

mgr BEATA JOANNA PEPLŃSKA

**POSZUKIWANIE ZMIAN W GENIE *MAPT*
W PRZYPADKACH OTEPIENIA
CZOŁOWO-SKRONIOWEGO**

ROZPRAWA DOKTORSKA



25 259

H 3913

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Paweł P. Liberski

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Im. M. J. Mossakowskiego

Warszawa, 2006

*Panu Profesorowi Pawłowi Liberskiemu,
promotorowi pracy, pragnę wyrazić wdzięczność za cenne uwagi i pomoc.*

*Pani Profesor Marii Barcikowskiej i Dr hab. Cezaremu Żekanowskiemu,
dziękuję za zaangażowanie i cierpliwość.*

*Współpracownikom z Zakładu Badawczo-Leczniczego Chorób Zwyrodnieniowych CUN
wdzięczna jestem za niezwykłą atmosferę pracy.*

Mojej Rodzinie bardzo dziękuję za wsparcie.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu w całości lub częściowo wykorzystano w publikacjach:

Peplowska B, Wszolek ZK. „Molekularne podłoże FTDP-17” w Ołepienia czołowo-skroniowe, red. Liberski PP, Wszolek ZK; Czelej 2005.

Żekanowski C, Golan M, Krzyłko KA, Religa D, Lipczyńska-Łojkowska W, Filipek S, Kowalska A, Rossa G, **Peplowska B**, Styczyńska M, Maruszak A, Wender M, Kulczycki J, Barcikowska M, Kuźnicki J. Two novel presenilin-1 gene mutations connected with frontotemporal dementia-like phenotype: genetic and bioinformatic assessment. Wysłane do redakcji, 2005.

Peplowska B, Żekanowski C, Religa D, Czyżewski K, Styczyńska M, Pfeffer A, Gabryelewicz T, Gołębowski M, Łuczywek E, Wasiak B, Barczak A, Chodakowska M, Barcikowska M, Kuźnicki J. Strong association between Saitohin gene polymorphism and tau haplotype in the Polish population. *Neurosci Lett.* 2003; 348: 163-166.

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

Przedstawione w Rozprawie Doktorskiej badania zostały w całości sfinansowane z grantu promotorskiego KBN nr 3 PO5A 075 23.

Kierownik grantu: Prof. Paweł P. Liberski

Beata Peplowska otrzymała w 2005 roku Stypendium dla Młodych Naukowców Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej oraz stypendium doktoranckie „L'Oreal dla Kobiet i Nauki”.

SPIS TREŚCI

SKRÓTY UŻYWANE W TEKŚCIE.....	6
1. WSTĘP	10
1.1. OTĘPIENIE CZOŁOWO-SKRONIOWE	10
1.2. OTĘPIENIE CZOŁOWO-SKRONIOWE Z ZESPOŁEM PARKINSONOWSKIM SPRZĘŻONE Z CHROMOSOMEM 17	11
1.2.1. Częstość	13
1.2.2. Kliniczne kryteria diagnostyczne	13
1.3. MOLEKULARNE PODŁOŻE FTDP-17	15
1.3.1. Struktura i procesowanie genu <i>MAPT</i>	15
1.3.2. Funkcje i struktura białka tau	16
1.3.2.1. Domeny funkcjonalne tau.....	17
1.3.2.2. Modyfikacje potranslacyjne tau.....	18
1.3.3. Białko tau w patologii	19
1.4. MUTACJE GENU <i>MAPT</i> W PRZYPADKACH FTDP-17	20
1.4.1. Mutacje procesowania <i>pre-mRNA</i>	23
1.4.1.1. Niszczenie przestrzennej struktury <i>pre-mRNA</i>	23
1.4.1.2. Zmiana elementów regulatorowych	26
1.4.2. Mutacje zmieniające właściwości białka tau	30
1.4.2.1. Osłabienie oddziaływania tau z mikrotubulami	31
1.4.2.2. Wzrost tendencji tau do autonukleacji.....	31
1.4.2.3. Zaburzenia fosforylacji tau	34
1.4.2.4. Zmiany konformacyjne tau.....	35
1.5. PODSTAWOWE KORELACJE FENOTYPOWO-GENOTYPOWE I RÓŻNICOWANIE	36
1.6. POTENCJALNE CZYNNIKI MODYFIKUJĄCE WPŁYW MUTACJI	37
2. CEL PRACY.....	39
3. MATERIAŁ I METODY.....	40
3.1. CHARAKTERYSTYKA BADANEJ GRUPY	40
3.2. IZOLACJA DNA Z KRWI OBWODOWEJ	40
3.3. PRZESZUKIWANIE SEKWENCJI KODUJĄCYCH GENU <i>MAPT</i>	41
3.3.1. Amplifikacja kodujących odcinków DNA	41
3.3.1.1. Amplifikacja eksonów: E1, E2, E3, E4, E6, E7, E10, E11, E12.....	41
3.3.1.2. Amplifikacja eksonu 4A.....	42
3.3.1.3. Amplifikacja eksonu 9.....	43

