sporadica che familiare oltre ad un campione di soggetti neurologicamente sani. In particolare è stato analizzato un campione di soggetti con Malattia di Alzheimer Familiare per la ricerca di mutazioni note e non, nei geni APP, PSEN1 e PSEN2.

L'analisi genetica è stata quindi estesa ai soggetti con Malattia di Alzheimer Sporadica per la ricerca di nuovi polimorfismi e mutazioni in due geni associati al complesso della gamma-secretasi. Tali geni, che contribuiscono a formare il complesso proteasico attivo, sono: il gene della Nicastrina (NCSTN) e il gene della Presenilin Enhancer-2 (PEN-2).

Il campione in esame è stato inoltre genotipizzato per i polimorfismi dell'ApoE (alleli e2, e3, e4). L'analisi dei geni APP, PSEN 1 e PSEN2 ha condotto all'identificazione di due mutazioni, delle quali una, non ancora descritta in letteratura, è stata identificata sul gene PSEN2 in un grande pedigree familiare oggetto del nostro studio. L'analisi dell'ApoE ha evidenziato un'associazione con la forma familiare della malattia, mai rilevata in altri studi effettuati sulla popolazione italiana. Le mutazioni identificate nei geni APP, PSEN1 e PSEN2 contribuiscono solo al 3,2% dei nostri casi familiari rispetto al 30-50% noto dalla letteratura. Ciò, oltre a far ipotizzare l'esistenza di altri fattori genetici con un ruolo causale nella Malattia di Alzheimer ancora da caratterizzare, conferma ulteriormente le peculiarità genetiche della Sardegna.

3.7. Studio genetico

Le indagini genetiche sono state svolte su pazienti che afferiscono al laboratorio di Neuropsicologia e Ambulatorio per le demenze della Clinica Neurologica dell'Università di Sassari. I pazienti o in specifici casi i parenti, hanno dato il proprio consenso informato riguardo all'analisi genetica effettuata. Tale indagine è stata eseguita presso il Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze – Reparto di Patologie Neurologiche, Degenerative ed Infiammatorie dell'Istituto Superiore di Sanità.

Nei soggetti reclutati, la diagnosi di demenza è stata formulata sulla base dei criteri internazionali (DSM-IV e NINCDS-ADRDA). Sono stati reclutati sia soggetti con Malattia di Alzheimer familiare (FAD) che sporadica (SAD) e per entrambe le categorie sono stati reclutati sia soggetti che hanno mostrato un esordio precoce della malattia che soggetti con esordio tardivo. Sono stati inoltre reclutati soggetti neurologicamente sani rappresentativi delle fasce di età dei pazienti, con la funzione di gruppo di controllo.

Lo studio del gene dell'Apo E è stato condotto su 164 pazienti affetti da Malattia di Alzheimer e 200 soggetti sani di controllo. Una differenza significativa si osserva nella distribuzione allelica dell'ApoE tra i pazienti e i relativi controlli. Nella nostra popolazione, la frequenza dell'allele e4 è più alta nei pazienti con malattia di Alzheimer (17,1% vs 6,2%, $p < 0,0001$) e particolarmente nei casi familiari (21,4% $p < 0,0001$).

Per quanto riguarda l'e2, questa risulta meno frequente soltanto nel gruppo degli EOAD rispetto ai controlli (1 % vs 4,1 % $p < 0,0001$).

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Anche l'analisi delle frequenze genotipiche dell'ApoE osservata nel gruppo dei pazienti affetti da Malattia di Alzheimer, rispetto ai controlli, mostra differenze significative. Infatti, pur osservando una predominanza del genotipo e3/e3 in entrambi i gruppi, appare evidente una più alta frequenza del genotipo e3/e4 nei soggetti affetti dalla patologia, rispetto ai controlli (30,3 vs 10,1 %, $p=0,003$).

Per il gene APP sono stati analizzati complessivamente 31 soggetti affetti da Malattia di Alzheimer familiare. Nel nostro campione di popolazione non abbiamo identificato alcuna mutazione.

L'analisi del gene PSEN1 è stata condotta su 31 soggetti FAD, su 54 SAD, e inoltre su 80 soggetti di controllo. Lo screening ha condotto all'individuazione della mutazione E318G, sull'esone 10, in due soggetti di sesso femminile, affetti da Malattia di Alzheimer familiare, entrambi ad insorgenza tardiva; l'analisi effettuata sugli altri 134 soggetti non correlati tra loro, non ha rivelato la presenza della suddetta variante.

L'analisi del gene PSEN2 è stata condotta su 31 soggetti FAD, 54 SAD e 100 soggetti di controllo. Il gene della Presenilina 2 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1 (q31-q42), è composto da 12 esoni, i primi due non codificanti. Nella nostra analisi sono stati considerati solo gli ultimi, escludendo quindi gli esoni 1 e 2. La proteina viene espressa normalmente nei diversi tessuti, localizzandosi principalmente nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato del Golgi.

Nel gene PSEN2, fino ad ora sono state riportate in letteratura solamente 13 mutazioni missenso. Le mutazioni della Presenilina 2 favoriscono la sovrapproduzione del peptide A-beta42 sia in vivo che in vitro; oltre a far parte del complesso gamma-secretasico assieme

alla Presenilina 1, alla Nicastrina alla Presenilin Enhancer-2 e all' Anterior Pharnix Defective-1, è coinvolta nei processi apoptotici cellulari.

La nostra analisi ha condotto all'identificazione di una nuova mutazione A85V, sull'esone 4 di PSEN2, mutazione che conduce ad una sostituzione aminoacidica alanina-valina al codone 85 (c.85 C-T) con un cambiamento della tripletta GCG in GTG. E' da osservare che il codone 85 è localizzato al sito N-terminale della proteina e dista soltanto due aminoacidi dal dominio transmembrana I (TMDI).

Questa mutazione è stata individuata in un grande pedigree familiare che verrà illustrato più avanti, e viene ereditata come tratto autosomico dominante.

Il gene NCSTN è stato analizzato in 32 soggetti FAD, 54 SAD e 67 soggetti di controllo. L'analisi ha condotto all'individuazione di due mutazioni silenti e di una variante intronica, ereditati come un aplotipo e in completo linkage disequilibrium. Nella nostra analisi abbiamo individuato alcuni soggetti aventi tutti e tre gli alleli wild type o tutti e tre gli alleli mutanti in eterozigosi. Non sono stati trovati soggetti omozigoti per nessuno degli SNP individuati.

Il gene PEN-2 è stato analizzato in 31 soggetti FAD, 53 SAD e 113 soggetti di controllo. L'analisi ha portato alla scoperta del polimorfismo IVS2+17G/C localizzato nell'introne 2 del gene. Il polimorfismo compare sia in omozigosi che in eterozigosi. Le uniche differenze significative rilevate, sono riscontrabili nelle forme omozigoti C/C relative ai soggetti affetti da MA ad insorgenza precoce (21,8% vs 10,6% p= 0,002).

3.8. Descrizione della famiglia PSEN2 A85V

Scopo della tesi è la descrizione di un' ampia famiglia originaria del nord Sardegna in cui è stata riscontrata la nuova mutazione PSEN2 A85V, la ricostruzione dell'albero genealogico della famiglia e la raccolta di quante più informazioni possibili allo scopo di risalire al fondatore della mutazione.

Abbiamo avuto modo di rilevare nei soggetti da noi studiati grande eterogeneità delle manifestazioni cliniche con sovrapposizione di quadri differenti (sindrome extrapiramidale con parkinsonismo rigido associato a decadimento cognitivo) e un particolare quadro neuroradiologico con calcificazioni bilaterali del globus pallidus. Tramite le informazioni che ci sono state fornite dai componenti della famiglia è stato possibile identificare, almeno in parte, la presenza di soggetti affetti da malattie neurologiche di tipo degenerativo in tre generazioni, senza apparenti salti generazionali.

Della famiglia presentata siamo a conoscenza di almeno 12 pazienti affetti da malattie riconducibili a una forma neurodegenerativa primaria (Tabella 1). 6 di questi hanno una diagnosi clinica: 3 pazienti affetti da probabile Malattia a Corpi di Lewy (VII:5, VII:7, IX:13); 2 pazienti affetti da Malattia di Alzheimer Probabile (VIII:4, IX:12) e 1 paziente affetta da un quadro di Psicosi ossessivo-compulsiva (V:13); gli altri 6 presentano dei quadri clinici compatibili con una sindrome extrapiramidale, in 4 pazienti (IV:3,V:3,

IX:20,V:5), e una demenza tipo Malattia di Alzheimer, in 2 pazienti (VI:2, VI:3).

I.D.	DIAGNOSI	ESORDIO	Mutazione PSEN2 A85V	Sesso
IV:3	Parkinsonismo	Late Onset ?		Femmina
V:3	Parkinsonismo	Early Onset		Maschio
IX:20	Parkinsonismo	?		Femmina
V:5	Parkinsonismo	Late Onset ?		Femmina
VI:2	M. di Alzheimer	?		Maschio
VI:3	M. di Alzheimer	?		Maschio
VII:5	M. a Corpi di Lewy	Late Onset	Si	Femmina
VII:7	M. a Corpi di Lewy	Early Onset	Si	Femmina
VIII:4	M. di Alzheimer	Late Onset	Si	Femmina
IX:12	M. di Alzheimer	Late Onset	Si	Femmina
V:13	Psicosi	Early Onset		Femmina
IX:13	M. a Corpi di Lewy	Late Onset	Si	Femmina

Tabella 1. Pazienti affetti da malattie riconducibili a una forma neurodegenerativa primaria.

L'età media di insorgenza della malattia è di 67,3aa con una età minima di insorgenza a 54aa e un età massima a 76aa.

Il rapporto Femmine:Maschi è di 3:1.

Verranno ora descritti i soggetti affetti da malattie neurologiche degenerative di cui si conoscono i soli dati anamnestici ottenuti dagli informatori della famiglia.

IV:3 Deceduta all'età di 93aa, allettata per 15aa con una storia clinica di disturbi della deambulazione.

V:3 Deceduto all'età di 60aa con una storia clinica di “paralisi progressiva (sopranucleare?)”.

VII:5 Storia clinica di sindrome extrapiramidale, senza apparenti deficit cognitivi.

V:5 Deceduta all'età di 89aa, allettata da 15aa con una storia clinica di disturbi della deambulazione.

VI:2 Diagnosi di Malattia di Alzheimer.

Verranno descritti di seguito i pazienti di cui siamo in possesso di maggiori dati clinici e alcuni dei quali sono stati valutati in maniera diretta presso il Servizio di Neuropsicologia o presso la Clinica Neurologica di Sassari.

3.9. Casi clinici

Paziente VI:3

Diagnosi clinica: Malattia di Alzheimer

Paziente nato nel 1920. È deceduto prima che potesse giungere alla nostra osservazione, pertanto non è stato possibile eseguire i test genetici. Viene riferito dal nostro informatore che era stata formulata una diagnosi di Malattia di Alzheimer.

Paziente VII:5

Diagnosi clinica: Malattia di Alzheimer; Malattia di Parkinson

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Mutazione: A85V di Presenilina 2

Genotipo ApoE: e3/e3

La paziente è nata nel 1921, non è giunta alla nostra osservazione, tuttavia è stato possibile effettuare i test genetici e conoscere parte della storia clinica dove risulta un esordio con Parkinsonismo.

