

# Determinazione di TAU, p-TAU e beta amiloide 1-42 in pazienti affetti da malattia di Alzheimer e demenza frontotemporale

M. Zabeo<sup>a</sup>, F. de Rino<sup>b</sup>, F. Rispoli<sup>a</sup>, F. Somalvico<sup>c</sup>, E. Longhi<sup>a</sup>, M. Franceschi<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Multilab, Multimedita, Milano

<sup>b</sup>Dipartimento di Neurologia, Multimedita S. Maria, Castellanza (VA)

<sup>c</sup>Unità di Biostatistica, Multimedita, Sesto San Giovanni (MI)

## Riassunto

**Premessa.** La malattia di Alzheimer (AD) è la più comune forma di demenza e la sua diagnosi clinica differenziale è spesso difficile nei confronti della demenza fronto-temporale (FTD). La determinazione dei livelli di Tau, p-Tau e  $\beta$  amiloide<sub>1-42</sub> ( $\beta$ A<sub>1-42</sub>) in campioni di liquor cerebrospinale (LCR) sembra fornire un valido supporto alla diagnosi clinica. Ci proponiamo di determinare le concentrazioni liquorali di Tau, p-Tau e  $\beta$ A<sub>1-42</sub> per distinguere soggetti con sospetto clinico di AD da pazienti con indicazione clinica di FTD all'esordio della manifestazione neurologica.

**Metodi.** Sono stati inclusi nello studio 43 soggetti con probabile AD (criteri NINCDS-ADRDA) e 39 soggetti con probabile FTD (criteri di Neary) per un totale di 82 campioni di liquor (LCR) prelevati per mezzo di puntura lombare per scopi diagnostici. La determinazione quantitativa di Tau, p-Tau e  $\beta$ A<sub>1-42</sub> è stata effettuata per mezzo di test Elisa (Innotest, Innogenetics, Ghent, Belgium). I dati ottenuti sono stati analizzati sia singolarmente

che in combinazione grafica.

**Risultati.** Il confronto tra le concentrazioni di  $\beta$ A<sub>1-42</sub> e p-Tau<sub>181</sub> rilevate in pazienti affetti da AD ed FTD ha evidenziato differenze statisticamente significative ( $\beta$ A<sub>1-42</sub> AD: 383±169 ng/L, FTD: 510±288 ng/L, p=0.05 e p-Tau AD: 92±45 ng/L, FTD: 70±46 ng/L, p=0.002). La combinazione grafica di Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta$ A<sub>1-42</sub> ha confermato l'ipotesi clinica di AD in 34/43 casi (sensibilità: 79%, specificità: 69%). La clinica di FTD è stata confermata in 19/39 casi (sensibilità: 49%, specificità: 88%). Il confronto dei rapporti  $\beta$ A<sub>1-42</sub>/Tau e  $\beta$ A<sub>1-42</sub>/pTau fra soggetti con indicazione clinica di AD e FTD ha mostrato una differenza statisticamente significativa (rispettivamente p=0.002 e p<0.0001).

**Conclusioni.** I risultati ottenuti suggeriscono che la concentrazione liquorale di p-Tau e  $\beta$ A<sub>1-42</sub> ed il loro rapporto possa fornire un aiuto al clinico per confermare un sospetto clinico di AD o per escludere AD da una sospetta FTD in pazienti all'esordio di malattia.

## Summary

**Tau, p-tau and beta amyloid 1-42 concentrations in Alzheimer and frontotemporal dementia patients**

**Background.** Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and its clinical differentiation from fronto-temporal dementia (FTD) is often difficult. Cerebro-spinal fluid (CSF) Tau, p-Tau and  $\beta$

amyloid<sub>1-42</sub> ( $\beta$ A<sub>1-42</sub>) concentrations seem to be a valid support in clinical diagnosis. Our goal is to analyse the CSF Tau, p-Tau and  $\beta$ A<sub>1-42</sub> concentrations and their ratio to identify early-onset AD from subjects with FTD.