3.3.1.4. Amplifikacja eksonu 13.....	44
3.3.1.5. Amplifikacja eksonów 5 i 8.....	44
3.3.2. Oczyszczanie produktów amplifikacji.....	45
3.3.3. Bezpośrednie, cykliczne sekwencjonowanie fluorescencyjne.....	46
3.4. ANALIZA GENOTYPÓW.....	47
3.4.1. Oznaczanie genotypu apolipoproteiny E.....	48
3.4.2. Oznaczanie genotypu Saitohiny.....	49
3.4.3. Określanie haplotypu genu MAPT.....	50
3.5. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	52
4. WYNIKI.....	53
5. DYSKUSJA.....	67
5.1. ZŁOŻONOŚĆ DIAGNOSTYKI PRZYŻYCIOWEJ FTD A PRAWIDŁOWY DOBÓR BADANEJ GRUPY.....	67
5.2. MUTACJE W PATOGENEZIE OTEPIENIA CZOŁOWO-SKRONIOWEGO.....	72
5.3. ZMIANY W CZĘŚCI KODUJĄCEJ ORAZ BLISKICH SEKWENCJACH INTRONOWYCH GENU MAPT.....	82
5.4. INNE GENY ZAANGAŻOWANE W ROZWÓJ FTD.....	89
5.4.1. Saitohina.....	90
5.4.2. Apolipoproteina E.....	91
6. WNIOSKI.....	98
7. PIŚMIENNICTWO.....	99
8. STRESZCZENIE.....	119
9. SPIS TABEL I RYCIN ZAMIESZCZONYCH W TEKŚCIE.....	124

SKRÓTY UŻYWANE W TEKŚCIE

- A/a** - adenina wewnątrz sekwencji kodującej/niekodującej
- aa** – aminokwas
- AD** - ang. Alzheimer's disease - choroba Alzheimerera
- ALS** - ang. amyotrophic lateral sclerosis - stwardnienie zanikowe boczne
- APOE** - apolipoproteina E
- APOE** - gen kodujący apolipoproteinę E
- APP** - ang. amyloid precursor protein - białko prekursorowe amyloidu
- bp** - ang. base pair – para zasad
- C/c** - cytozyna wewnątrz sekwencji kodującej/niekodującej
- cAMP** - cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan
- CaMPKII** - ang. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II - kinaza klasy II aktywowana przez szlak Ca²⁺/kalmodulina
- CBD** - ang. corticobasal degeneration - zwyrodnienie korowo-podstawne
- CDK** - ang. cyclin-AMP-dependent kinase - kinaza zależna od cAMP
- cdk2/5** - ang. cyclin-dependent kinase 2/5 - kinaza zależna od cyklin 2/5
- CRHR1** - ang. corticotropin releasing hormone receptor 1 – gen kodujący receptor 1 hormonu uwalniającego kortykotropinę
- CT** - ang. computed tomography – tomografia komputerowa
- DDPAC** - ang. disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex - rodzina FTDP-17
- DLB** - ang. dementia with Lewy bodies - otępienie z ciałami Lewy'ego
- DLDN** - ang. dementia lacking distinctive neuropathology - otępienie bez wyróżniającej neuropatologii
- DMSO** – ang. dimethyl sulfoxide - dimetylosulfotlenek
- DNA** – ang. deoxyribonucleic acid - kwas deoksyrybonukleinowy
- dNTP** – ang. deoxynucleoside triphosphate – deoksynukleotydotrifosforan
- E** – kwas glutaminowy
- EDTA** – ang. ethylenediaminetetraacetate – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EEG** - badanie elektroencefalograficzne
- ESE** - ang. exon-splicing enhancer - sekwencja wzmacniająca składanie
- ESS** - ang. exon splicing silencer - sekwencja wyciszająca składanie

F - fenyloalanina

FTD - ang. frontotemporal dementia - otępienie czołowo-skroniowe

FTDP-17 - ang. frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17
otępienie czołowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17

FTLD - ang. frontotemporal lobar degeneration - zwyrodnienie płatowe
czołowoskroniowe

G - glicyna

G/g - guanina wewnątrz sekwencji kodującej/niekodującej

GSK3 β - ang. glycogen synthase kinase 3 β - kinaza syntazy glikogenu 3

H - histydyna

HDDD - ang. hereditary dysphasic disinhibition dementia - rodzina FTDP-17

HFTD2 - ang. hereditary frontotemporal dementia 2 - rodzina FTDP-17

I - izoleucyna

IBMPFD - ang. inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia - dziedziczna miopatia z chorobą Pageta i otępieniem czołowo-skroniowym

IMP5 - ang. intramembrane protease 5 – gen kodujący wewnątrz błonową proteazę 5

IR - interrepeat – domena między domenami powtórzonymi

K - lizyna

L - leucyna

LCR - ang. low-copy repeat – sekwencje powtórzone powstałe w wyniku rearanżacji genomowych

LKL - rodzina FTDP-17

LOD score - ang. logarithm of odds – logarytm dziesiętny

M - metionina

MAP - ang. mitogen activated protein – białko aktywowane mitogenem

MAPT - ang. microtubule-associated protein tau – gen kodujący białko tau

MARK - ang. microtubule-affinity regulating kinases – kinazy regulujące powinowactwo do mikrotubul