E' affetta da Demenza con deliri, allucinazioni e Parkinsonismo, gambe e braccia “paralizzate” da circa 15 aa, tuttavia la diagnosi clinica non è stata mai chiarita nel senso che sono state poste diverse diagnosi da differenti neurologi, sia di Malattia di Alzheimer che di malattia di Parkinson. Il quadro clinico tuttavia viene descritto come molto simile a quello della paziente VII:7, pertanto compatibile con una Demenza tipo Malattia a Corpi di Lewy.

Paziente VII:7

Diagnosi clinica: Malattia a Corpi di Lewy

Mutazione: A85V di Presenilina 2

Genotipo ApoE: e3/e3

Nata nel 1923. Scolarità: Laurea in lettere moderne all'età di 54 anni con eccellente tesi. Aveva lavorato come impiegata all'età di 19 anni. Insegnava come supplente prima di laurearsi.

Microcitemica, Ex fumatrice, nel 1978 Tiroidectomia subtotale, segue ipotiroidismo subclinico, ulcera gastrica, isterectomia dopo il 3 parto.

ESORDIO

Nel 1983 all'età di circa 60aa cambiamento della personalità. La paziente aveva smesso di guidare, insorgenza di disturbi di tipo

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

ossessivo per l'aspetto fisico e cura eccessiva della persona, insorgenza di manie e fissazioni, in particolare la disturbava il fatto sia di essere vista sia fuori di casa che in casa da altre persone. Insorgenza di stato ansioso, depressione e insonnia. Insorgenza di idee deliranti, allucinazioni visive.

EVOLUZIONE

Nel 1997 all'età di 74aa veniva valutata presso la Clinica Neurologica di Sassari, lamentava l'insorgenza di turbe dispeptiche, depressione del tono dell'umore e stato ansioso. Comparsa di “un problema al braccio”(tremore?) come quello della sorella (VII:5), veniva formulata una diagnosi di sindrome depressiva.

Nel 1998 all'età di 75aa viene valutata dallo psichiatra per un grave stato depressivo, era presente un notevole tremore al braccio, incapacità organizzative, deficit di comprensione, calo ponderale, bradicinesia, amimia, illusioni, turbe della postura e della stazione eretta, flessione del busto in avanti, allucinazioni visive complesse. Perdita delle competenze prassiche, paura di uscire e di rimanere sola, deliri.

Nel 1999 all'età di 76aa veniva valutata in Clinica Neurologica, si rilevavano una prosopoagnosia, turbe mnesiche, dell'orientamento, impoverimento del linguaggio, rallentamento motorio, alterazione della coordinazione, afasia anomica. Viene formulata una diagnosi di Malattia di Alzheimer e inizia terapia con Donepezil con successivo miglioramento del quadro allucinatorio e depressivo. Eseguiva una TC encefalo che mostrava un quadro di grave atrofia cortico-sottocorticale

e calcificazioni bilaterali dei nuclei della base in corrispondenza dei nuclei lenticolari.

Sempre nello stesso anno veniva formulata una diagnosi ortopedica di insufficienza deambulatoria su probabile base arteriosclerotica cerebrale.

Nel 2000 all'età di 77aa viene rivalutata presso la Clinica Neurologica e si identifica un lieve parkinsonismo, per cui viene intrapresa una terapia con Amantadina.

Sempre nello stesso anno è vittima di un episodio di caduta a terra con frattura del collo del femore destro. Trattata chirurgicamente con stecca e viti metalliche. Segue una precipitazione del quadro clinico, perdita completa dell'autonomia, importanti deliri, allucinazioni e aggressività.

Esegue inoltre un RX bacino e femore: che evidenzia una condizione di osteoporosi.

Nel 2001 all'età di 78aa viene valutata presso il Laboratorio di Neuropsicologia Clinica della Clinica Neurologica, presenta un grave quadro di afasia globale associato ad un parkinsonismo rigido con distonia delle mani e impossibilità a mantenere la stazione eretta non valutabile il quadro cognitivo, MMSE non somministrabile. Perdita completa dell'autonomia ADL 1; IADL 0 . Viene formulata la diagnosi di Malattia a Corpi di Lewy, prosegue la terapia con Donepezil.

Nel 2003 all'età di 80aa presenta un grave peggioramento del quadro dementigeno. Esegue una TC encefalo che mostrava la presenza di calcificazioni in corrispondenza dei nuclei lenticolari e segni di marcata atrofia cortico-sottocorticale.

Sempre nello stesso anno viene ricoverata presso la Clinica Neurologica per gravi disturbi della deglutizione, che richiede il posizionamento di una PEG poi non eseguito.

Nel 2004 all'età di 81aa la paziente è costretta a letto con grave sindrome extrapiramidale (Parkinson rigido, gli arti inferiori sono flessi, tono muscolare marcatamente aumentato, grave difficoltà nella deglutizione)

La paziente è deceduta nell'agosto del 2005, è stato eseguito il prelievo dell'encefalo per il riscontro autoptico presso l'Istituto di Anatomia Patologica della nostra Università ed inviato per lo studio neuropatologico presso l'Istituto C. Besta di Milano.

NEUROPATOLOGIA

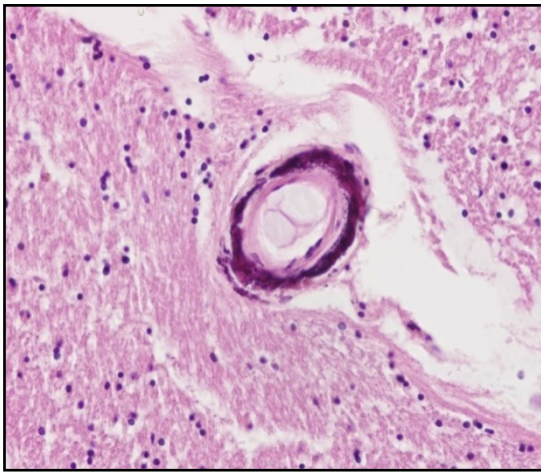


Figura 7. Calcificazioni vascolari.

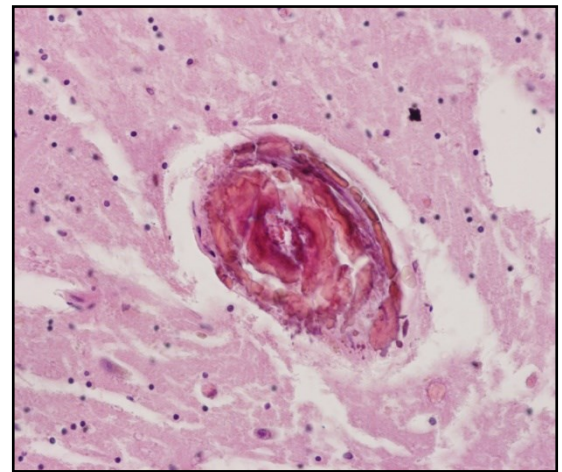


Figura 8. Angiopatia amiloidea.

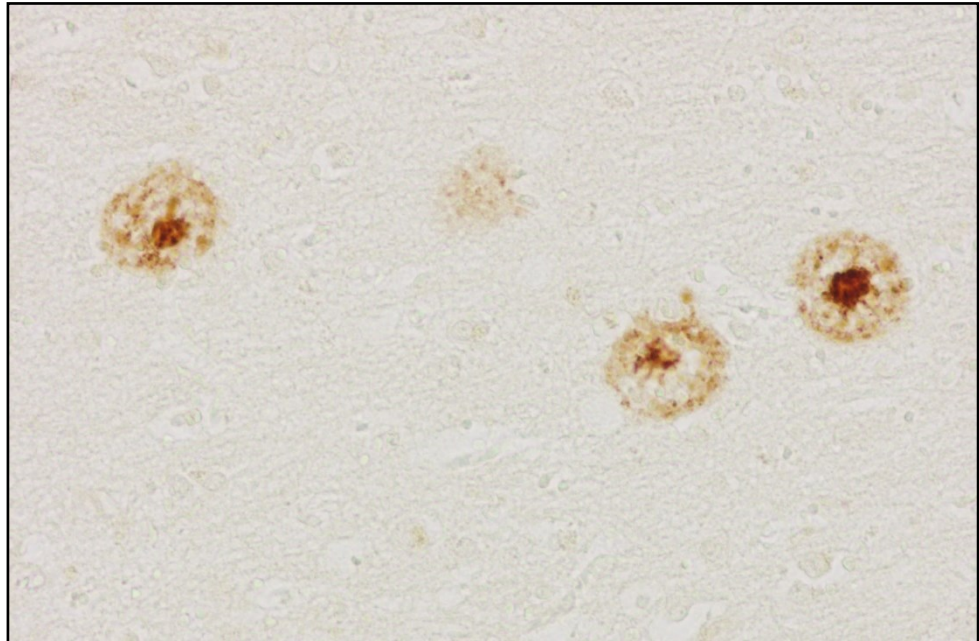
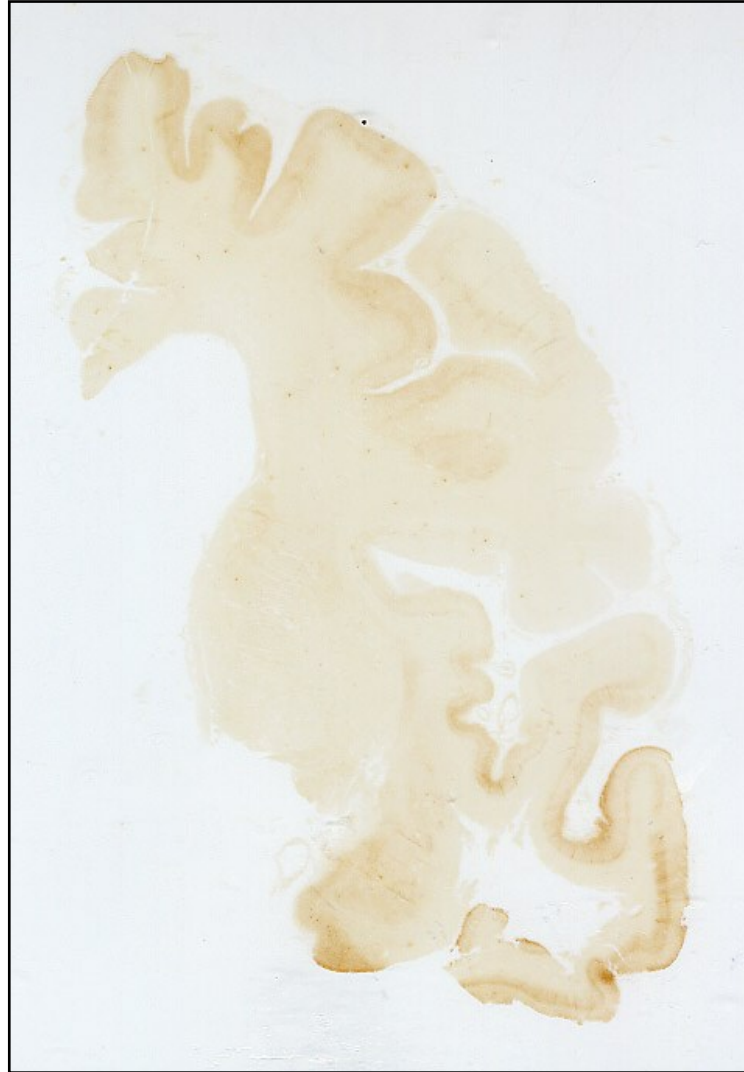


Figura 9. beta-Amiloide

Figura 10. FosfoTau (AT8).



