

Geni e fattori di rischio nelle Demenze Degenerative

A.C. Bruni

Centro Regionale di Neurogenetica, AS6, Lamezia Terme (CZ)

Introduzione

Le Demenze Degenerative primarie sono ancora oggi un grande calderone di sindromi tutte legate dal comune *fil rouge* del “deterioramento cognitivo”:

Sindromi che potranno divenire *Malattie*, dunque *entità nosologiche*, attraverso l’identificazione di una causa precisa, di un’ etiologia.

Gli studi di epidemiologia descrittiva hanno prodotto importanti risultati nelle stime quantitative del fenomeno, con rilevanti risvolti per la programmazione socio-sanitaria. Non altrettanto, però, si può dire a proposito degli studi analitici, volti all’individuazione dell’etiologia delle demenze degenerative.

La numerosità dei casi sottolinea e giustifica l’importanza della ricerca, ma il tentativo di risalire ai momenti etiologici, nelle forme sporadiche, si scontra con una molteplicità di problemi, apparentemente insormontabili.

L’ approccio, infatti, risulta alquanto difficile per vari motivi:

- a) il quadro fenotipico delle demenze (relativamente ad esordio, durata e decorso) si presenta eterogeneo e spesso di incerta classificazione diagnostica senza il supporto di esami neuropatologici che, per altro, raramente vengono effettuati;
- b) c’è grande incertezza circa il ruolo da attribuire ai fattori di rischio, sia genetici che ambientali, nel determinismo del processo dementigeno.

Stante queste premesse, complessa e di difficile attuazione può risultare una qualsiasi metodologia di studio, con risvolti problematici per ciò che riguarda il raggiungimento di adeguati risultati.

Gli studi di associazione hanno l’obiettivo di identificare i fattori di rischio genetici e di valutare se una variante genetica si trasmette con la malattia presa in considerazione, più frequentemente rispetto ai soggetti di controllo.

I soggetti necessitano però di grandi numeri, affinché i riscontri possano raggiungere la significatività statistica: i grandi numeri, d’altra parte, aumentano l’eterogeneità clinica e genetica dando luogo a risultati spesso confondenti e deludenti.

Il tentativo opposto, cioè del piccolo campione “pulito”, compromette però il potere statistico e dunque la validità generale.

Per queste ragioni, le demenze sporadiche non sono un buon modello di studio per l’identificazione delle cause.

Per superare i problemi di cui sopra, è dunque necessario trovare modelli semplici e chiari, sui quali tentare di identificare le cause di malattia e da queste procedere allo studio della patogenesi.

Per la ricerca sulle demenze, modelli semplici di studio sono costituiti dalle forme genetiche, autosomiche dominanti.

Lo studio delle forme geneticamente determinate non è sicuramente importante per la numerosità dei pazienti (si tratta in realtà di forme piuttosto rare) ma è importante perché:

- a) è generalmente uno solo il gene mutato che si trasmette;
- b) è possibile valutare i soggetti affetti in diversi stadi e dunque ricostruire integralmente il pattern evolutivo della malattia;
- c) è possibile, passo dopo passo, delineare la via biochimica che dal gene alterato innesca il processo patologico.

Proprio grazie al lavoro su questi modelli, molto faticosamente e dopo lunghi anni di ricerca, si è riusciti ad estrapolare, in maniera chiara, dal grande calderone sindromico, la Malattia di Alzheimer (MA). I tentativi recenti dei ricercatori sono ora rivolti alla forme “Non Alzheimer”: molti studi, infatti, si stanno compiendo per la individuazione e la chiarificazione clinica e genetico-molecolare delle demenze frontotemporali, della demenza a corpi di Lewy e di tante altre demenze.

Via via, però, che una Sindrome diventa Malattia ed esce dal crogiolo rendendo possibile il proprio inquadramento nosologico, ecco però che altre forme, precedentemente definite “non inquadrabili”, perché confuse, spuntano all’orizzonte della ricerca clinica e genetico molecolare, richiedendo ulteriori grandi sforzi collaborativi per essere definite e inquadrare.