MMSE - ang. Mini Mental State Examination – krótka skala oceny stanu psychicznego

mRNA - ang. messenger ribonucleic acid – informacyjny kwas rybonukleinowy

MSTD - ang. multiple system tauopathy with dementia - rodzina FTDP-17

N - asparagina

NCNP - ang. National Center of Neurology and Psychiatry - rodzina FTDP-17

- NFT** - ang. neurofibrillary tangles - zwyrodnienie neurofibrilowe
- NINCDS/ADRDA** – ang. The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association - kryteria Narodowego Instytutu Chorób Neurologicznych i Udaru dla Choroby Alzheimer’a i Chorób Pokrewnych
- OUN** - ośrodkowy układ nerwowy
- P** - prolina
- PCR** - ang. polymerase chain reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy
- PD** - ang. Parkinson Disease – choroba Parkinsona
- PHF** - ang. paired helical filament – podwójne struktury helikalne
- PiD** - ang. Pick’s disease - choroba Picka
- PLC- γ** - izoforma γ fosfolipazy C
- PNFA** - ang. progressive nonfluent aphasia - pierwotnie postępująca afazja bez płynności mowy
- PNLD** - ang. pallido-nigro-Luysian degeneration - rodzina FTDP-17
- PPND** - ang. pallido-ponto-nigral degeneration - rodzina FTDP-17
- pre-mRNA** - prekursorowy mRNA
- PS1** - ang. presenilin 1 - presenilina 1
- PSENI** - gen kodujący presenilinę 1
- PSG** - ang. progressive subcortical gliosis - rodzina FTDP-17
- PSP** - ang. progressive supranuclear palsy - postępujące porażenie nadjądrowe
- Q** - glutamina
- R** - ang. repeat – domena powtórzona
- R** - arginina
- RFLP** - ang. restriction fragments length polymorphism - zmienność długości fragmentów restrykcyjnych
- S** - seryna
- SAP** - ang. stress-activated protein - białka aktywowane przez stres
- SD** - ang. semantic dementia - otępienie semantyczne
- SF** - ang. straight filament – struktury proste
- SH3** – ang. src homology region 3 – domena 3 homologii src
- SNP** – ang. single nucleotide polymorphism - polimorfizm pojedynczego nukleotydu
- SP** - ang. spastic paraparesis - spastyczne porażenie kończyn dolnych

SPECT – ang. single photon emission computed tomography – emisyjna tomografia pojedynczego fotonu

src – ang. sarcoma – cytozolowa kinaza tyrozynowa

STH - saitohina

STH - gen kodujący saitohinę

T - treonina

T/t - tymina wewnątrz sekwencji kodującej/niekodującej

U/u - uracyl wewnątrz sekwencji kodującej/niekodującej

U1snRNP – ang. small nuclear ribonucleoproteine U1 – mała jądrowa rybonukleoproteina 1 klasy U

UTR - ang. untranslated region - sekwencja nie ulegająca translacji

V - walina

VCHAT - ang. vesicular acetylcholine transporter - gen dla transportera acetylocholiny

VCP - ang. valosin-containing protein – gen kodujący białko p97

W - tryptofan

WNT3 - ang. wingless-type MMTV integration site member 3 – gen kodujący białko zaangażowane w rozwój OUN

1. WSTĘP

Po raz pierwszy klasyczną postać otępienia czołowo-skroniowego (FTD; ang. *frontotemporal dementia*) opisał Arnold Pick w 1906 roku. Przez blisko osiemdziesiąt lat otępienie związane z procesem zwyrodnieniowym obejmującym głównie płaty czołowe było uważane za rzadkość. Dopiero praca Brun opublikowana w 1987 roku wykazała, że u 12,5% przypadków osób z otępieniem stwierdza się w badaniu histopatologicznym cechy zwyrodnienia płatów czołowych i skroniowych (FTLD; ang. *frontotemporal lobar degeneration*) bez obecności zmian typowych dla choroby Alzheimera (AD; ang. *Alzheimer's disease*) (Brun 1987). W 1994 roku powstał termin otępienie czołowo-skroniowe. Odnosił się on do przypadków z dominującymi zaburzeniami zachowania wynikającymi z zajęcia płatów czołowych, z jednoczesnym procesem chorobowym obejmującym w różnym stopniu również płaty skroniowe (Lund and Manchester Groups 1994). Cztery lata później opublikowano obowiązujące do dziś kryteria diagnostyczne dla FTLD, powstałe na bazie wcześniejszych prac grup z Lund i Manchester (Neary i wsp. 1998). Według nich większość przypadków FTLD daje się zakwalifikować do jednego z podtypów klinicznych: otępienie czołowo-skroniowe, pierwotna postępująca afazja bez płynności mowy (PNFA; ang. *progressive nonfluent aphasia*) oraz otępienie semantyczne (SD; ang. *semantic dementia*). Podczas spotkania grona ekspertów na konferencji w Bethesda w 2000 roku przyjęto używać terminu FTLD w odniesieniu do obrazu neuropatologicznego, zaś FTD w odniesieniu do zespołu klinicznego (Trojanowski i Dickson 2001). Jednocześnie zaproponowano aktualnie obowiązujący przewodnik diagnostyki klinicznej i neuropatologicznej FTD (McKhann i wsp. 2001).

1.1. Otępienie czołowo-skroniowe

Obecnie ocenia się, że FTD może stanowić nawet drugą po AD przyczynę otępień pierwotnie zwyrodnieniowych w grupie osób przed 65 rokiem życia (Tolnay i Probst