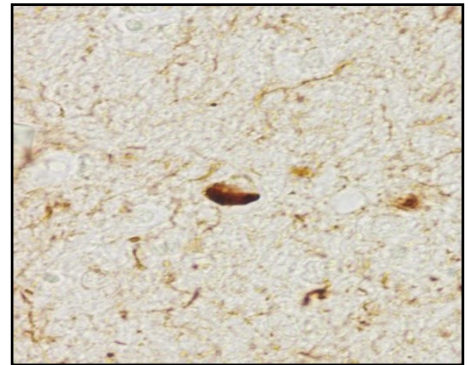
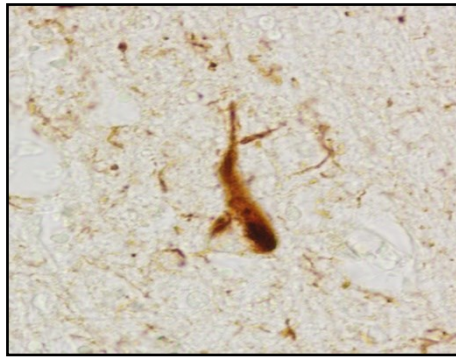


Figura 11. FosfoTau.

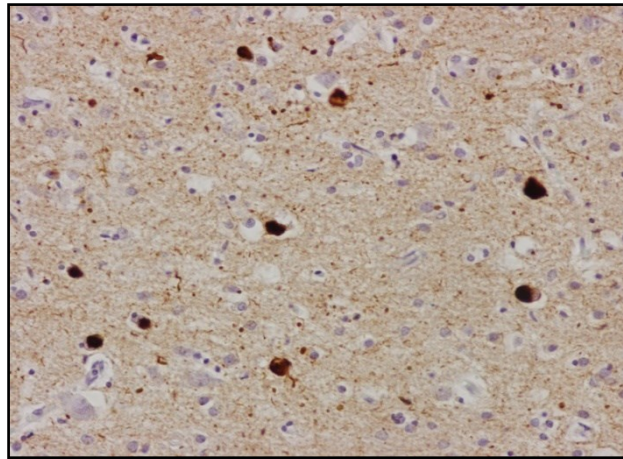


Figura 12. alfa-Sinucleina.

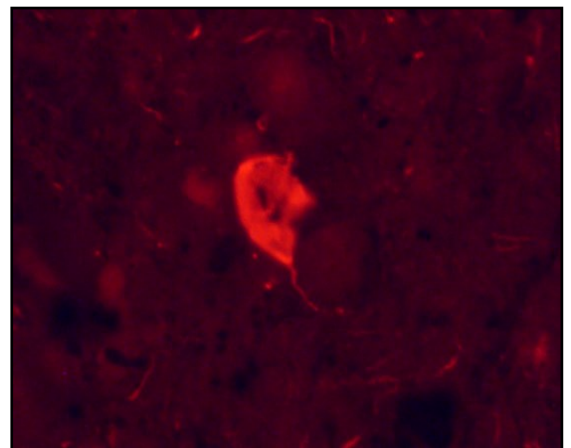
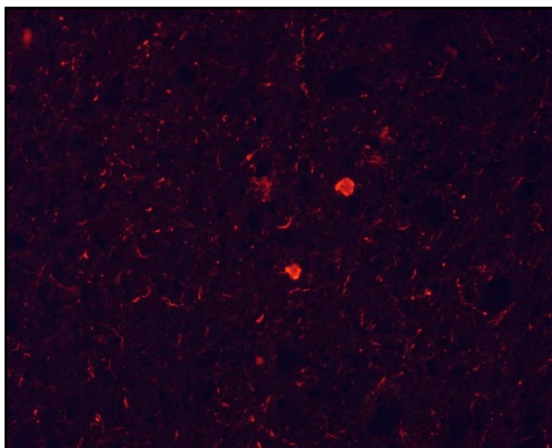


Figura 13. FosfoTau.

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

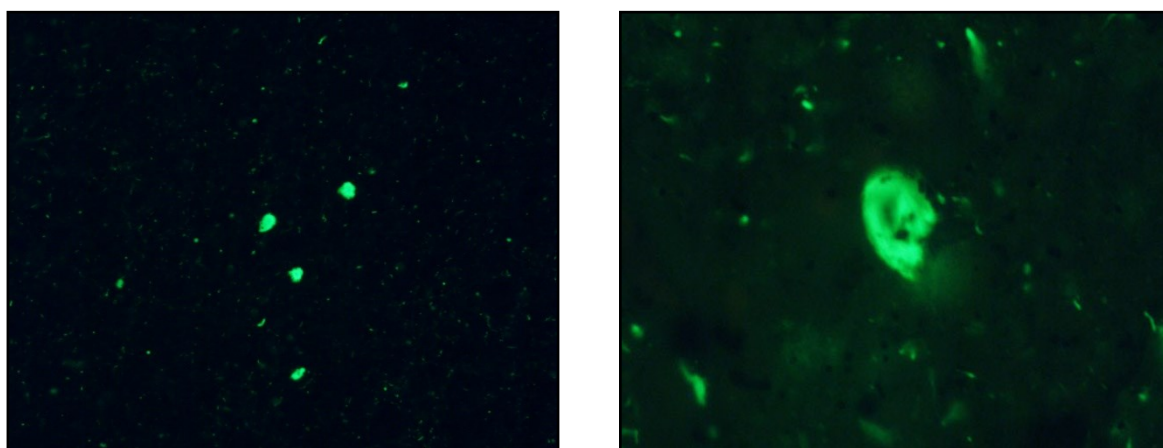


Figura 14. alfa-Sinucleina.

Colocalizzazione FosfoTau/alfa-Sinucleina.

Paziente VIII:4

Diagnosi clinica: Malattia di Alzheimer

Mutazione: A85V di Presenilina 2

Genotipo ApoE: e3/e3

Nata nel 1925. Scolarità: V ginnasio, casalinga.

Turbe gastroenteriche insorte intorno ai 50aa.

ESORDIO

Nel 1998 all'età di 73aa comparsa di disturbi ingravescenti della memoria episodica, disorientamento topografico, buona l'autonomia.

Eseguiva una TC encefalo che mostrava grossolane calcificazioni dei nuclei pallidi bilateralmente, modesta dilatazione degli spazi liquorali e del sistema ventricolare con segni di atrofia.

EVOLUZIONE

Nel 1999 all'età di 74aa, nuovo episodio di disorientamento topografico, paura di uscire di casa e insorgenza di depressione del tono dell'umore. Inizia ad assumere Zoloft 1 cp/die ed Exelon 4,5mg x 2/die che portano ad un miglioramento del tono dell'umore ha ripreso a leggere e a guardare la TV. Autonoma per l'igiene personale.

Nel 2000 all'età di 74aa viene valutata presso il Servizio di Neuropsicologia Clinica della Clinica Neurologica, assume Exelon 4,5mg x 2/die, che ha determinato un miglioramento del quadro clinico, ha ripreso le attività domestiche e a coltivare il giardino, buon recupero delle funzioni mnesiche.

Esegue una valutazione neuropsicologica che evidenzia un quadro di decadimento cognitivo globale con deficit marcato della memoria a lungo termine e della memoria episodica, con aprassia costruttiva e deficit di attenzione, afasia anomica e iniziale disgrafia. Il quadro è compatibile con un decadimento cognitivo su base degenerativa. Viene formulata la diagnosi di Malattia di Alzheimer.

Nel 2000 all'età di 75aa, buone condizioni generali, assume Exelon 4,5mg x2/die, persistono invariati i deficit mnesici, relativamente autonoma nel quotidiano. Vengono riferiti episodi di incontinenza sfinterica.

Nel 2001 all'età di 76 aa, quadro in evoluzione, comparsa di dolori muscolari e tremori diffusi.

Nel 2002 all'età di 77aa, peggioramento della deambulazione e quadro cognitivo stazionario.

Nel 2004 all'età di 79aa, cammina con sostegno si siede a tavola e mangia da sola. Afasica, grave il deficit mnesico, anomia importante, tremore alla mano destra, rigidità agli arti e al tronco, cammina con aiuto. Eseguiva una TC encefalo che evidenziava una marcato quadro di atrofia cortico-sottocorticale con grossolane calcificazioni a carico dei nuclei pallidi.

Valutazione neuropsicologica Aprile del 2000:

TEST	Punteggio	Punteggio corretto	Valori Normali
MMSE	14	14,75	≥ 23,8
MODA	68	69,7	92,8 ± 4,5
Matrici di Raven	14	16,6	≥ 18,6
Test dei Gettoni	28	27	31,31 ± 3,48
Memoria di Prosa	4,1	4,35	11,43 ± 3,48
Span Verbale	3	3	3,73 ± 0,73
Span Visuo-spaziale	3	3,25	4,24 ± 1,11
Supra Span Verbale	18	29	86 ± 44,6
Non Casuali	3	14	50,19 ± 50,3
Differite	3	3,5	6,1 ± 2,55
Supra Span Spaziale	1,14	4,64	13,36 ± 6,70
Attenzione	12	13,75	41,59 ± 9,61
Aprassia Costruttiva	5	4,5	11,43 ± 2,41

Valutazione neuropsicologica: quadro di decadimento cognitivo globale con deficit marcato della memoria a lungo termine e della memoria episodica, con aprassia costruttiva e deficit di attenzione, afasia anomica e iniziale disgrafia. Il quadro è compatibile con un decadimento cognitivo su base degenerativa.

Esame del Linguaggio: quadro di afasia anomica con disgrafia.

Paziente IX:12

Diagnosi clinica: Malattia di Alzheimer

Mutazione: A85V di Presenilina 2

Genotipo ApoE: e3/e3

Nata il 31/07/1928. Scolarità: II liceo classico, casalinga, ex fumatrice.

Affetta da ipertensione arteriosa, cardiopatia ischemica, glaucoma, osteoporosi, adenoma surrenalico.

ESORDIO

Nel Febbraio del 2001 all'età di 73aa visita neurologica lamenta degli episodi di caduta a terra con trauma cranico insorti da alcuni mesi. Disturbo ansioso-depressivo. Assenza di segni extrapiramidali. Difficoltà a mantenere la stazione eretta con difficoltà a controllare il tronco.

Nel Giugno 2001 esegue un EEG risultato privo di segni elettrici indicativi di sofferenza cerebrale o tipici di comizialità.

Nel Dicembre 2001 lamenta deficit di attenzione e di memoria. Vista dal neurologo non venivano rilevati segni extrapiramidali.

EVOLUZIONE

Nel 2002 all'età di 74aa viene vista presso il nostro Laboratorio, lamenta il persistere dei disturbi della memoria episodica, e le turbe dell'umore di tipo depressivo, perfettamente autonoma nelle attività del quotidiano benché da alcuni mesi era comparsa un'insicurezza

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

nella deambulazione. Non si presta alla valutazione neuropsicologica formale. Viene formulata una diagnosi di MCI Amnesico in attesa di poter eseguire una valutazione neuropsicologica completa.

Nel 2003 all'età di 75aa si rileva un peggioramento del quadro cognitivo, manifestatosi in seguito ad intervento di cataratta. Esegue una valutazione neuropsicologica in base alla quale viene formulata la diagnosi di Malattia di Alzheimer. Alla TC encefalo si evidenziava una condizione di atrofia cortico-sottocorticale.

Nel 2006 all'età di 78aa la paziente presenta un ulteriore peggioramento del quadro cognitivo, disturbi comportamentali con facile irritabilità, talvolta stati di agitazione psichica. Non presenta turbe di tipo parkinsoniano. Perdita completa dell'autonomia. Esegue una valutazione neuropsicologica che conferma la diagnosi di Malattia di Alzheimer Probabile.