**Methods.** 82 CSF samples collected with lumbar puncture: 43 from subjects with probable AD (NINCDS-ADRDA criteria) and 39 from subjects with probable FTD (Neary criteria). Tau, p-Tau and  $\beta$ A<sub>1-42</sub> concen-

trations have been tested with ELISA test (Innotest, Innogenetics, Ghent, Belgium).

**Results.** Only  $\beta A_{1-42}$  and p-Tau concentrations have shown statistically significant differences between AD and FTD subjects ( $\beta A_{1-42}$  AD:  $383 \pm 169$  ng/L, FTD:  $510 \pm 288$  ng/L,  $p=0.05$  and p-Tau AD:  $92 \pm 45$  ng/L, FTD:  $70 \pm 46$  ng/L,  $p=0.002$ ). The graphic combination of Tau, p-Tau e  $\beta A_{1-42}$  has confirmed the clinical suspect of AD in 34/43 samples (sensitivity: 79%, specificity: 69%). FTD clinical suspect has been confir-

med in 19/39 samples (sensitivity: 49%, specificity: 88%). Our data indicate the ratio  $\beta A_{1-42}/\text{Tau}$  and  $\beta A_{1-42}/\text{p-Tau}$  as clinically significant to discriminate AD from FTD ( $p=0.002$  and  $p<0.0001$  respectively).

**Conclusions.** CSF p-Tau e  $\beta A_{1-42}$  concentrations and their ratio, although tested on a small number of samples, seems to be a further support to assist clinician in confirming a suspected AD or to exclude AD in a case of clinical suspect of FTD.

**Key-words:** Alzheimer, Tau, p-Tau, and  $\beta$  amiloid.

## Introduzione

La demenza è una sindrome clinica caratterizzata dalla perdita di più funzioni cognitive, oltre alla memoria, di entità tale da interferire con le usuali attività sociali e lavorative del paziente. Oltre ai sintomi cognitivi sono presenti sintomi non cognitivi che riguardano la sfera della personalità, dell'affettività, della percezione, le funzioni vegetative ed il comportamento. La malattia di Alzheimer (AD) è la causa più frequente di demenza (50-70% dei casi) a cui seguono altre patologie neurodegenerative, quali la demenza da corpi di Lewy (DLB) e la demenza frontotemporale (FTD) (10-30% dei casi). Le attuali conoscenze epidemiologiche e biologiche suggeriscono che le demenze in generale, ed AD in particolare, siano delle patologie con una lunga fase preclinica, nella quale vari interventi, volti a prevenire lo sviluppo della malattia, sono possibili<sup>1</sup>. Nella patogenesi dell'AD assumono notevole importanza le proteine liquorali beta amiloide, Tau e p-Tau, forma iperfosforilata di Tau. La beta amiloide è presente nel cervello di soggetti con sintomi clinici di malattia in forma di placche diffuse, ma anche in forma di aggregati densi circondati da reazione neuritica e nelle placche senili.

Appare indispensabile sapere se il livello di beta amiloide presente nel liquor correli con diagnosi e/o progressione clinica di AD. Una simile osservazione vale anche per Tau: è stato, infatti, osservato che abnormi accumuli di Tau sono la seconda alterazione neuropatologica specifica di AD e che nella sua forma iperfosforilata, p-Tau, è responsabile della formazione di grovigli neurofibrillari (NFT)<sup>2</sup>.

L'intento del nostro studio è quello di verificare l'utilità della determinazione delle concentrazioni liquorali di Tau, p-Tau e beta amiloide per poter distinguere soggetti con sospetto clinico di AD da quelli con sospetto clinico di FTD all'esordio della manifestazione neurologica.