2001), a trzecią po AD i otępieniu z ciałami Lewy'ego (DLB; ang. *dementia with Lewy bodies*) wśród osób w podeszłym wieku (Neary i wsp. 1998). Wyniki badań neuropatologicznych wskazują, że FTD może być przyczyną do 20% przypadków w tej grupie otępień (Lowe i Spillantini 1998, Knopman i wsp. 1990; Liberski i wsp. 2003). Zespół ten występuje równie często u obu płci. Czynniki natury socjoekonomicznej prawdopodobnie nie mają znaczenia. Objawy pojawiają się zwykle między 45 a 65 rokiem życia. Chorzy przeżywają przeciętnie 8 lat. FTD cechuje klinicznie kombinacja zmian osobowości, zaburzeń zachowania, deficytów w zakresie funkcji poznawczych (zwłaszcza językowych, wykonawczych i uwagi) oraz objawów neurologicznych. Ze względu na prezentowaną konstelację objawów wyodrębniono trzy podstawowe podtypy kliniczne FTD: z dominującym odhamowaniem, z dominującą apatią, z dominującą stereotypią. Niewykluczone, że rodzaj zaburzeń wiąże się z anatomiczną lokalizacją uszkodzeń. W 40–60% przypadków FTD występuje rodzinnie (Chow i wsp. 1999; Ratnavalli i wsp. 2002; Ikeda i wsp. 2004). Z punktu widzenia zmian neuropatologicznych FTD dzieli się na tauopatie oraz zespoły bez wyróżniającej patologii (DLDN; ang. *dementia lacking distinctive neuropathology*), które stanowią ponad 50% wszystkich przypadków (Mann i wsp. 2000, Rosso i wsp. 2003). U części chorych odkładanie złogów hiperfosforylowanego białka jest wynikiem mutacji w genie *MAPT* (ang. *microtubule-associated protein tau*). Ta szczególna postać FTD została określona jako otępienie czołowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17 (FTDP-17; ang. *frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*).

1.2. Otępienie czołowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17

FTDP-17 początkowo nie zostało zdefiniowane jako odrębna jednostka chorobowa ze względu na złożony przebieg kliniczny, który dodatkowo komplikowany jest

heterogennym obrazem histopatologicznym. Opisywane były jedynie zdefiniowane fenotypy, pojmowane jako odrębne choroby, często ograniczone do kilku opisanych przypadków. Nazwy tych pojedynczych zespołów pochodziły od objawów chorobowych, obrazu neuropatologicznego lub regionu geograficznego, z którego wywodził się proband / rodzina. W literaturze odnaleźć można więc charakterystyki rodzin: DDPAC (ang. *disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex*), PPND (ang. *pallido-ponto-nigral degeneration*), MSTD (ang. *multiple system tauopathy with dementia*), HDDD (ang. *hereditary dysphasic disinhibition dementia*), PSG (ang. *progressive subcortical gliosis*), rodzin: Duke 1684, australijskiej, holenderskiej, z Seattle A i innych (Reed i wsp. 2001; Ghetti i wsp. 2003).

W 1994 roku Wilhelmsen i wsp. odkryli genetyczne sprzężenie z chromosomem 17q21-22 w rodzinie z DDPAC (Wilhelmsen i wsp. 1994). Wkrótce pojawiły się kolejne doniesienia, potwierdzające związek dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący, nietypowych form otępienia czołowo-skroniowego, często z towarzyszącym zespołem parkinsonowskim, z tym samym obszarem długiego ramienia chromosomu 17 (Wijker i wsp. 1996; Bird i wsp. 1997; Heuting i wsp. 1997; Murrell i wsp. 1997; Lendon i wsp. 1998). Status choroby i szczegóły klasyfikacyjne ustalono na Międzynarodowej Konferencji w Ann Arbor w 1996 roku. W tym czasie znanych było jedynie 13 rodzin wykazujących LOD score (ang. *logarithm of odds*) powyżej 3 do mapowanego regionu, które zostały sklasyfikowane jako FTDP-17 (Foster i wsp. 1997). „Genem kandydatem” stał się natychmiast *MAPT*, którego lokalizacja pokrywa się z krytycznym miejscem na chromosomie 17. W 1998 roku potwierdzono, że mutacje w obrębie *MAPT* segregują z fenotypem chorobowym (Clark i wsp. 1998; Dumanchin i wsp. 1998, Hutton i wsp. 1998; Poorkaj i wsp. 1998; Spillantini i wsp. 1998b).

1.2.1. Częstość

FTDP-17 jest rzadkim zespołem klinicznym. Całkowita liczba opisanych dotychczas chorych wynosi około 500 osób, łącznie z tymi, którzy zmarli w poprzednich generacjach (Wszolek i wsp. 2003a; obserwacja własna wg Wszółka 2004). Obecnie na całym świecie znanych jest ponad 100 rodzin obciążonych mutacją genu *MAPT*: w Ameryce Północnej (Kanada i USA), Europie (Francja, Irlandia, Hiszpania, Holandia, Niemcy, Szwecja, Wielka Brytania, Włochy), Azji (Izrael, Japonia) i Australii (Reed i wsp. 2001; Ghetti i wsp. 2003). Nie istnieją udokumentowane przypadki zachorowań w Polsce (Kowalska i wsp. 2001; Żekanowski i wsp. 2003a).

1.2.2. Kliniczne kryteria diagnostyczne

FTDP-17 jest dziedzicznym zespołem neurozwyrodnieniowym. Nie istnieją ścisłe kryteria, pozwalające na precyzyjne rozpoznanie choroby. Chorzy prezentują jednak konstelację objawów, obejmującą co najmniej dwa z trzech podstawowych zaburzeń:

1. Postępujący neuropsychiatryczny zespół obejmujący zaburzenia osobowości i zachowania: Chorych charakteryzuje brak kontroli zachowań impulsywnych, skrócenie dystansu, brak taktu, agresja słowna i fizyczna, wesołkowatość, alkoholizm, hiperoralność (łącznie z konsumpcją przedmiotów niejadalnych), nadmierna religijność, powtarzające się stereotypowe i kompulsywne zachowania, brak wglądu we własną chorobę, zaniedbywanie higieny osobistej, niezdolność do adekwatnych sądów i sztywność myślenia. Pojawiać może się również psychoza z halucynacjami wzrokowymi i słuchowymi, urojenia, paranoja. Zaburzenia afektywne to głównie objawy depresji, lęki, myśli samobójcze, utrata empatii, obojętność emocjonalna, apatia i objawy hipochondryczne.