Valutazione neuropsicologica del Settembre 2003

TEST	Punteggio	Punteggio corretto	Valori Normali
MMSE	21	20,86	≥ 23,8
Aprassia Costruttiva	7	7,25	11,43 ± 2,41

Valutazione neuropsicologica dell'Ottobre 2006.

TEST	Punteggio	Punteggio corretto	Valori Normali
MMSE	18	17,86	≥ 23,8
Matrici di Raven	12	15,3	≥ 18,96
Test dei Gettoni	29	29,25	31,31 ± 3,48
Memoria di Prosa	0,5	1,5	≥ 7,5
Span Verbale	4	4,25	≥ 3,75
Span Visuo-spaziale	2	2,5	≥ 3,5
16 parole non correlate sem.	14	19,3	≥ 25,14
RD	0	1,3	≥ 3,44
Riconoscimento parole	16	17	≥ 22,02
Fluidità Verbale	23	27,7	≥ 17,35
Fluidità Verbale per	9,5	11,25	≥ 7,25
AAT Denominazione	104	8	≥ 8
Attenzione	18	21,5	41,59 ± 9,61
Aprassia Costruttiva	5	5,25	11,43 ± 2,41

Valutazione neuropsicologica: disorientamento spazio-temporale, compromissione del ragionamento astratto e grave deficit della memoria a lungo termine episodica e dell'attenzione selettiva. Aprassia costruttiva.

Paziente V:13

Diagnosi clinica: Psiconevrosi nevrastenica (formulata nel 1957)

Nata il 16 aprile 1899, insegnante elementare, storia di fibroma uterino, è deceduta all'età di 73aa per un Carcinoma Pancreatico.

È stata ricoverata presso il nostro Istituto nel 1957.

Dottoranda Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

ESORDIO

All'età di 54aa compare uno stato ansioso accompagnato da paura di morire e di “impazzire”.

EVOLUZIONE

Al momento del ricovero del 1957 all'età di 58aa, oltre alla suddetta sintomatologia lamenta una profonda astenia, mentre di recente è insorto un disturbo dispeptico che agli accertamenti non è stato dimostrato in relazione a lesioni organiche. La paziente è già in terapia con SERPASIL, LARGACTIL, NEMBUTAL. Tre giorni dopo viene ricondotta a casa dai figli senza che siano stati consultati i medici.

Viene ricoverata nuovamente nel 1958 all'età di 59aa viene trattata con Boli di Insulina (40-80 UI) e pratica sedute di Elettroshock che poi continuerà ambulatorialmente fino a otto applicazioni complessive nell'arco di due anni.

Nei controlli successivi dal 1960 al 1965 si rileva: psicosi ossessivo compulsiva, con paura di farsi del male o fare del male agli altri, timore di compiere atti sconsiderati in pubblico, idee deliranti e umore depresso. È stata trattata con antidepressivi triciclici e neurolettici e benzodiazepine (TOFRANIL, NOZINAN, SERENASE, LIBRIUM).

Gli esami obiettivi neurologici eseguiti durante il ricovero e nei successivi controlli non mostravano dati patologici di rilievo.

Paziente IX:13

Diagnosi clinica: Malattia a Corpi di Lewy

Mutazione: A85V di Presenilina 2

Genotipo ApoE: e3/e3

Nata nel 1927, scolarità 9aa, fumatrice.

Affetta da epatite C, emitiroidectomia, glaucoma, istero-salpingo-ovariectomia, fibrillazione atriale, tremori agli arti inferiori, turbe dell'umore di tipo depressivo con una sindrome ossessivo - compulsiva.

ESORDIO

Nel 2003 all'età di 76aa ha cominciato a manifestare dei deficit cognitivi con comparsa di turbe della memoria episodica recente, idee deliranti di tipo persecutorio, fenomeni allucinatori confuso-onirici ad andamento fluttuante.

EVOLUZIONE

Nel 2004 progressivo aggravamento dei deficit cognitivi con insorgenza di aggressività, disorientamento spaziale, aprassia ideativa e disturbi comportamentali che hanno portato all'uso di neurolettici. Concomitava una difficoltà a mantenere la stazione eretta con tendenza alle cadute.

Sempre nel 2004 all'età di 77aa viene ricoverata presso la nostra Clinica per l'insorgenza di uno stato confusionale associato a iperpiressia e disartria e stato soporoso.

Eseguiva tra gli altri accertamenti una TC encefalo che non mostrava alterazioni della tomografia computerizzata dei tessuti cerebrali ma una condizione di atrofia cortico-sottocorticale.

La paziente è deceduta nel gennaio 2005 è stato eseguito il prelievo dell'encefalo per il riscontro autoptico presso l'Istituto di Anatomia Patologica della nostra Università ed inviato per lo studio neuropatologico presso l'Istituto C. Besta di Milano, l'esame è tutt'ora in corso.

4. RISULTATI

4.1. Ricostruzione genealogica della famiglia

Per la ricostruzione genealogica vale il principio definito “ a tappeto” [117]. Vanno cercati e acquisiti contemporaneamente i dati su tutte le branche della famiglia che provengono dagli atti di nascita, matrimonio, morte (battesimo e sepoltura quando rilevati dagli archivi parrocchiali). Tutti i soggetti legati alla famiglia che è in osservazione, non solo da relazioni genetiche (genitore - figlio) ma anche da relazioni di parentela acquisite via matrimonio, vengono inseriti nello studio.

La ricostruzione dell'albero inizia dalle informazioni fornite dai familiari dei pazienti affetti che consentono di avviare la ricerca condotta all'Archivio Storico Diocesano di Sassari (ASDSS) grazie all'utilizzo dei “Quinque Libri”.

L'11 Novembre del 1563 il Concilio di Trento impose alle chiese di registrare ogni matrimonio e battesimo. Monsignore Giancarlo Zichi



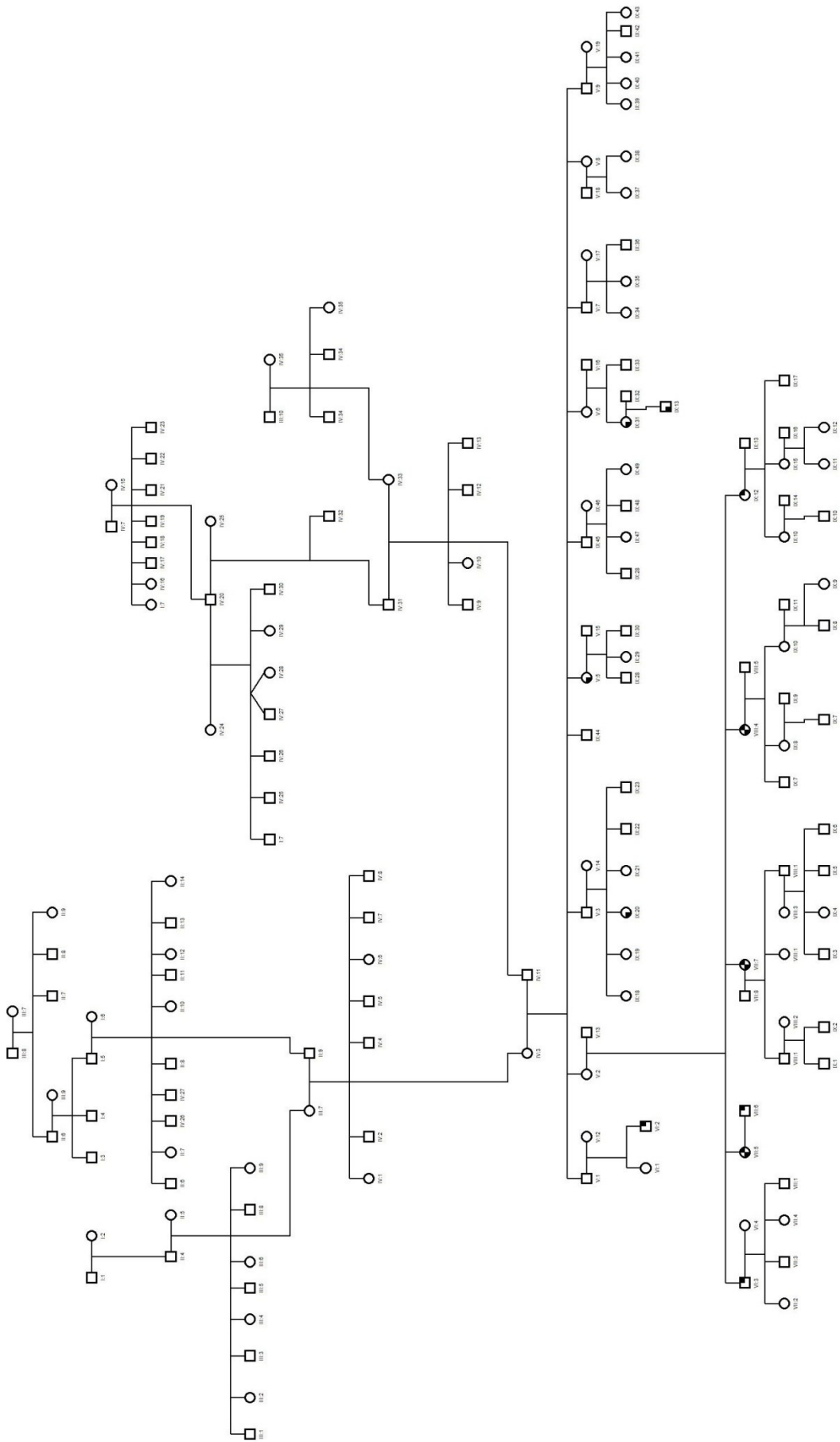
(presidente dell'ASDSS) ha raccolto i "Quinque Libri" di tutte le parrocchie storiche di Sassari, dove sono riportati tutti gli atti di

matrimonio e di battesimo che sono stati celebrati nelle parrocchie storiche Sassaresi dal 1570 al 1900.

4.2. Albero genealogico della famiglia

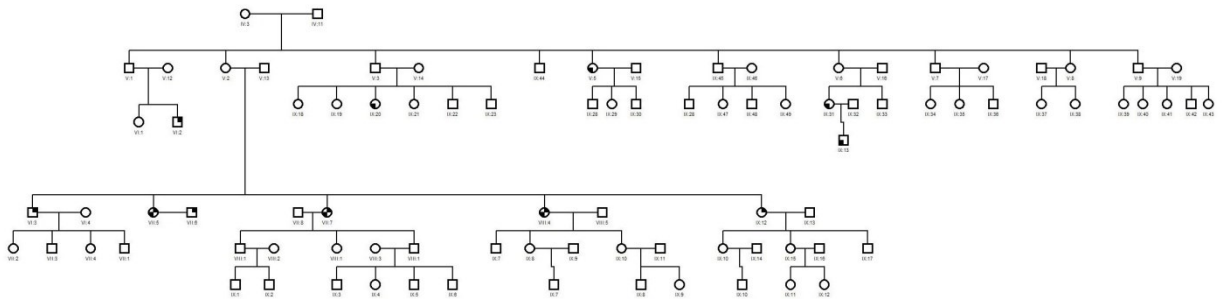
All'interno dei Quinque Libri gli atti riguardanti la famiglia oggetto del nostro studio sono interamente scritti in latino e a mano per cui la ricostruzione genealogica risulta essere un lavoro piuttosto lungo e complesso grazie al quale è stato possibile ricostruire l'albero genealogico della famiglia fino al 1700 (mostrato sotto).