Il percorso di conoscenza dei complessi processi neurodegenerativi sottesi alle demenze è inevitabilmente lungo, l’enorme mole dei risultati fino ad ora ottenuti a volte sconcerta e sembra aver nulla influito sulla terapia di queste forme. In realtà proprio grazie a quei modelli semplici e rari, sono state po-

ste le basi indispensabili per le acquisizioni future che potranno tradursi, speriamo presto, in concreti atti terapeutici.

Malattia di Alzheimer

I geni causali

I progressi importanti nel campo della MA sono stati acquisiti su modelli semplici, costituiti da grandi famiglie in cui la malattia si trasmette in maniera mendeliana autosomica dominante.

APP:

Il primo gene ad esser stato isolato e clonato è stato il gene precursore della Proteina Amiloide (APP) localizzato sul cromosoma 21 (1) che codifica per una grossa macromolecola glicoproteica sulla quale intervengono (in specifici siti di taglio) alcuni enzimi chiamati secretasi (alfa-beta-gamma) che producono frammenti di amiloide di diversa lunghezza aminoacidica (A β 40-A β 42). Nell'organismo, in condizioni fisiologiche, esiste un rapporto ottimale tra questi due tipi di amiloide. L'A β 40 è solubile, l'A β 42 è la forma definita fibrillogena o neurotossica.

E' questa seconda forma a depositarsi nelle placche senili (uno dei marker neuropatologici della MA).

L'APP è un gene che muta raramente e infatti sono solo 16 le mutazioni identificate a tutt'oggi; è un gene interessante poiché alcune delle sue mutazioni sono responsabili dell'angiopatia amiloidosica familiare Dutch type (2) che è una malattia caratterizzata clinicamente da emorragie cerebrali e, neuropatologicamente, da accumulo di amiloide con assenza di degenerazione neurofibrillare.

La mutazione A713T dell'APP 770 è stata ritenuta, fino a qualche tempo fa, un innocuo polimorfismo cioè una variante genetica comunemente rappresentata nella popolazione generale. Il motivo era da ritrovarsi nel fatto che la variante era stata descritta in una piccola famiglia e non era noto se si trasmettesse con la malattia (3,4).

Noi abbiamo avuto l'opportunità di studiare, da un punto di vista clinico, genetico-molecolare e neuropatologico, una famiglia (sei soggetti affetti su 4 generazioni ricostruite) e di identificare la mutazione A713T come mutazione causale della malattia (5). La mutazione è in prossimità del sito di taglio della gamma secretasi e modifica dunque il rapporto tra Ab40/Ab42 favorendo la produzione della forma fibrillogena della beta amiloide. Molto interessante, in questa forma di Malattia di Alzheimer, è il quadro clinico che potrebbe essere facilmente confuso con una demenza vascolare. I soggetti affetti presentano infatti delle lesioni multiple sottocorticali, di natura vascolare che, all'esame neuropatologico si è scoperto essere provocate da una immensa quantità di amiloide che infarctisce i vasi provocandone la rottura.

I geni delle Preseniline

La storia dell'isolamento del gene AD3 sul cromosoma 14, (definito successivamente PS1 dal nome delle proteine codificate), da parte del gruppo di St. George Hyslop et coll. (6), riguarda il lungo e certosino lavoro clinico-genealogico condotto su alcune famiglie calabresi che sono state ricostruite nei secoli fino al 1600 e le cui branche emigrate sono state seguite in altre parti del mondo (Australia, Argentina, Francia, Stati Uniti, Nord Italia) (7). La capillarità e vastità del lavoro, le centinaia di affetti identificati e prelevati e l'immensa base dati di popolazione, hanno garantito un risultato definito come la pietra miliare nell'ambito delle ricerche sulla Malattia di Alzheimer. L'identificazione del PS1 ha permesso di evidenziare, per analogia di sequenza, che un altro gene, il PS2 (8), localizzato sul cromosoma 1, era causa, quando mutato, di Malattia di Alzheimer in altre famiglie.