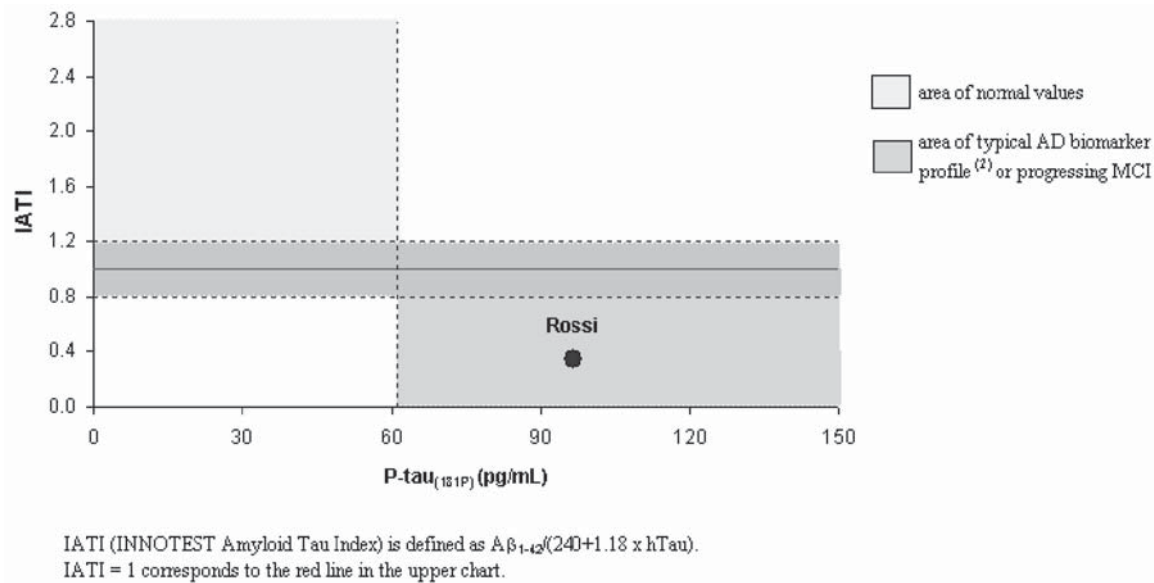
## I markers proteici

**Tau:** È una proteina associata ai microtubuli, localizzata negli assoni, presente in 6 isoforme di 352-441 aa con peso molecolare 50-65 kDa. Dotata di oltre 30 siti di fosforilazione si associa alla tubulina dei mi-

crotubuli facilitandone la formazione ed aumentando la stabilità<sup>3</sup>. I livelli di Tau sembrano riflettere il danno neuronale ed il processo degenerativo: è presente ad elevate concentrazioni nella fase iniziale di fenomeni acuti (infarto cerebrale), in soggetti affetti da AD<sup>4</sup>, da demenza vascolare (VaD), da DLB e da FTD<sup>5</sup>. In quest'ultimo caso, tuttavia, i livelli liquorali di Tau sono soggetti a notevole variabilità<sup>6</sup>, probabilmente attribuibile al fatto che FTD comprende almeno due differenti sottotipi neurologici: con patologia Tau (sindrome di Pick e FTD familiare con deposizione di Tau) e senza patologia Tau. Nella forma fosforilata (**p-Tau**) Tau si organizza in strutture fibrillari a struttura elicoidale di 10 nm di diametro contribuendo in questo stato alla costituzione di NFT. Presente a titoli elevati in soggetti affetti da AD, p-Tau non subisce invece variazioni nel corso del normale processo di invecchiamento. In FTD la concentrazione di p-Tau appare debolmente aumentata o comparabile a quella di soggetti sani<sup>7</sup>. La fosforilazione può avvenire in differenti siti e sembra correlare con la formazione di NFT<sup>8</sup>: 1) Tau fosforilata in Thr231, stadio antecedente la formazione di NFT, 2) Tau fosforilata in Thr181, presenza di NFT all'interno dei neuroni, 3) Tau fosforilata in Ser199, presenza di NFT all'esterno dei neuroni. I 3 determinanti antigenici appaiono egualmente performanti nel discriminare AD sia dai controlli normali che da altri disordini neurologici: recenti studi suggeriscono, tuttavia, una migliore differenziazione fra AD ed FTD utilizzando p-Tau<sub>231</sub> e fra AD e DLB utilizzando p-Tau<sub>181</sub><sup>9</sup>.