2. Deficyty poznawcze i językowe: W początkowych fazach choroby stosunkowo dobrze zachowana jest pamięć, orientacja i funkcje wzrokowo przestrzenne, ulegające deterioracji w przebiegu zwyrodnienia. Często, wraz z początkiem choroby zauważa się

postępującą redukcję mowy: ograniczenie mowy spontanicznej, stereotypie wypowiedzi, persewercje słowne, echolalię, palilalię prowadzące do mutyzmu. Zaburzone są funkcje wykonawcze, takie jak planowanie i organizowanie działań złożonych. Pojawia się zależność od działającego w środowisku bodźca (zachowanie użytkownika). Wyraźne są również deficyty w zakresie świadomego kierowania uwagą.

3. Zaburzenia ruchowe: Pierwszy objaw choroby stanowić może zespół parkinsonowski, jakkolwiek w wielu przypadkach dołącza się on w przebiegu choroby lub nie pojawia się wcale. Parkinsonizm w FTDP-17 cechuje spowolnienie i sztywność pozapiramidowa, zazwyczaj brak drżenia spoczynkowego i śladowa reakcja na leczenie środkami dopaminergicznymi. Wcześniej występujące w przebiegu choroby upadki i zaburzenia ruchowe gałek ocznych, mogą błędnie sugerować postępujące porażenie nadjądrowe (PSP; ang. *progressive supranuclear palsy*). Rzadziej zdarza się, aby zespół parkinsonowski połączony był z apraksją, dystonią i znaczącą asymetrią, podobnie jak w przypadkach zwyrodnienia korowo-podstawnego (CBD; ang. *corticobasal degeneration*). W zaawansowanej postaci choroby dołączać mogą się objawy uszkodzenia górnego neuronu ruchowego. Rzadziej dochodzi do równoczesnego zajęcia dolnego neuronu ruchowego w połączeniu z atrofią mięśniową i fascykulacjami. Badanie neurologiczne może wykazać występowanie odruchów deliberacyjnych oraz zespół piramidowy z obecnością wygórowanych odruchów ścięgnistych, klonusów i objawu Babińskiego. Inne zaburzenia ruchowe obejmują: mioklonie, drżenie pozycyjne i zamiarowe, płasawicę. U części chorych obserwuje się dysfagię i dyzartrię.

Dodatkowymi kryteriami pomocnymi w rozpoznaniu tej jednostki chorobowej są:

- Dodatni wywiad rodzinny, sugerujący zazwyczaj dziedziczenie o charakterze autosomalnym dominującym.

- Początek objawów chorobowych zwykle pomiędzy trzecią a piątą dekadą życia. Średni wiek zachorowania : 49 lat (25 – 76 lat).
- Szybki postęp choroby. Średni okres przeżycia 8.5 roku (2 – 26 lat).
- Dodatkowe objawy w postaci: napadów padaczkowych i powtarzających się stanów padaczkowych niepodatnych na leczenie standartowymi lekami, zaburzeń czucia somatycznego, zaniku węchu, nie trzymania moczu i stolca, spadku wagi ciała w dużej części spowodowanego dysfagią.
- Możliwa różnorodność objawów klinicznych wśród chorych w tej samej rodzinie (Ghetti i wsp. 2003; Wszolek i wsp. 2003a,b).

1.3. Molekularne podłoże FTDP-17

Zrozumienie mechanizmów patogenetycznych leżących u podstaw FTDP-17, pozwala lepiej poznać podłoże molekularne innych chorób związanych z nieprawidłowym metabolizmem białka tau, takich jak AD, choroba Picka (PiD; ang. *Pick's disease*), PSP i CBD.

1.3.1. Struktura i procesowanie genu *MAPT*

Gen *MAPT* koduje białko tau. Gen ten został sklonowany przez Goederta i wsp. w 1988 roku (Goedert i wsp. 1988). Zlokalizowany jest on na długim ramieniu chromosomu 17 (17q21) i liczy ponad 130 kbp, przy czym część kodująca stanowi niewiele więcej niż 2300 bp (Poorkaj i wsp. 2001a). *MAPT* złożony jest z 16 eksonów, z których 14 ulega ekspresji na poziomie białka, 2 natomiast stanowią część sekwencji nie ulegających translacji: 5'UTR i 3'UTR (ang. *untranslated region*) (Andreadis i wsp. 1992). Trzech eksonów nie odnaleziono w mRNA ośrodkowego układu nerwowego. Są to eksony: E4A, E6, E8 wchodzące w skład sekwencji kodującej obwodową formę białka (Himmler i wsp. 1989). W prawidłowym mózgu dorosłego człowieka występuje 6 izoform tau (od 352 aa do 441 aa), powstałych na skutek alternatywnego splicingu (składania)

eksonów: E2, E3 i E10 pre-mRNA (Goedert i wsp. 1988; Goedert i wsp. 1989a,b; Andreadis i wsp. 1992). W wyniku różnicowego splicingu eksonów E2 i E3 z N-końca tau znajdują się odpowiednio 29 (1N) lub 58 (2N) aminokwasowe wstawki. Istnieje też izoforma białka pozbawiona insercji (0N) (Goedert i wsp. 1989a) (Rycina1).



Rycina 1. Alternatywne składanie genu *MAPT*.