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari



Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Grazie alle interviste fatte ad alcuni parenti dei pazienti affetti da patologia neurodegenerativa e portanti la mutazione PSEN2 A85V è stato possibile ricostruire la parte più recente dell'albero (comprendente membri ancora in vita o morti recentemente), la correttezza delle informazioni è stata comunque verificata al ASDSS. Tale porzione dell'albero genealogico è riportata di seguito:



Successivamente si sono ricercati gli atti di matrimonio, di battesimo e di morte degli altri membri della famiglia ed è stata così possibile la ricostruzione della genealogia.

4.3. Valutazione dello stato clinico

Lo step successivo alla ricostruzione genealogica è la valutazione dello stato clinico di ciascun componente della famiglia allo scopo di individuare il fondatore della mutazione PSEN2 A85V.

Dottoranda Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Le informazioni indirette sullo stato di salute dei soggetti, recuperabili attraverso le fonti neutre (atti di morte, sepoltura, cause di morte) sono relativamente poche e generalmente non sufficienti tuttavia sono purtroppo le uniche fonti di cui noi disponiamo per il recupero di informazioni riguardanti lo stato clinico.

4.3.1. Il Comune di Ploaghe

Il Comune di Ploaghe custodisce in appositi archivi gli atti di morte di tutti i cittadini nati in questo comune e morti dal 1936 fino al giorno d'oggi. Abbiamo pertanto chiesto l'autorizzazione del Sindaco, il Dott. Francesco Baule, per poter consultare tali archivi.

L'atto di morte è un documento nel quale si attesta che un cittadino è deceduto, viene riportato in questo documento il nome, la data di nascita e altre informazioni tra cui la causa del decesso.

Abbiamo così cercato e acquisito tutti gli atti di morte (che il Comune di Ploaghe disponeva) dei membri appartenenti alla famiglia oggetto del nostro studio, come mostrano le figure sotto

Numero del corrispondente foglio di famiglia 27

Libretto di lavoro N. 1540 Serie Ann 12 APR. 1958

Annotationsi relative ai censimenti: Cens. 1936 (S. F. 175), Cens. 1951 (S. F. 185), Cens. 1961 (S. F. 134)

Sesso maschile

per i Comuni che adottano la collocazione dei fogli secondo una numerazione progressiva (Art. 5 lett. A)

ABITAZIONI

R. Foglio	DATA di occupaz.	Via, Piazza o Casale	N. Civico	Piano	Accertamento alla data del censimento
1	21.3.36	[redacted]	19		
2	11.4.41	[redacted]	10		
3	1.1.41	[redacted]	21		
A	1.1.49	[redacted]	24		
			54	T. 81	
			52	S. I. P. III	

RENDEMENTI I.N.P.S.
3035792 SC. 1007

PENSIONI I.N.P.S.
Post. 50080150 Cat. V02

Professione o condizione
Mauriano

Stato Civile:
figlio di [redacted] e di [redacted]
il 30-5-1908 nato a Ploaghe
(Atto N. 07 P. 1 S. 1)
Stato Civile: celibe
Coniugato di [redacted] addi 25.11.1944
in Ploaghe (Atto N. 35 P. 1 S. 1)
Vedovo di [redacted] addi 4.5.1976
deceduta in Ploaghe (Atto N. 19 P. I S. 1)
A nuove nozze con [redacted] addi [redacted]
in [redacted] (Atto N. [redacted] P. [redacted] S. [redacted])
Professione o condizione: Mauriano

DATA della 1. iscrizione: 10/11/1958
Numero della posizione relativa alla iscrizione: 1

Eliminato dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Reiscritto nel registro addi _____ per immigrazione dal Comune di _____
Provincia di _____ o dall'estero, dallo Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato per morte avvenuta in Ploaghe addi 14.6.1989
causata da leucemia (Atto N. 07 Parte I Serie _____)

INDICAZIONI FACOLTATIVE

Cittadinanza CITTADINANZA ITALIANA

Data del proscioglimento dall'obbligo dell'istruz. _____

Vaccinazione: data _____ esito _____

Rivaccinazione: data _____ esito _____

Esito di leva _____

ERAZIA FRIANA

CARTA D'IDENTITÀ		
Numero	Data	Comune che l'ha rilasciata
<u>13636973</u>	<u>7.7.1970</u>	<u>Ploaghe</u>

NOTIZIE VARIE (onorificenze cavalleresche, scientifiche, titoli di studio, condanne, ecc.) _____

PRESTITI FAMILIARI _____

Figura 15. Fronte e retro atto di morte V:9.

Dottorressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Numero del corrispondente foglio di famiglia _____ Libretto di lavoro N. _____ Serie _____ Anno _____

per i Comuni che adottano la collocazione dei fogli secondo una numerazione progressiva (Art. 5 lett. A)

Annotazioni relative ai censimenti	Cens. 19 86	Cens. 19 87	Cens. 19 88	Sesso femm.
	Sez. 3 F. 66	Sez. 3 F. 76	Sez. 3 F. 57	

ABITAZIONI

N. foglio	DATA di occupaz.	Via, Piazza o Casale	N. Civico	Primo	Accertamento alla data del censimento
1	21-1-86	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

Cognome _____
Nome _____
figlia di _____ e di _____
nata a Peaghe
il 19-11-1955 (Atto N. 106 P. 20 S. _____)
Stato Civile: Coniugata
Coniugata con _____ addi 25-8-918
in _____ (Atto N. 18 P. 1 S. A)
Vedova di _____ addi 23-4-1952
deceduto in Peaghe (Atto N. 22 P. 1 S. P)
A nuove nozze con _____ addi _____
in _____ (Atto N. 21 P. _____ S. _____)
Professione o condizione Catalunga

PENZIONATI I.N.P.S.
Cert. N. 511600 Cat. 95
Pein Gecchi Civili
N. 08470383

DATA della 1. iscrizione	PROVENIENZA	Numero della posizione relativa alla iscrizione
<u>Pein Gecchi</u>	<u>Catalunga</u>	

Eliminata dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Reinscritta nel registro addi _____ per immigrazione dal Comune di _____
Provincia di _____ o dall'estero, dallo Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminata dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminata per morte avvenuta in Peaghe addi 29-8-1984
causata da malattia senile (Atto N. 11 Parte I Serie _____)

INDICAZIONI FACOLTATIVE

Cittadinanza **CITTADINANZA ITALIANA**
Data del proscioglimento dall'obbligo dell'istruzione _____
Vaccinazione: data _____ esito _____
Rivaccinazione: » _____
Esito di leva _____
RAZZA ARIANA

CARTA D'IDENTITA		
Numero	Data	Comune che l'ha rilasciata

NOTIZIE VARIE (onorificenze cavalleresche, scientifiche, titoli di studio, condanne, ecc.) _____

PRESTITI FAMILIARI _____

Figura 16. Fronte e retro atto di morte V:5.

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Numero del corrispondente foglio di famiglia 88				Libretto di lavoro N. _____ Serie _____ Anno _____		
per i Comuni che adottano la collocazione dei fogli secondo una numerazione progressiva (Art. 5 lett. A)				Annotazioni relative ai censimenti		
				Cens. 1936 Ser. 5 F. 75	Cens. 1951 Ser. 2 F. 35	Cens. 1961 Ser. 3 F. 156
				Sesso maschile		
ABITAZIONI						
N. d'ord.	DATA di occupaz.	Via, Piazza o Casale	N. Civico	Alloggio	Accertamento alla data del censimento	
1	21-2-56	[redacted]	19			
2	30-10-48	[redacted]	35			
3	11-9-51	[redacted]	1			
Cognome _____ Nome _____ figlio di _____ e di _____ nato a <u>Floraghe</u> il <u>28-9-1902</u> (Atto N. <u>100</u> P. <u>IV</u> S. ...)						
Stato Civile: <u>celibe</u>						
Coniugato con _____ addì <u>20-10-1943</u> in <u>Floraghe</u> (Atto N. <u>19</u> P. <u>II</u> S. <u>A</u>)						
Vedovo di _____ addì <u>27-3-1956</u> deceduta in <u>Floraghe</u> (Atto N. <u>13</u> P. <u>I</u> S. ...)						
A nuove nozze con _____ addì _____						
Professione o condizione <u>Prof. Cappelli</u> DATA della 1. iscrizione <u>Floraghe</u> PROVENIENZA <u>Floraghe</u>						
PENSIONATI I.N.P.S. Cert. N. <u>2232/15</u> Cat. <u>10</u>						

Eliminato dal registro addì _____ per emigrazione nel Comune di _____
 Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Reiscritto nel registro addì _____ per immigrazione dal Comune di _____
 Provincia di _____ o dall'estero, dallo Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato dal registro addì _____ per emigrazione nel Comune di _____
 Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato per morte avvenuta in Floraghe addì 3-10-1974
 causata da infarto miocardico (Atto N. 33 Parte I Serie _____)

INDICAZIONI FACOLTATIVE

Cittadinanza **CITTADINANZA ITALIANA**

Data del proscioglimento dall'obbligo dell'istruzione _____

Vaccinazione: data _____ esito _____

Rivaccinazione: " _____

Esito di leva _____

RAZZA ARIANA

CARTA D'IDENTITÀ		
Numero	Data	Comune che l'ha rilasciata
37.883.147	27.1.1968	Floraghe

NOTIZIE VARIE (onorificenze cavalleresche, scientifiche, titoli di studio, condanne, ecc.) _____

PRESTITI FAMILIARI _____

Figura 17. Fronte e retro atto di morte V:7.

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Numero del corrispondente foglio di famiglia 1153 Libretto di lavoro N. _____ Serie _____ Anno _____

per i Comuni che adottano la collocazione dei fogli secondo una numerazione progressiva (Art. 5 lett. A)

Annotationsi relative ai censimenti	Cens. 19 <u>46</u> Ser. <u>2</u> F. <u>157</u>	Cens. 19 <u>51</u> Ser. <u>2</u> F. <u>157</u>	Cens. 19 <u>51</u> Ser. <u>2</u> F. <u>160</u>	Sesso <u>✓</u> femm.
-------------------------------------	---	---	---	-------------------------

ABITAZIONI

N. Fogli	DATA di occupaz.	Via, Piazza o Casale	N. Civico	Plano	Accertamento alla data del censimento
1	21/11/46	u u u	52	1°	
	19/11/46	u u u	52	1°	

Cognome _____
Nome _____
figlia di _____ e di _____
nata a Peoaghe
il 16-6-1899 (Atto N. 43 P. 3 S. 1)
Stato Civile: Comunicato
Coniugata _____ addì 5-5-1921
in Peoaghe (Atto N. 1 P. 1 S. 9)
Vedova di _____ addì _____
deceduto in _____ (Atto N. _____ P. _____ S. _____)
A nuove nozze con _____ addì _____
in _____ (Atto N. _____ P. _____ S. _____)
Professione, condizione Professionista
DATA della iscrizione _____
PROVENIENZA _____
Numero della posizione relativa alla iscrizione _____

Eliminata dal registro addì _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Reinscritta nel registro addì _____ per immigrazione dal Comune di _____
Provincia di _____ o dall'estero, dallo Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminata dal registro addì _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminata per morte avvenuta in Peoaghe addì 21-2-1972
causata da adeno carcinoma epatico (Atto N. 13 Parte 1 Serie _____)

INDICAZIONI FACOLTATIVE

Cittadinanza CITADINANZA ITALIANA

Data del proscioglimento dall'obbligo dell'istruzione _____

Vaccinazione: data _____ esito _____

Rivaccinazione: » _____ » _____

Esito di leva _____

RAZZA ARIANA

CARTA D'IDENTITÀ		
Numero	Data	Comune che l'ha rilasciata

NOTIZIE VARIE (onorificenze cavalleresche, scientifiche, titoli di studio, condanne, ecc.) _____

ESTITI FAMILIARI _____

Figura 18. Fronte e retro atto di morte V:6.