Dagli anni 1995 ad oggi, in letteratura sono state segnalate 125 mutazioni specifiche del PS1 (<http://mol-gen-www.nia.ac.be/ADMutations>) mentre sono solo 8 le mutazioni identificate sul PS2.

Mentre le prime hanno completa penetranza (cioè si esprimono inevitabilmente nel soggetto che le porta), provocano un quadro aggressivo di malattia e si esprimono con una marcata precocità di esordio, le mutazioni del PS2 presentano invece sia una penetranza che un esordio variabile anche dopo gli 80 anni. Questo è probabilmente legato alla minore espressività di questo gene a livello cerebrale (6-9). C'è inoltre da precisare che qualunque sia il gene in causa, le mutazioni identificate sono da considerarsi "private" (ogni famiglia ha praticamente la sua mutazione).

L'identificazione delle preseniline ha permesso di proseguire nella comprensione dei meccanismi biochimici attraverso i quali, da questi geni mutati, si innesca la malattia.

L'eterogeneità genetica della malattia di Alzheimer, è stata ricondotta ad un processo unitario grazie all'individuazione della via biochimica ed al fatto che alcuni anelli della stessa via, sono stati già aperti.

Il gene PS1 codifica per una proteina delle membrane intracellulari neuronali chiamata presenilina 1 (PS1) il cui ruolo sembra essere di vitale importanza dal momento che è presente anche in organismi filogeneticamente molto lontani dall'essere umano (*Drosophila* e *C.elegans*). Un'altra conferma che le preseniline siano proteine fondamentali per la vita deriva dal fatto che i topi knockout per il PS1, nascono con malformazioni dei somiti importanti e incompatibili con la vita.

Le preseniline 1 e 2 sono componenti funzionali di distinti complessi ad alto peso molecolare che si trovano nel Reticolo Endoplasmatico e nel Golgi.

La loro funzione non è ancora esattamente conosciuta, ma dal 1998 in poi diversi ricercatori hanno

dimostrato che entrambe le preseniline interagiscono con delle proteine intracellulari neurono-specifiche, producendo dei frammenti del complesso delle preseniline (PS).

Le mutazioni PS1 e PS2 provocano una anomala funzione del trafficking cellulare di alcune proteine intracellulari e aumentano inoltre la proteolisi intramembrana del bAPP generando una overproduzione del peptide β -amiloide neurotossico.

Dunque qualunque sia la partenza, la via finale comune è la beta amiloide.

Da qualche anno dunque i ricercatori danno la caccia all'identificazione degli enzimi che tagliano la beta amiloide: la regolazione delle secretasi (in particolare della gamma secretasi) potrebbe avere risvolti terapeutici interessanti. Wolfe ha ipotizzato (10) che la gamma secretasi fosse in realtà la stessa presenilina ma la recente identificazione della proteina Nicastrina (11) ha messo in discussione questa ipotesi. Nicastrina, nome dato in onore alla famiglia N, lavora in sintonia con il complesso delle preseniline. E' una nuova (non era ancora nota nel genere umano) glicoproteina delle membrane intracellulari neuronali e assieme alle preseniline entra nel meccanismo di processazione della beta amiloide. Forma un complesso strettissimo con la presenilina 1 e le sue mutazioni, indotte sperimentalmente, modificano il rapporto della beta amiloide (Ab40/Ab42). Nicastrina dunque potrebbe essere essa stessa la gamma secretasi o, più verosimilmente, è il complesso Nicastrina-presenilina ad avere questa funzione. Anche Nicastrina è una proteina importante da un punto di vista filogenetico ed è presente, con una forte somiglianza nella sequenza aminoacidica, in tante altre specie. Non è escluso, anche se fino ad ora la ricerca ha dato esito negativo, che mutazioni di Nicastrina possano essere esse stesse causa di malattia di Alzheimer.