**$\beta$  amiloide<sub>(1-42)</sub>:** È un'isoforma di 42aa, risultato dello splicing alternativo del precursore APP (amyloid precursor protein). È la principale costituente delle placche nervose e la sua concentrazione liquorale subisce una significativa diminuzione nel caso di pazienti affetti da AD se confrontati con controlli sani<sup>10</sup>. Riduzioni nella concentrazione di  $\beta A_{1-42}$ , sebbene meno evidenti, sono state osservate anche nel caso di FTD ma anche di DLB, VaD e nella sindrome di Creutzfeld-Jacob.

La combinazione delle concentrazioni liquorali di Tau e  $\beta A_{1-42}$  permette di discriminare AD dai controlli sani con una sensibilità dell'81-94% ed una specificità del 79-95% ed AD da DLB, VaD ed FTD con una specificità rispettivamente del 67%, 48% ed 85%<sup>4,5</sup>.



**Figura 1.** Esempio di combinazione grafica dei parametri Tau, p-Tau e  $\beta A_{1-42}$  in un paziente con sospetto clinico di AD, l'interpretazione grafica conferma il sospetto clinico. L'area bianca posta sotto l'area dei valori normali è suggestiva per demenze non AD.

## Materiali e metodi

82 campioni di LCR prelevati per mezzo di puntura lombare: 43 campioni prelevati da soggetti (età  $69 \pm 6$ , M: 17, F:26) con probabile AD (criteri NINCDS-ADRDA) e 39 da soggetti (età  $68 \pm 7$ , M: 28, F: 11) con probabile FTD (criteri di Neary). Da ogni campione centrifugato (10 minuti 4000 g a  $4^\circ\text{C}$ ) sono state ottenute 3 aliquote di almeno 400  $\mu\text{l}$  in tubi di polipropilene conservate fino all'esecuzione dei test a  $-80^\circ\text{C}$ <sup>11</sup>. Una prima aliquota è stata utilizzata per il dosaggio della  $\beta A_{(1-42)}$ , una seconda per la determinazione di Tau e p-Tau<sub>(181)</sub> ed una terza archiviata a  $-80^\circ\text{C}$  per eventuale ripetizione dei test. Sono stati esclusi dall'analisi campioni fortemente emolizzati. La determinazione quantitativa di Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta A_{1-42}$  è stata effettuata per mezzo di test Elisa (Innotest, Innogenetics, Ghent, Belgium). L'utilizzo del parametro IATI (INNOTEST amyloid-tau index) definito come  $\beta A_{1-42}/(240 + 1.18 \times h\text{Tau})$ , rappresentativo della concentrazione di  $\beta A_{1-42}$  ed hTau, ha consentito di combinare graficamente le concentrazioni di Tau e  $\beta A_{1-42}$  con la concentrazione di p-Tau<sub>181</sub> (Fig. 1): l'analisi grafica permette di differenziare i campioni in: suggestivi per AD, normali ed indicativi per demenza non AD (area bianca sottostante l'area dei valori normali). L'analisi statistica dei dati è stata effettuata per mezzo di t-test a varianza dissimile e test Mann-Witney U.

## Risultati

Il confronto della concentrazione di  $\beta A_{1-42}$  e p-Tau<sub>181</sub> fra pazienti affetti da AD ed FTD ha evidenziato differenze statisticamente significative ( $\beta A_{1-42}$  AD:  $383 \pm 169$  ng/L, FTD:  $510 \pm 288$  ng/L,  $p=0.05$  e p-