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Numero del corrispondente foglio di famiglia _____ Libretto di lavoro N. _____ Serie _____ Anno _____

per i Comuni che adottano la collocazione dei fogli secondo una numerazione progressiva (Art. 5 lett. A)

Annotazioni relative ai censimenti	Cens. 1936 Ser. 2 F. 99	Cens. 1947 Ser. 2 F. 95	Cens. 1951 Ser. F.
------------------------------------	----------------------------	----------------------------	-----------------------

Sesso **maschile**

ABITAZIONI			
N. di Unit.	DATA di occupaz.	Via, Piazza o Casale	N. Civico
	1. 11. 1946		20 t

Accertamento alla data del censimento

Cognome _____
 Nome _____
 figlio di _____ e di _____
 nato a _____ il 15. 8. 1894 (Atto N. 2180 P. S.)
 Stato Civile: _____
 Coniugato con _____ addì 26-5-1950
 in _____ (Atto N. 12 P. S.)
 Vedovo di _____ addì _____
 deceduta in _____ (Atto N. P. S.)
 A nuove nozze con _____ addì _____
 in _____ (Atto N. P. S.)
 Professione, condizione _____
 DATA della 1. iscrizione _____
 PROVENIENZA _____
 Numero della posizione relativa alla iscrizione _____

Eliminato dal registro addì _____ per emigrazione nel Comune di _____
 Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Reiscritto nel registro addì _____ per immigrazione dal Comune di _____
 Provincia di _____ o dall'estero, dallo Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato dal registro addì _____ per emigrazione nel Comune di _____
 Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato per morte avvenuta in _____ addì 1. 11. 1961
 causata da _____ (Atto N. 29 Parte I Serie _____)

INDICAZIONI FACOLTATIVE

CHIADINANZA ITALIANA
 Data del proscioglimento dall'obbligo dell'istruz. _____
 Vaccinazione: data _____ esito _____
 Rivaccinazione: _____
 Esito di leva _____

RAZZA ARIANA

CARTA D'IDENTITÀ		
Numero	Data	Comune che l'ha rilasciata

NOTIZIE VARIE (onorificenze cavalleresche, scientifiche, titoli di studio, condanne, ecc.) _____

PRESTITI FAMILIARI _____

Figura 19. Fronte e retro atto di morte IX:45.

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Numero del corrispondente foglio di famiglia 22 Libretto di lavoro N. _____ Serie _____ Anno _____

per i Comuni che adottano la collocazione dei fogli secondo una numerazione progressiva (Art. 5 lett. A)

Annotazioni relative ai censimenti	Cens. 1936 Sez. 5 F. 15	Cens. 1951 Sez. 3 F. 83	Cens. 1957 Sez. _____ F. _____	Sesso maschile
------------------------------------	----------------------------	----------------------------	-----------------------------------	-------------------

ABITAZIONI

N. fogli	DATA di occupaz.	Via, Piazza o Casale	N. Civico	Piano	Accostamento alla data del censimento
1	11.06	[redacted]	129	T.	

Cognome _____
Nome _____
figlio di _____ e di _____
nato a _____ (Ploaghe)
il 0-9-1860 (Atto N. 21 P. I. S.)
Stato Civile: coniugato
Coniugato con _____ addi 25-5-884
in _____ (Atto N. 4 P. 5 S. A.)
Vedovo di _____ addi 16-6-1955
deceduta in _____ (Atto N. 23 P. I. S.)
A nuove nozze con _____ addi _____
in _____ (Atto N. _____ P. _____ S. _____)
Professione e qualificazione Indicatore Costruttore
Comparto di lavoro - in corso di fine

DATA della 1. iscrizione	PROVENIENZA	Numero della posizione relativa alla iscrizione
[redacted]	[redacted]	[redacted]

Eliminato dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Reiscritto nel registro addi _____ per immigrazione dal Comune di _____
Provincia di _____ o dall'estero, dallo Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato per morte avvenuta in Ploaghe
causata da marasma acuto addi 2-4-1957
(Atto N. 21 Parte I Serie _____)

INDICAZIONI FACOLTATIVE

Cittadinanza CITTADINANZA ITALIANA

Data del proscioglimento dall'obbligo dell'istruz. _____

Vaccinazione: data _____ esito _____

Rivaccinazione: * _____ * _____

Esito di leva _____

BAZZA ARIANA

CARTA D'IDENTITÀ		
Numero	Data	Comune che l'ha rilasciata

NOTIZIE VARIE (onorificenze cavalleresche, scientifiche, titoli di studio, condanne, ecc.) _____

PRESTITI FAMILIARI _____

Figura 20. Fronte e retro atto di morte IV:11

Dottoressa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

Numero del corrispondente foglio di famiglia _____ Libretto di lavoro N. _____ Serie _____ Anno _____

per i Comuni che adottano la collocazione dei fogli secondo una numerazione progressiva (Art. 5 lett. A)

Annotationsi relative ai censimenti Cens. 1936 Cens. 19 Cens. 19
 Sez. F. 140 Sez. F. Sez. F.

Spesso maschile

ABITAZIONI

DATA di occupaz.	Via, Piazza o Casale	N. Civico	piano	Accertamento alla data del censimento
21-4-36		12	T.	

Cognome _____
 Nome _____
 figlio di _____ e di _____
 nato a Plodghe
 il 11-2-1896 (Atto N. 13 P. I. S.)
 Stato Civile: coniugato
 Coniugato con _____ addi 2-6-1920
 in Plodghe (Atto N. 13 P. I. S.)
 Vedovo di _____ addi _____
 deceduta in _____ (Atto N. _____ P. _____ S. _____)
 A nuove nozze con _____ addi _____
 in _____ (Atto N. _____ P. _____ S. _____)
 Professione o condizione mol. formaggi

DATA della 1. iscrizione	PROVENIENZA	Numero della posizione relativa alla iscrizione

Eliminato dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
 Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Reiscritto nel registro addi _____ per immigrazione dal Comune di _____
 Provincia di _____ o dall'estero, dallo Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato dal registro addi _____ per emigrazione nel Comune di _____
 Provincia di _____ o all'estero, nello Stato _____ (N. pos. _____)

Eliminato per morte avvenuta in Plodghe addi 14-6-1952
 causata da Primum (Atto N. 29 Parte 1 Serie _____)

INDICAZIONI FACOLTATIVE

CITTADINANZA ITALIANA
 Data del proscioglimento dall'obbligo dell'istruzione _____
 Vaccinazione: data _____ esito _____
 Rivaccinazione: » _____ » _____
 Esito di leva _____

RAZZA ARIANA

CARTA D'IDENTITÀ		
Numero	Data	Comune che l'ha rilasciata

NOTIZIE VARIE (onorificenze cavalleresche, scientifiche, titoli di studio, condanne, ecc.) _____

PRESTITI FAMILIARI _____

Figura 21. Fronte e retro atto di morte V:3

Abbiamo trovato 7 atti di morte di membri appartenenti alla famiglia, tre dei quali risultano morti a causa di “marasma senile”. Con tutta probabilità questi individui erano affetti da una patologia neurodegenerativa causata dalla mutazione PSEN 2 descritta precedentemente. Sebbene sia purtroppo impossibile condurre l’analisi genetica in questi individui per appurare la presenza di tale mutazione, in quanto deceduti da tempo, è possibile effettuare un

Dottorssa Federica Cappelli- Studio archivistico genealogico di una famiglia portatrice di una nuova mutazione del gene PSEN2 (A85V)-Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche, XXVI ciclo-Università degli Studi di Sassari

studio basato sull'analisi della mutazione PSEN2 A85V, analisi genetica dei discendenti ancora viventi, dell'albero genealogico e degli atti di morte.

La mutazione A85V è sicuramente responsabile dello sviluppo di patologie neurodegenerative in quanto tutti i membri della famiglia che presentano la mutazione giunti all'età compresa fra i 60 e i 71 anni si ammalano di una patologia neurodegenerativa. Dall'analisi genetica è emerso che gli altri geni più frequentemente coinvolti con l'alzheimer (PSEN1, APP, TAU, α e β sinucleina) sono perfettamente normali nei pazienti da noi studiati, questo conferma l'ipotesi che sia la mutazione A85V la sola causa dell'insorgenza della malattia, inoltre questa mutazione è omologa ad una mutazione patologica meglio conosciuta (A79V) riguardante il gene PSEN1 responsabile di AD [119]. E per finire il codone 85 del gene PSEN2 è altamente conservato nella scala evolutiva, indicando che l'aminoacido valina in questa posizione sia di fondamentale importanza per il corretto funzionamento della proteina e la sostituzione di questo con l'aminoacido alanina altera la struttura terziaria e la funzionalità della proteina [119] portando alla sovrapproduzione di β -amiloide che innesca il processo neurodegenerativo come spiegato meglio nei paragrafi precedenti.

Dal momento che fra i discendenti almeno 12 erano sicuramente affetti da malattie riconducibili a una forma neurodegenerativa primaria e che le analisi genetiche si sono sempre rivelate positive per la mutazione PSEN2 A85V, inoltre considerando che dall'analisi della modalità di trasmissione della mutazione è emerso che questa si

trasmette con modalità autosomica dominante possiamo dedurre che IV:11, V:5 e V:9 erano verosimilmente portatori di questa mutazione che ha causato lo sviluppo di una patologia neurodegenerativa che ha condotto alla morte degli stessi.

Salvatore era il più anziano, nato nel 1869, ne deduciamo che la mutazione era già presente nella famiglia dal 1869.

4.3.2. Archivio di Stato di Sassari

Per datare la mutazione ci occorrono ulteriori informazioni cliniche e per ottenerle ci siamo rivolti all'Archivio di Stato di Sassari.

Gli Archivi di Stato provvedono alla conservazione di documenti. Oltre alla documentazione statale, unitaria e preunitaria risalente all'Alto Medioevo, conservano gli archivi notarili anteriori agli ultimi cento anni e gli archivi degli enti ecclesiastici e delle corporazioni religiose soppresse, i cui beni vennero confiscati dallo Stato. Possono ricevere in deposito archivi degli enti pubblici (regioni, province, comuni, enti pubblici non territoriali) e archivi privati (di famiglie, personali, di impresa, di istituzioni).

La documentazione conservata negli istituti archivistici consta di circa un milione di pergamene sciolte (oltre a quelle frammiste ad altra documentazione in varie serie archivistiche) e di circa otto milioni di unità tra buste, filze, mazzi, fasci, volumi e registri, per un totale non calcolabile di singoli documenti cartacei e pergamenei. L'insieme del materiale occupa oltre 1.200.000 metri lineari di scaffalature.

Il documento pergameneo più antico è dell'anno 721 e si trova nell'Archivio di Stato di Milano; la prima e rara documentazione cartacea risale al secolo XII, mentre i documenti più recenti sono gli originali delle leggi e decreti che vengono annualmente versati all'Archivio centrale dello Stato.

Gli Archivi di Stato sono istituiti nei capoluoghi di provincia, ma la documentazione che vi si conserva riflette il mutare delle circoscrizioni territoriali nel tempo; gli Archivi di Stato con sede nelle città capitali degli Stati preunitari conservano le carte degli organi centrali di quegli Stati.