Geni di suscettibilità

APOE

La APO-E è una glicoproteina di membrana che trasporta il colesterolo e altri lipidi; il suo gene è localizzato sul cromosoma 19. E' sintetizzata nel fegato, cervello, microglia ed esiste in tre differenti isoforme $\epsilon 2 - \epsilon 3 - \epsilon 4$. La differenza tra le isoforme è data da differenti domini strutturali che le conferiscono una conformazione sterica differente.

Le frequenze delle differenti isoforme, sono variabili nella popolazione generale: la forma $\epsilon 3$ è molto più frequente della forma $\epsilon 2$ e della $\epsilon 4$.

Sin dal 1995 è stato dimostrato (12) che l'APOE- $\epsilon 4$ (sia in forma mono che biallelica) è un fattore di rischio per la Malattia di Alzheimer sporadica, in particolare per la forma ad esordio tardivo.

Il rischio di sviluppare MA incrementa dal 1.7%, in caso di un solo allele $\epsilon 4$, al 6.2% in presenza di dop-

pio $\epsilon 4$. I numerosi studi effettuati sulle differenti isoforme delle APOE, hanno dimostrato che APOE- $\epsilon 2$ e APOE- $\epsilon 3$ hanno un effetto protettivo poichè stimolano e favoriscono la crescita neuritica, APOE- $\epsilon 3$ inoltre lega la proteina tau favorendo un corretto assemblaggio dei microtubuli. APOE- $\epsilon 4$ non presenta invece questi effetti ed è dunque possibile che la predisposizione alla malattia sia conferita da una "non protezione" piuttosto che da un effetto negativo.

L'APOE- $\epsilon 4$ come fattore di rischio non è però presente in tutte le popolazioni (per gli arabo-Israeli per esempio) (13). Sulle forme genetiche ad esordio precoce non ha nessuna influenza (14), e in Calabria sembra essere un fattore di rischio solo per la forma early onset (comunicazione personale).

Demenze Frontotemporali

Si collocano per frequenza al secondo posto nella scala delle demenze degenerative (15) e con un tasso altissimo di familiarità, circa il 40% (16) ma la loro diagnosi è ardua e difficile per via di segni clinici "comportamentali" unici per lunghi anni. Sono dunque certamente sottostimate e solo il loro studio lungo pedigrees particolarmente vasti (con soggetti affetti in vario stadio di malattia) permette di comprendere come dagli sfumati segni comportamentali (abulia, riduzione dell'iniziativa verbale e motoria, perdita dell'empatia e del contatto sociale) il paziente scivoli dopo lunghi anni nel quadro di demenza completa, con il più profondo disturbo delle funzioni cognitive e in particolare del linguaggio. Nel 1994 i gruppi di Lund and Manchester, hanno messo a punto un consensus per l'identificazione clinica e neuropatologia delle demenze Frontotemporali (17). In alcune famiglie, affette da FTD, la causa è stata identificata in differenti mutazioni del gene che codifica per la proteina tau, gene localizzato sul cromosoma 17. Solo il 15% delle famiglie FTD presenta una mutazione del gene tau.

Nelle Demenze frontotemporali l'eterogeneità, sia clinico- neuropatologica che genetico-molecolare sembra essere, ancor più che nella Malattia di Alzheimer, la regola.

Un nostro lavoro comprendente un dataset di pazienti FTD sporadici e familiari, ha evidenziato una presenza bassissima delle mutazioni tau (18). In particolare, su un vasto pedigree dominante, ricostruito fino al 1700, in cui sono stati identificati 34 affetti su quattro generazioni (19), la tau non è risultata mutata, il linkage sul cromosoma 17 non significativo e anche il cromosoma 3 e il cromosoma 9 (recentemente implicati in alcune forme di FTD) non sono coinvolti. In questo stesso pedigree, il quadro fenotipico è variabile: l'età di esordio e di morte presentano un ampio range; l'esordio precoce connota quadri aggressivi, mentre l'esordio tardivo sembra essere associato ad una malattia meno "gra-

ve”, più sfumata ma anche più difficile da diagnosticare perché spesso confusa con disturbi di comportamento tipici della vecchiaia.