Tau AD:  $92 \pm 45$  ng/L, FTD:  $70 \pm 46$  ng/L,  $p=0.002$ ), la concentrazione di Tau, invece, non ha mostrato una differenza significativa (AD:  $580 \pm 661$  ng/L, FTD:  $450 \pm 533$  ng/L,  $p=0.35$ ). L'interpretazione grafica delle concentrazioni di Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta A_{1-42}$  ha confermato la diagnosi clinica di AD in 34/43 casi (sensibilità: 79%, specificità: 69%), il sospetto clinico di FTD è stato invece confermato dall'interpretazione grafica (demenza non AD) solo nel 50% dei casi (19/39) (sensibilità: 49%, specificità: 88%). In 9 casi (23%) con sospetto clinico di FTD l'interpretazione grafica delle concentrazioni di Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta A_{1-42}$  ha suggerito un valore di normalità. Il confronto dei rapporti  $\beta A_{1-42}/\text{Tau}$  e  $\beta A_{1-42}/\text{p-Tau}_{181}$  fra soggetti con indicazione clinica di AD ed FTD ha mostrato una differenza statisticamente significativa (rispettivamente  $p=0.002$  e  $p<0.0001$ ). In particolare, nel caso del rapporto  $\beta A_{1-42}/\text{p-Tau}_{181}$  l'uso di un cut-off di 7 (Tab. I) permette di ottenere una sensibilità del 62% ed una specificità dell'84% (PPV: 77.4%, PPN: 70.6%) nel confermare un sospetto clinico di FTD.

## Discussione

I risultati ottenuti suggeriscono la determinazione di p-Tau<sub>181</sub> come il migliore biomarker, fra Tau  $\beta A_{1-42}$  e p-Tau<sub>181</sub>, in grado di distinguere AD da FTD<sup>12</sup>. La differenza di concentrazione di  $\beta A_{1-42}$  fra soggetti affetti da AD ed FTD, sebbene significativa, non permette una distinzione ottimale fra le due patologie. La concentrazione liquorale di  $\beta A_{1-42}$ , infatti, diminuisce in soggetti affetti da AD<sup>10,13</sup> per un processo di tesaurizzazione della  $\beta$  amiloide nelle placche cerebrali<sup>14</sup>, ma si riduce, anche se in maniera meno evidente, anche in

**Tabella I.** Rapporto  $\beta A_{1-42}/p\text{-Tau}_{181}$ , ricerca di un cut-off ottimale per poter confermare un sospetto clinico di FTD.

<b>Conferma FTD</b> analisi rapporto $\beta A_{1-42} / p\text{-Tau}_{181}$					
C.O. (maggiore di)	Sens. %	Spec. %	C.O. (maggiore di)	Sens.	Spec.
0.76	100	0	7.96	53.85	83.72
1.53	97.44	9.30	7.98	53.85	86.05
2.02	89.74	13.95	8.14	51.28	86.05
2.46	79.49	20.93	8.25	51.28	88.37
3.43	69.23	30.23	9.37	46.15	88.37
3.52	66.67	34.88	9.62	41.03	90.70
4.33	66.67	55.81	10.31	41.03	93.02
4.37	64.10	55.81	10.68	38.46	95.35
6.22	64.10	79.07	13.8	25.64	95.35
<b>6.99</b>	<b>61.54</b>	<b>83.72</b>	14.6	20.50	100

soggetti affetti da FTD<sup>15,16</sup>. I differenti sottotipi neurologici di FTD (con o senza deposizione di Tau) possono spiegare l'interpretazione grafica normale in presenza di un sospetto clinico di FTD: in funzione della concentrazione di Tau il rapporto IATI tende a spostarsi verso l'area di normalità (deposizione di Tau) o verso l'area indicativa per demenze non AD (senza deposizione di Tau). La dispersione dei singoli dati ed i valori di sensibilità e specificità ottenuti dall'interpretazione grafica delle concentrazioni di Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta A_{1-42}$  confermano quanto già osservato da Andreasen<sup>17</sup>: l'utilizzo di questi test come ulteriore aiuto al clinico per confermare od escludere un sospetto clinico di AD all'esordio della manifestazione neurologica, ma non per formulare diagnosi di malattia. L'utilizzo del rapporto  $\beta A_{1-42}/p\text{-Tau}_{181}$  permette di migliorare la sensibilità della metodica (49% vs 62%) mantenendo inalterata la specificità (88% vs 84%) e confermare un sospetto clinico di FTD all'esordio della manifestazione neurologica con maggior efficacia rispetto alla combinazione grafica di Tau, p-Tau<sub>181</sub> e  $\beta A_{1-42}$ . Tuttavia, i valori di sensibilità e specificità del rapporto  $\beta A_{1-42}/p\text{-Tau}_{181}$  ottenuti sono inferiori rispetto ai valori osservati da Hansson<sup>18</sup> nel confermare un sospetto clinico di AD all'esordio (sensibilità 95%, specificità 87%). Questo dato potrebbe dipendere dal fatto che nel nostro studio i soggetti affetti da AD sono stati confrontati con un gruppo di pazienti affetti da un solo tipo di demenza non AD.