L'Archivio centrale dello Stato conserva le carte degli organi centrali dello Stato italiano dopo l'unificazione del Regno. Hanno un proprio archivio storico le due Camere del Parlamento e il ministero degli Affari esteri. Il ministero della Difesa versa agli Archivi di Stato la propria documentazione di carattere amministrativo e gli atti dei tribunali militari, mentre conserva la documentazione di carattere operativo presso gli Uffici storici degli Stati maggiori dell'esercito, della marina e dell'aeronautica.

Vari compiti specifici si collegano alla funzione della conservazione propria degli Archivi di Stato: l'ordinamento degli archivi e la compilazione dei relativi inventari, indici, elenchi di consistenza, guide particolari e tematiche (i vari tipi di strumenti di ricerca, cioè che rendono possibile la consultazione dei documenti); l'assistenza ai ricercatori in sala di studio e le ricerche per corrispondenza; l'acquisizione della documentazione storica degli uffici statali; le edizioni di fonti; l'attività promozionale e didattica; le iniziative di

ricerca scientifica e di valorizzazione dei documenti anche in collaborazione con altri istituti culturali.

I documenti conservati negli Archivi di Stato sono liberamente consultabili con eccezione di quelli riservati per motivi di politica interna e estera, che diventano consultabili 50 anni dopo la loro data, e dei documenti riservati relativi a situazioni puramente private delle persone e di quelli dei processi penali che lo divengono dopo 70 anni. Sono tuttavia ammesse autorizzazioni alla consultazione anticipata per motivi di studio.

Nell'Archivio Storico di Sassari abbiamo consultato le liste di leva dal 1830 al 1925, queste liste contengono le visite militari effettuate a tutti i cittadini di Sassari di sesso maschile una volta raggiunta la maggiore età. I ruoli matricolari dal 1850 al 1925, documenti riguardanti tutti i cittadini di Sassari che abbiano intrapreso una carriera militare. E gli atti della pretura dal 1889 al 1964. Ma la ricerca non ha prodotto informazioni utili allo scopo di individuare il fondatore.

Abbiamo poi consultato gli atti notarili al 1738 al 1906, raccogliendo informazioni curiose e interessanti riguardanti la famiglia oggetto di studio ma nessuna utile per la datazione della mutazione.

Infine abbiamo controllato il registro alienati dal 1934 al 1978 in cui purtroppo non abbiamo individuato nessun membro della famiglia.

5. RIASSUNTO

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia neurodegenerativa che si può presentare in diverse forme; si distinguono infatti le forme familiari (FAD) e quelle sporadiche (SAD). Le forme FAD rappresentano circa il 7-10% dei casi ed è noto dalla letteratura che sono causate da mutazioni in diversi geni candidati, come APP, PSEN1 e PSEN2. Per quanto riguarda il gene PSEN 2 in letteratura sono state descritte in tutto 13 mutazioni. La nostra analisi ha condotto all'identificazione di una nuova mutazione del gene (PSEN 2 A85V), nel codone 85 sull'esone 4, mutazione puntiforme che conduce ad una sostituzione aminoacidica alanina-valina e che porta alla sovrapproduzione del peptide A-beta42 sia *“in vivo”* che *“in vitro”*. Lo scopo del lavoro è la descrizione di un' ampia famiglia originaria del nord Sardegna in cui è stata riscontrata la nuova mutazione PSEN2 A85V, la ricostruzione dell'albero genealogico della famiglia e la raccolta di quante più informazioni possibili allo scopo di risalire al fondatore della mutazione. Abbiamo dapprima verificato che la mutazione fosse effettivamente responsabile dell'insorgenza di patologie neurodegenerative analizzando i diversi casi clinici presenti nella famiglia. Abbiamo quindi ricostruito l'albero genealogico fino al 1700 grazie alla collaborazione con l'Archivio Storico Diocesano di Sassari. Inoltre, attraverso un'analisi approfondita condotta sia all'Archivio del comune di Ploaghe che all'Archivio di Stato di Sassari, è stato possibile capire che la mutazione era già presente

nella famiglia nel 1869 anche se la datazione della mutazione non è stata ancora possibile.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. The Lancet Neurology 2007; 6: 734-46.
2. Oltersdorf T et al. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. Journal of Biological Chemistry 1990, 265, 4492–4497.
3. Hung AY, Selkoe DJ. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of b-amyloid precursor protein. EMBO Journal 1994, 13,534–542.
4. Walter J et al. Ectodomain phosphorylation of β -amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. Journal of Biological Chemistry 1997, 272,1896–1903.
5. Weidemann A et al. Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and β -amyloid precursor protein. Nature Medicine 1997, 3, 328–332.
6. Haass C et al. The Swedish mutation causes early onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. Nature Medicine 1995, 1, 1291–1296.

7. Smith RP et al. Platelet coagulation factor xia-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 1990, 248, 1126–1128.
8. Esch FS et al. Cleavage of amyloid β -peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990, 248, 1122– 1124.
9. Esler WP, Wolfe MS. A portrait of alzheimer secretases—new features and familiar faces. *Science* 2001, 293, 1449–1454.
10. Seubert P et al. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the aminotermius of the β -amyloid peptide. *Nature* 1993, 361, 260–263.
11. Vassar R, Citron M. Ab-generating enzymes: recent advances in β - and γ -secretase research. *Neuron* 2000, 27, 419–422.
12. Perez RG et al. Mutagenesis identifies new signals for β -amyloid precursor protein endotycosis, turnover and the generation of secreted fragments, including Ab42. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274, 18851–18856.
13. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 2001, 81, 741-766.
14. Haass C et al. The Swedish mutation causes early onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine* 1995, 1, 1291–1296.
15. Higgins LS et al. P3 β -amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *American Journal of Pathology* 1996, 149, 585-596.
16. Sisodia SS. β -amyloid precursor protein cleavage by a membranebound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 6075–6079.

17. Sambamurti K et al. Evidence for intracellular cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor in PC12 cells. *Journal of Neurosciences Research* 1992,33, 319–322.
18. Cook DG et al. Alzheimer's $a\beta(1-42)$ is generated in the endoplasmic reticulum /intermediate compartment of NT2 cells. *Nature Medicine* 1997, 3, 1021–1023.
19. Motter S et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 1995, 38(4),643-8.
20. Koo EH et al. Precursor of amyloid protein in Alzheimer's disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, 87, 1561–1565.
21. Yamazaki T et al. Trafficking of cell surface β -amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *Journal of Cell Biology* 1995, 129, 431–442.
22. Poduslo JF et al. Receptor-mediated transport of human amyloid betaprotein 1–40 and 1–42 at the blood-brain barrier. *Neurobiological Disorders* 1999, 6, 190–199.
23. Saitoh T et al. Secreted form of amyloid bprotein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 1989, 58, 615–622.
24. Mattson M et al. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calciumregulating roles for secreted forms of the b-amyloid precursor protein. *Neuron* 1993, 10, 243–254.

25. Tanzi RE et al. Protease inhibitor domain encoded by an Amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 1998, 331, 528–532.
26. Sinha S et al. The protease inhibitory properties of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 1990, 265, 8983–8985.
27. Schubert D et al. The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 1989, 3, 689–694.
28. Teller JK et al. Presence of soluble Amyloid bpeptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Medicine* 1996, 2, 93-95.
29. Tabaton M et al. Is Amyloid beta protein glycosylated in AD? *Clinical neuroscience and neuropathology. Neuroreport* 1997, 8, 907-909.
30. Hendriks L et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature Genetics* 1992, 1, 218-221.
31. Lesne S and Kotilinek L. Amyloid plaques and amyloid-beta oligomers: an ongoing debate. *Journal of Neurosciences* 2005, 25, 9319-9320.
32. Oddo S et al. Temporal profile of amyloid-beta (A β) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between A β and tau pathology. *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 281, 1599-1604.

33. Postina R et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation* 2004, 113, 1456-1464.
34. Furukawa K et al. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *Journal of Neurochemistry* 1996, 67,1882-1896.
35. Sennvik K et al. Levels of α - and β - secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosciences Letters* 2000, 278, 169-172.
36. Hardy J., "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease", *Trends Neurosci.*, Vol. 20,no 4, 1997, pp. 154-159.
37. Hutton M., Hardy J.; "The presenilins and Alzheimer's disease"; *Hum. Mol. Genet.* (1997), Vol. 6, no. 10, pp. 1639-1646.
38. Zhang C., Wu B., Beglopoulos V., Wines-Samuelson M., Zhang D., Dragatsis I., Südhof T.C., Shen J.; "Presenilins are Essential for Regulating Neurotransmitter Release". *Nature* (2009), 460 (7255): 632–6. doi:10.1038/nature08177.
39. Kim T.W., Pettingell W.H., Hallmark O.G., Moir R.D., Wasco W., Tanzi R.E.; "Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells"; *J. Biol. Chem.* (1997), Vol. 272, no. 17, pp. 11006-10.
40. Steiner H., Capell A., Pesold B., Citron M., Kloetzel P.M., Selkoe D.J., Romig H., Mendla K., Haass C.; "Expression of Alzheimer's diseaseassociated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation

and complex formation”; J. Biol. Chem. (1998), Vol. 273, no. 48, pp. 32322-31.

41. Prox J., Rittger A., Saftig P.; “Physiological functions of the amyloid precursor protein secretases ADAM10, BACE1, and Presenilin; Exp. Brain. Res. (2011), Springer-Verlag, DOI 10.1007/s00221-011-2952-0. 106.

42. Kaether C., Lammich S., Edbauer D., Ertl M., Rietdorf J., Capell A., Steiner H., Haass C.; “Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane”; J. Cell. Biol. (2002), Vol. 158, no. 3, pp. 551-61.

43. Georgakopoulos A., Marambaud P., Efthimiopoulos S., Shioi J., Cui W., Li H.C., Schütte M., Gordon R., Holstein G.R., et al.; “Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts”; Mol. Cell. (1999), Vol. 4, no. 6, pp. 893-902.

44. Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y.Q., Rogaeva E., Chen F., Kawarai T., Supala A. et al.; “Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing”, Nature (2000), Vol. 407, no. 6800, pp. 48-54.

45. De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K., Van Leuven F.; “Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein”; Nature (1998), 391:387– 390.

46. Xia W., Zhang J., Kholodenko D., Citron M., Podlisny M.B., Teplow D.B., Haass C., Seubert P., Koo E.H., Selkoe D.J.; “Enhanced

production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins”; *J. Biol. Chem.* (1997) Vol. 272, no. 12, pp. 7977-82.

47. Thinakaran G., Regard J.B., Bouton C.M., Harris C.L., Price D.L., Borchelt D.R., Sisodia S.S.; “Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP”; *Neurobiol Dis.* (1998), Vol. 4, no. 6, pp. 438-53.

48. De Strooper B., Annaert W.; “Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease”; *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (2010), 26:235–260.

49. Spasic D., Tolia A., Dillen K., Baert V., De Strooper B., Vrijens S., Annaert W.; "Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway"; *J. Biol. Chem.* (2006), 281 (36): 26569–77.

50. Steiner H., Fluhrer R., Haass C.; “Intramembrane proteolysis by gammasecretase”; *J. Biol. Chem.* (2008), 283:29627–29631.

51. Jorissen E., De Strooper B.; “Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch”; *Curr. Top. Dev. Biol.* (2010), 92:201–230.

52. Castellani R.J., Nunomura A., Lee H., et al., “Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above”, *J. Alzheimer Dis.*, Vol. 14, 2008, pp. 377-383.