Conclusioni

Gli enormi progressi della ricerca, con l'identificazione di numerosi geni, di tante mutazioni e diverse locazioni cromosomiche, hanno lasciato sperare che si potesse trasferire tutto nella diagnostica corrente, con una caratterizzazione clinica-molecolare precisa delle varie forme di demenza. In realtà l'eterogeneità genetica e la presenza di mutazioni “private”, impediscono un'applicabilità immediata dei risultati. Ma la ricerca continua senza sosta. Esistono ancora tante demenze da identificare e tante famiglie con forme clinicamente note, ma “senza gene”. Molti cromosomi e tantissimi geni candidati sono oggi in studio nei laboratori di tutto il mondo. Ma la complessità e le interazioni tra i differenti geni e fattori di rischio rendono la strada irta di difficoltà. Possiamo solo augurarci di proseguire nel percorso delle conoscenze e di riuscire ad identificare ancora nuovi modelli semplici.

Bibliografia

- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349:704-6.
- Van Duinen SG, Castano EM, Prelli F, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis in patients of Dutch origin is related to Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5991-4.
- Jones CT, Morris S, Yates CM et al. Mutation in codon 713 of the beta amyloid precursor protein gene presenting with schizophrenia. *Nature Genet* 1992; 1:306-9.
- Carter DA, Desmarais E, Bellis M et al. More missense in amyloid gene. *Nat Genet* 1992; 2:255-6.
- Giaccone G, Rossi G, Morbin M, Tagliavini F, Bugiani O, Bruni A. A713T mutation of the APP gene in an Italian family with Alzheimer disease and severe congophilic angiopathy. *Neurobiology of Aging* 2002; 23:S320.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375:754-60.
- Bruni AC. Cloning of a gene bearing missense mutations in early onset Familial Alzheimer's Disease. - Calabrian study - *Funct Neurol* 1998; 13:257-61.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutation in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995; 376:775-8.
- Sherrington R, Froelich S, Sorbi S et al. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 1996; 5:985-8.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin 1 required for presenilin endoproteolysis and gamma secretase activity. *Nature* 1999; 398:513-7.
- Yu G, Nishimura M, Arawaka S et al. Nicastrin Modulates Presenilin-Mediated Notch/Glp1 And bAPP Processing *Nature* 2000; 407; 48-54.
- Roses AD, Devlin B, Conneally PM, et al. Measuring the genetic contribution of APOE in late-onset Alzheimer disease (AD). *Am J Hum Genet* 1995; 57:A202.
- Farrer LA, Bowirrat A, Friedland RP, Waraska K, Korczyn AD, Baldwin CT. Identification of multiple loci for Alzheimer disease in a consanguineous Israeli-Arab community. *Hum Mol Genet* 2003;12:415-22.
- Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M et al. APOE genotype does not modulate age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994; 169:179-80.
- Andreasen N, Blennow K, Sjodin C, Winblad B, Svardsudd K. Prevalence and incidence of clinically diagnosed memory impairment in a geographically defined general population in Sweden. *Neuroepidemiology* 1999; 18:144-55.
- Stevens M, van Duijn CM, Kamporst W, et al. Familial aggregation in frontotemporal dementia. *Neurology* 1998; 50:1541-5.
- Brun A, Englund B, Gustafson L, et al. Consensus statement: Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57:416-8.
- Kawarai T, Rogaeva E, Song YQ et al. Low frequency of tau mutations and further genetic heterogeneity in FTD. *Neurobiology of Aging* 2002; 23:S456.
- Curcio SAM, Kawarai T, Paterson AD et al. A large Calabrian kindred segregating Frontotemporal dementia. *J Neurol* 2002; 249:911-22.