## Conclusioni

I risultati ottenuti suggeriscono che la concentrazione liquorale di p-Tau,  $\beta A_{1-42}$  ed il loro rapporto, se associati alla diagnostica per immagine e all'esame clinico, possono fornire un ulteriore aiuto al neurologo per confermare un sospetto clinico di AD o per escludere AD da una sospetta FTD in pazienti all'esordio di malattia.

## Bibliografia

- Peterson RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999; 56: 303-8.
- Andreasen N, Sjögren M, Blennow K. CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42. *World J Biol Psychiatry* 2003; 4:147-55.
- Buée L, Bussiere T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 33: 95-130.
- Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winbland B, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practise. *Arch Neurol* 2001; 58: 379-89.
- Reimenschneider M, Wagenpfeil S, Diehl J, Lautenschlager N, Thöml T, Heldmann B, et al. Tau and Abeta42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration. *Neurology* 2002; 58:1622-8.
- Grossman M, Farmer J, Leight S, Work M, Moore P, Van Deerlin V, et al. Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2005; 57:721-9.
- Hampel H, Teipel SJ. Total and phosphorylated tau proteins: evaluation as core biomarker candidates in frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 17:350-4.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2002; 103:26-35.
- Buerger K, Zinkowski R, Reipel SJ, Tapiola T, Arai H, Blennow K, et al. Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Arch Neurol* 2002; 59: 1267-72.
- Sjogren M, Andreasen N, Blennow K. Advances in the detection of the Alzheimer's disease use of cerebrospinal fluid biomarkers. *Clin Chim Acta* 2003; 332:1-10.

11. Schoonenboom N, Cees M, Vanderstichele H, Van Elk EJ, Kok A, Van Kamp GJ, et al. Effects of Processing and Storage Conditions on Amyloid (1-42) and Tau Concentrations in Cerebrospinal Fluid: Implications for Use in Clinical Practice. *Clinical Chemistry* 2005; 51:189-95.
12. Frankfort SV, Tulner LR, van Campen JP, Verbeek MM, Jansen RW, Beijnen JH. Amyloid beta protein and tau in cerebrospinal fluid and plasma as biomarkers for dementia: a review of recent literature. *Curr Clin Pharmacol* 2008; 3:123-31.
13. Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Pike KE, Cappai R, Masters CL, Rowe CC. The ART of loss: Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias. *Mol Neurobiol* 2008; 38:1-15.
14. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRX* 2004; 1:213-25.
15. Bibl M, Mollenhauer B, Wolf S, Esselmann H, Lewczuk P, Kornhuber J, et al. Reduced CSF carboxyterminally truncated Abeta peptides in frontotemporal lobe degenerations. *J Neural Transm* 2007; 114:621-8.
16. Bibl M, Mollenhauer B, Lewczuk P, Esselmann H, Wolf S, Trenkwalder C, et al. Validation of amyloid-beta peptides in CSF diagnosis of neurodegenerative dementias. *Mol Psychiatry* 2007; 12:671-80.
17. Andreassen N, Blennow K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2005; 107:165-73.
18. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* 2006; 5:228-34.