53. Mc Geer PL, Mc Geer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging* 2001, 22, 799-809.

54. Mc Geer PL, Mc Geer EG. Autotoxicity and Alzheimer’s disease. *Archives of Neurology* 2000,57, 789–790.

55. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience* 1999, 22, 219-40.
56. Aisen PS. Anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease: implications of the prednisone trial. *Acta Neurologica Scandinavica* 2000, 176, 85–89.
57. Webster S et al .Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, c5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997, 18, 415-421.
58. Das S, Potter H. Expression of the Alzheimer amyloid-promoting factor antichymotrypsin is induced in human astrocytes by IL-1. *Neuron* 1995, 14, 447–56.
59. Eikelenboom P, Veerhuis R. The importance of inflammatory mechanisms for the development of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* 1999, 34, 453–61.
60. Gahtan E, Overmier JB. inflammatory pathogenesis in alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli. *Neuroscience & biobehavioral reviews: official journal of the International Behavioral Neuroscience Society* 1999, 23, 615–633.
61. Yamanaka H et al. Genetic risk factors in Japanese Alzheimer's disease patients: alpha1-ACT, VLDLR and ApoE. *Neurobiology of Aging* 1998, 19 (1 Suppl.), S43-46.
62. Breitner JC. The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine* 1996, 47, 401-411.

63. Corder EH et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993, 26, 921-923.
64. Hallyday GM., Song YJ., Lepar G., et al. Pick bodies in a family with presenilin-1 Alzheimer's disease and frontotemporal dementia *Dement Geriatr Cogn Disord* 8:240-243.
65. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology* 1993, 23, 21-48.
66. Martins RN et al. Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. *Journal of Neurochemistry* 1986, 46, 1042-1045.
67. Perry G et al. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2000, 28, 831-834.
68. Pratico D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochemical Pharmacology* 2002, 63, 563-567.
69. Smith MA and Perry G. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1997, 56, 217.
70. Sayre L et al. 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 1997, 68, 2092-2097.
71. Mattson MP. Central role of oxyradicals in the mechanism of amyloidbeta- peptide cytotoxicity. *Alzheimer Disease Review* 1997, 2, 1-14.
72. Thomas T et al. Beta-amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996, 380, 168-171.

73. Horwood N and Davies DC. Immunolabelling of hippocampal microvessel glucose transporter protein is reduced in Alzheimer's disease. *Virchows Archives* 1994, 425, 69-72.
74. Mark RJ et al. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *Journal of Neurosciences* 1997, 17, 1046-1054.
75. Albers DS and Beals MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, 2000, 59, 133-154.
76. Zhang P et al. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 30615-30618.
77. Hirai K et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 2001, 21, 3017-3023.
78. Hedley R et al. Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia. *Annals of Neurology* 2002, 51, 795-797.
79. Bisaglia M et al. Acetaminophen protects hippocampals neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation. *Neurochemistry International* 2002, 41, 43-54.
80. Nunomura A et al. Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2006, 65 (7), 631-641.
81. Davis KL et al. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer's disease. *JAMA, the Journal of the American Medical Association* 1999, 281, 1401–1406.

82. Whitehouse P.J.; "Genesis of Alzheimer's disease"; *Neurology* (1997), Vol. 48, no. 5 Suppl 7, pp. S2-7.
83. Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al.; "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease"; *Nature* (1991), Vol. 349, no. 6311, pp. 704-6. 107.
84. Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., et al.; "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease"; *Nature* (1995), Vol. 375, no. 6534, pp. 754-60.
85. Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K., et al.; "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus"; *Science* (1995), Vol. 269, no. 5226, pp. 973-7.
86. Hardy J., Selkoe D.J.; "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics"; *Science* (2002), Vol. 297, no 5580, pp. 353-356.
87. Lemere C.A., Lopera F., Kosik K.S., Lendon C.L., Ossa J., Saido T.C., Yamaguchi H., Ruiz A. et al.; "The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology"; *Nat. Med.* (1996), Vol. 2, no. 10, pp. 1146-50, 130.
88. Di Fede G., Catania M., Morbin M., Rossi G., Suardi S., Mazzoleni G., Merlin M., Giovagnoli A.R. et al.; "A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis"; *Science* (2009), Vol. 323, no. 5920, pp. 1473-7.

89. Borchelt D.R., Thinakaran G., Eckman C.B., Lee M.K., Davenport F., Ratovitsky T., Prada C.M., Kim G. et al.; "Familial Alzheimer's disease linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo"; *Neuron* (1996), Vol. 17, no. 5, pp. 1005-13.
90. Duff K., Eckman C., Zehr C., Yu X., Prada C.M., Perez-tur J., Hutton M., Buee L., Harigaya Y., Yager D., Morgan D. et al.; "Increased amyloid β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1"; *Nature* (1996), Vol. 383, no. 6602, pp. 710-3.
91. Citron M., Westaway D., Xia W., Carlson G., Diehl T., Levesque G., Johnson- Wood K., Lee M., Seubert P., Davis A., Kholodenko D., Motter R. et al.; "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42- residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice"; *Nat. Med.* (1997), Vol. 3, no. 1, pp. 67-72.
92. Tomita T., Maruyama K., Saido T.C., Kume H., Shinozaki K., Tokuhiko S., Capell A., Walter J., Grünberg J., Haass C. et al.; "The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997), Vol. 94, no. 5, pp. 2025-30.
93. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A.; "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families"; *Nature* (1993), Vol. 261, no. 5123, pp. 921-3.
94. Saunders A.M., Schmechel K., Breitner J.C., Benson M.D., Brown W.T., Goldfarb L., Goldgaber D., Manwaring M.G. et al.; "Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset

Alzheimer's disease and in other amyloidforming diseases”; *Lancet* (1993), Vol. 342, no. 8873, 1993, pp. 710-1.

95. Grupe A., Li Y., Rowland C., Nowotny P., Hinrichs A.L., Smemo S., Kauwe J.S., Maxwell T.J., Cherny S., Doil L., Tacey K. et al.; “A scan of chromosome 10 identifies a novel locus showing strong association with lateonset Alzheimer disease”; *Am. J. Hum. Genet.* (2006), Vol. 78, no. 1, pp. 78-88. 108.

96. Li H., Wetten S., Li L., St Jean P.L., Upmanyu R., Surh L., Hosford D., Barnes M.R., Briley J.D., Borrie M., Coletta N., Delisle R. et al.; “Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genome-wide association study of Alzheimer disease”; *Arch. Neurol.* (2008), Vol. 65, no. 1, pp. 45-53.

97. Grimaldi L.M., Casadei V.M., Ferri C., et al., “Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism”, *Ann. Neurol.*, Vol. 47, no 3, 2000,pp. 361-36.

98. Papassotiropoulos A., Bagli M., Jessen F., et al., “A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease”, *Ann. Neurol.*, Vol. 45, no 5, 1999, pp. 666-668.

99. Bi S., Wang D.S., Li G.L., Pan S.H., “Analysis of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in Chinese patients with Alzheimer's disease”, *Chin. Med. Sci. J.*, Vol. 19, no. 2, 2004, pp. 93-96.

100. Grimaldi L.M., Casadei V.M., Ferri C., et al., “Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism”, *Ann. Neurol.*, Vol. 47, no 3, 2000,pp. 361-365.

101. Sciacca F.L., Ferri C., Licastro F., et al., "Interleukin-1B polymorphism is associated with age at onset of Alzheimer's disease", *Neurobiol Aging.*, Vol. 24, no. 7, 2003, pp. 927-931.
102. Hedley R., Hallmayer J., Groth D.M., et al., "Association of interleukin-1 polymorphisms with Alzheimer's disease in Australia", *Ann. Neurol.*, Vol. 51, no. 6, 2002, pp. 795-797.
103. Kuo Y.M., Liao P.C., Lin C., et al., "Lack of association between interleukin-1alpha polymorphism and Alzheimer disease or vascular dementia", *Alzheimer. Dis. Assoc.Disord.*, Vol. 17, no. 2, 2003, pp. 94-97.
104. Licastro F., Grimaldi L.M., Bonafè M., et al., "Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain", *Neurobiol. Aging.*, Vol. 24, no. 7, 2003, pp. 921-926.
105. Collins J.S., Perry R.T., Watson B. Jr, et al., "Association of a haplotype for tumor necrosis factor in siblings with late-onset Alzheimer disease: the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative", *Am. J. Med. Genet.*, Vol. 96, no 6, 2000, pp. 823-830.
106. Blacker D., Wilcox M.A., Laird N.M., et al., "Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease", *Nat. Genet.*, Vol. 19, no 4, 1998, pp. 357-360.
107. Huerta C., Alvarez V., Mata I.F., et al., "Chemokines (RANTES and MCP-1) and chemokine-receptors (CCR2 and CCR5) gene polymorphisms in Alzheimer's and Parkinson's disease", *Neurosci. Lett.*, Vol. 370, no 2-3, 2004, pp. 151-154

108. Fenoglio C., Galimberti D., Lovati C., et al., “MCP-1 in Alzheimer's disease patients: A-2518G polymorphism and serum levels”, *Neurobiol. Aging*, Vol. 25, no 9, 2004, pp.1169-1173.
109. Galimberti D., Fenoglio C., Lovati C., et al., “CCR2-64I polymorphism and CCR5Delta32 deletion in patients with Alzheimer's disease”, *J. Neurol. Sci.*, Vol. 225, no 1-2, 2004, pp. 79-83.
110. Venturelli E., Galimberti D., Fenoglio C., et al., “Candidate gene analysis of IP-10 gene in patients with Alzheimer's disease”, *Neurosci Lett.*, Vol. 404, no. 1-2, 2006, pp. 217-221.
111. Dahiyat M., Cumming A., Harrington C., et al., “Association between Alzheimer's disease and the NOS3 gene”, *Ann. Neurol.*, Vol. 46, no. 4, 1999, pp. 664-667.
112. Galimberti D., Venturelli E., Gatti A., et al., “Association of neuronal nitric oxide synthase C276T polymorphism with Alzheimer's disease”, *J. Neurol.*, Vol. 252, pp. 985-6.
113. Liou Y.J., Hong C.J., Liu H.C., et al., “No association between the neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism and Alzheimer's disease”, *Am. J. Med. Gen.*, Vol. 114, 2002, pp. 687-688.
114. Feulner T.M., Laws S.M., Friedrich P., et al., “Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study”, *Mol. Psychiatry.*, Vol. 15, no 7, 2010, pp. 756-766.
115. Reiman E.M., Webster J.A., Myers A.J., et al., “GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers”, *Neuron.*, Vol. 54, 2007, pp. 713–720.
116. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University

(Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

117. Foncin JF, Salmon D, Bruni AC: Notes on the Methods for the Study of Kindreds with Familial Alzheimer's Disease. In: Familial Alzheimer's Disease. Molecular Genetics and Clinical Perspectives. G.D.Miner, R.W.Richter, J.P.Blass, J.L.Valentine, L.A.Winters-Miner (eds). Marcel Dekker, Inc.New York and Basel, 45-53 (1989).

118. Bruni AC (1999) Le Popolazioni Fondatrici come modello nella ricerca genetica: La Malattia di Alzheimer. Acts of the Congress Società Italiana di Psichiatria 273-275 Ed. CIC, (1999).

119. PEN-2 gene mutation in a familial Alzheimer's disease case. Sala Frigerio C, Piscopo P, Calabrese E, Crestini A, Malvezzi Campeggi L, Civita di Fava R, Fogliarino S, Albani D, Marcon G, Cherchi R, Piras R, Forloni G, Confaloni A. *Neurol.* 2005 Sep;252(9):1033-6.