Górny panel przedstawia strukturę genu *MAPT* z zaznaczonym konstytutywnym i alternatywnym splicingiem eksonów. Panel dolny prezentuje izoformy białka tau w ośrodkowym układzie nerwowym. Kolorem fioletowym oznaczono eksony wchodzące w skład sekwencji kodującej obwodową formę białka, kolorem zielonym eksony składane konstytutywnie, kolorem żółtym i czerwonym eksony podlegające alternatywnemu splicingowi.

1.3.2. Funkcje i struktura białka tau

Białko tau należy do rodziny białek cytoplazmatycznych związanych z mikrotubulami. Tau występuje głównie w aksonach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, w mniejszym stopniu ulega ekspresji również w oligodendrocytach i w astrocytach (LoPresti i wsp. 1995). Rola tau wiąże się przede wszystkim z polimeryzacją tubulin i dynamiczną stabilizacją mikrotubul, będących agregatami tubulin i innych białek. Poprzez uczestnictwo w utrzymaniu przestrzennej organizacji struktury cytoszkieletu, tau zapewnia wysoce asymetryczną morfologię aksonów oraz integralność

wewnątrzkomórkowego transportu cytoplazmatycznego (Goedert i wsp. 1989a; Andreadis i wsp. 1992). Tau prawdopodobnie bierze również udział w modulowaniu wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów oraz w procesach plastyczności układu nerwowego (Lee i wsp. 1998).

1.3.2.1. Domeny funkcjonalne tau

N-koniec tau, określany jako domena projekcyjna, zaangażowany jest w szereg funkcji. Domena ta odgrywa istotną rolę w określaniu odległości między mikrotubulami w aksonach, nadając im tym samym odpowiednią średnicę (Chen i wsp. 1992). Bogate w kwaśne aminokwasy wstawki kodowane przez eksony 2 i 3, za którymi następuje region bogaty w prolinę, uwypuklają się z powierzchni mikrotubuli umożliwiając jej oddziaływanie z błoną komórkową (Brandt i wsp. 1995) oraz z innymi elementami cytoszkieletu: spektryną (Carlier i wsp. 1984) i filamentami aktyny (Correas i wsp. 1990). Domena N-końcowa zapewnia również transport komponentów komórkowych (Ebner i wsp. 1998). Bogaty w prolinę (motyw PXXP) obszar tau ujawnia tendencję do oddziaływania z domenami SH3 niereceptorowych kinaz tyrozynowych rodziny src (Lee i wsp. 1998) oraz fosfolipazy PLC- γ , wzmacniając jej aktywność (Hwang i wsp. 1996). Zatem białko tau nie tylko jest zaangażowane w organizowanie przestrzenne szkieletu komórkowego, ale może stanowić ważne ogniwo na szlaku transdukcji sygnału w komórce.

Mimo tak istotnych funkcji regulowanych przez domenę N-końcową tau, za zasadniczą dla aktywności tego białka uważa się domenę C-terminalną. Zlokalizowane są w niej 3 lub 4 18-aminokwasowe tandemowo ułożone powtórzenia (R; ang. *repeat*) o wysoce konserwatywnej sekwencji, rozdzielane 13- lub 14-aminokwasowymi, bardziej zróżnicowanymi elementami. Sekwencje powtórzone (R1, R2, R3, R4) odpowiadają za oddziaływanie tau z mikrotubulami i kodowane są przez eksony: E9, E10, E11 i E12.

Gdy ekson 10 ulega splicingowi, powstające białko posiada cztery tandemowo ułożone powtórzenia i taką izoformę określa się jako 4R, w kontraście do izoformy 3R, powstającej gdy ekson 10 nie ulega ekspresji na poziomie białka (Goedert i wsp. 1989a,b; Lee i wsp. 1989; Andreadis i wsp. 1992). Izoforma 4R wykazuje większą wydajność w promowaniu polimeryzacji tubulin i silniejsze powinowactwo do mikrotubul niż izoforma 3R (Panda i wsp. 1995). Obszarem najskuteczniej stymulującym polimeryzację mikrotubul jest region między pierwszym (R1) a drugim (R2) powtórzeniem, który wykazuje ponad dwukrotnie silniejszy wpływ niż każda z sekwencji powtórzonych. Swoista dla tego obszaru jest sekwencja $_{274}KVQIINKK_{281}$, unikatowa dla izoformy 4R. Być może, nieobecność tej sekwencji powoduje powstanie izoformy o obniżonej fizjologicznie możliwości łączenia się z mikrotubulami (3R) (Goode i Feinstein 1994). W mózgu dorosłego człowieka stosunek ekspresji izoformy 3R do 4R jest bliski jedności, podczas gdy w mózgu płodu występuje tylko najkrótsza izoforma białka, pozbawiona dodatkowych wstawek (3R/0N) (Goedert i wsp. 1989a,b). To zróżnicowanie izoform wydaje się mieć znaczenie w plastyczności rozwijającego się układu nerwowego.

1.3.2.2. Modyfikacje potranslacyjne tau

W warunkach prawidłowych, tau podlega potranslacyjnemu procesowi fosforylacji. Modyfikacja ta odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności białka, szczególnie zaś wpływa na zdolność formowania kompleksów tau z mikrotubulami. W najdłuższej izoformie białka istnieje 79 reszt serynowych (S) i treoninowych (T), będących potencjalnymi akceptorami grup fosforanowych, przy czym większość znajduje się poza domenami wiązania białka tau z mikrotubulami (Buee i wsp. 2000). Fosforylacja tau regulowana jest przez kinazy, spośród których większość to kinazy prolino-zależne. Należą do nich kinazy MAP (ang. *mitogen activated protein kinases*) (Drewes i wsp. 1992), kinaza syntazy glikogenu (GSK3 β ; ang. *glycogen synthase kinase 3 β*) (Hanger i wsp. 1992),

kinazy zależne od cyklin (cdk2 i cdk5; ang. *cyclin-dependent kinase*) (Bauman i wsp. 1993) oraz kinazy białek aktywowanych przez stres (SAP; ang. *stress-activated protein*) (Goedert i wsp. 1997). W miejscach, w których nie występują reszty S/P czy T/P, fosforylacja zachodzi przy udziale kinaz klasy II aktywowanych przez szlak Ca^{2+} /kalmodulina (CaMPKII; ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) (Baudier i Cole 1987), kinaz zależnych od cAMP (CDK; ang. *cyclin-AMP-dependent kinase*) (Litersky i Johnson 1992) oraz kinaz regulujących powinowactwo do mikrotubul (MARK; ang. *microtubule-affinity regulating kinases*) (Drewes i wsp. 1997).

Poziom fosforylacji tau podlega regulacji w przebiegu ontogenezy. Białko to jest wysoce fosforylowane u płodu. Stopień fosforylacji obniża się wraz z wiekiem, prawdopodobnie na skutek aktywacji endogennych fosfataz. W wyniku podwyższonego poziomu fosforylacji, płodowe izoformy tau (3R/0N) mają dodatkowo zredukowane możliwości wiązania z tubulinami. Zjawisko to umożliwia szybkie łączenie, jak i rozdzielanie tych białek, co ma ogromne znaczenie w procesie plastycznego rozwoju neuronów, pozwalając na rozrost ich aksonów (Wszolek i wsp. 2003a).

1.3.3. Białko tau w patologii

Zwiększona aktywacja endogennych kinaz prowadzi do hiperfosforylacji białka tau i redukcji jego powinowactwa do mikrotubul (Biernat i wsp. 1993). Udowodniono, że fosforylacja pojedynczych miejsc w obrębie domen powtórzonych, jest jednak niewystarczająca, aby doprowadzić do procesu patologicznego - tym bardziej, że wiele miejsc ulega takiej modyfikacji również w ciągu życia płodowego (Seubert i wsp. 1995). Oddziaływanie tau z mikrotubulami jest modulowane przez obszary znajdujące się poza sekwencjami R1-R4. Sugeruje się, że heptapeptyd $_{224}KKVAVVR_{230}$ zlokalizowany na N-końcu tau, znacząco zwiększa powinowactwo regionów powtórzonych (R) do mikrotubul (Goode i wsp. 1997). Przyczynę zaburzeń interakcji między białkami stanowi

zatem nie tylko hiperfosforylacja tau, ale również zmiana wzorca ufosforylowania tego białka, skutkująca zachwianiem wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań między jego poszczególnymi domenami. Fosforylacja w krytycznych miejscach przyłączonego do mikrotubul tau powoduje jego oddysocjowanie i depolimeryzację tubulin, co w konsekwencji prowadzi do destabilizacji struktur mikrotubularnych (Johnson i Bailey 2002).

Zarówno w wyniku zaburzeń w wiązaniu tau do mikrotubul, jak i na skutek zakłóceń w równowadze pomiędzy jego izoformami, dochodzi do nagromadzenia się w komórce nadmiernych ilości wolnego, hiperfosforylowanego białka, wykazującego tendencję do polimeryzacji, co prowadzi do tworzenia nierozpuszczalnych filamentów o różnej morfologii. Proces nukleacji nasila obecność dodatkowych czynników anionowych, do których należą kwasy tłuszczowe, kwasy nukleinowe oraz glikozaminoglikany. Dalsza agregacja prowadzi do powstawania zwyrodnienia neurofibrilarnego (NFT, ang. *neurofibrillary tangles*) (Spillantini i wsp. 1998a). NFT są stabilizowane przez dodatkowe, potranslacyjne modyfikacje, takie jak ubikwitynacja, glikacja, N- i O-glikozylacja (Buee i wsp. 2000). Komórka zawierająca NFT podlega zwyrodnieniu i obumiera w wyniku zaburzenia funkcjonowania mikrotubul oraz na skutek gromadzenia się toksycznych złogów tau (ang. *gain of function*). W rezultacie neurony nie są w stanie przekazywać impulsu elektrycznego, transportować substancji odżywczych i innych składników (Wszolek 2004).

1.4. Mutacje genu *MAPT* w przypadkach FTDP-17

W przypadku FTDP-17 u podstaw tak daleko idących zmian w funkcjonowaniu neuronu leżą mutacje w obrębie genu *MAPT*. Obecnie znanych jest 39 mutacji przyczynowo związanych z chorobą (Tabela 1).

Tabela 1. Mutacje genu *MAPT*.

Mutacja	Lokalizacja/ typ	E 10	Fenotyp	rodzina	Referencje
R5L CGC/CTC	E1 zmiany sensu	=	PSP	NO	Poorkaj i wsp. 2001c
R5H CGC/CAC	E1 zmiany sensu	=	FTDP-17	japońska	Hayashi i wsp. 2002
K257T AAG/ACG	E9 (R1) zmiany sensu	=	PiD	UK	Pickering-Brown i wsp. 2000a Rizzini i wsp. 2000
I260V ATC/GTC	E9 (R1) zmiany sensu	=	FTD	NO	Lee i wsp. 2001 Grover i wsp. 2003
L266V CTG/GTG	E9 (R1) zmiany sensu	=	PiD	NO japońska	Hogg i wsp. 2003 Kobayashi i wsp. 2003
G272V GGC/GTC	E9 (R1) zmiany sensu	=	PiD	holenderska (HFTD2)	Hutton i wsp. 1998
E9+33 g/a	I9 składania	NO	FTD	holenderska	Rizzu i wsp. 1999
N279K AAT/AAG	E10 (IR 1/2) zmiany sensu	>	PSP	USA (PPND) francuska japońska (PNLD) japońska (NCNP) japońska (Tokyo-1)	Clark i wsp. 1998 Delisle i wsp. 1999 Yasuda i wsp. 1999 Arima i wsp. 2000 Tsuboi i wsp. 2002
Δ280K delAAG	E10 (IR 1/2) delecyjna	<	FTDP-17	holenderska	Rizzu i wsp. 1999
L284L CTT/CTC	E10 (IR 1/2) milcząca	>	FTD	USA (LKL)	D'Souza i wsp. 1999
N296N AAT/AAC	E10 (R2) milcząca	>	CBD	UK	Spillantini i wsp. 2000
N296H AAT/CAT	E10 (R2) zmiany sensu	>	FTDP-17	japońska	Iseki i wsp. 2001
Δ296N delAAT	E10 (R2) delecyjna	=	PSP	hiszpańska	Pastor i wsp. 2001
P301L CCG/CTG	E10 (R2) zmiany sensu	=	FTDP-17 PSP CBD	4 rodziny holenderskie (w tym HFTD1) 6 rodzin francuskich 5 rodzin USA 4 rodziny kanadyjskie rodzina japońska	Clark i wsp. 1998 Dumanchin i wsp. 1998 Hutton i wsp. 1998 Mirra i wsp. 1999 Nasreddine i wsp. 1999 Kodama i wsp. 2000 Rizzu i wsp. 2000
P301S CCG/TCG	E10 (R2) zmiany sensu	=	FTDP-17 CBD	włoska (Family P) niemiecka	Bugiani i wsp. 1999 Sperfeld i wsp. 1999
P301P CCG/CCA	E10 (R2) milcząca	=	PSP	japońska	Miyamoto i wsp. 2001
G303V GGC/GTC	E10 (R2) zmiany sensu	>	PSP	francuska	Ros i wsp. 2005
S305S (-1) AGT/AGC	E10 (IR 2/3) milcząca/ składania	>	PSP	australijska (PD6 Family)	Stanford i wsp. 2000

S305N (-2) AGT/AAT	E10 (IR 2/3) zmiany sensu/ składania	>	CBD	japońska	Iijima i wsp. 1999
E10+3 g/a	I10 składania	>	FTDP-17	USA (MSTD)	Spillantini i wsp. 1998b
E10+11 t/c	I10 składania	>	PSP	japońska	Miyamoto i wsp. 2001
E10+12 c/t	I10 składania	>	FTDP-17	japońska (FTD-Kumamoto)	Yasuda i wsp. 2000
E10+13 g/a	I10 składania	>	FTDP-17	UK (Man 19)	Hutton i wsp. 1998
E10+14 c/t	I10 składania	>	FTDP-17/ ALS	irlandzka (DDPAC)	Hutton i wsp. 1998
E10+16 c/t	I10 składania	>	FTDP-17	Australijska (Aus I) USA (Duke) USA (FTD002) 4 rodziny UK (Man6, Man23, Family4, Family8), PSG-1	Hutton i wsp. 1998 Goedert i wsp. 1999 Morris i wsp. 1999a Jansen i wsp. 2002 Lantos i wsp. 2002 Pickering-Brown i wsp. 2002
E10+19 c/g	I10 składania	<	FTD	australijska	Stanford i wsp. 2003
E10+29 g/a	I10 składania	<	FTD	australijska	Stanford i wsp. 2003
L315R CTG/CGG	E11 (IR 2/3) zmiany sensu	=	PiD	2 rodziny holenderskie	van Herpen i wsp. 2003
K317M AAG/ATG	E11 (IR 2/3) zmiany sensu	=	PSP/CBD/ ALS	2 rodziny hiszpańskie	Zarranz i wsp. 2005
S320F TCC/TTC	E11 (R3) zmiany sensu	=	PiD	holenderska	Rosso i wsp. 2002a
Q336R CAG/CGG	E12 (IR 3/4) zmiany sensu	=	FTD	angielska	Pickering-Brown i wsp. 2004
V337M GTG/ATG	E12 (IR 3/4) zmiany sensu	=	FTDP-17	czechosłowacka (Seattle A)	Poorkaj i wsp. 1998 Hasegawa. 1998
E342V GAG/GTG	E12 (IR 3/4) zmiany sensu	=	FTDP-17	amerykańska (RK's family)	Lippa i wsp. 2000
S352L TCG/TTG	E12 (R4) zmiany sensu	=	niewydolność oddechowa	UK (Yorkshire)	Nicholl i wsp. 2003
K369I AAA/ATA	E12 zmiany sensu	=	PiD	niemiecka	Neumann i wsp. 2001
G389R GGG/CGG	E13 zmiany sensu	=	PiD	włoska (familyF)	Murrell i wsp. 1999
G389R GGG/AGG	E13 zmiany sensu	=	PiD	angielska	Pickering-Brown i wsp. 2000a
R406W CGG/TGG	E13 zmiany sensu	=	PSP	amerykańska FTD004 holenderska(HFTD 4)	Hutton i wsp. 1998
T427M ACG/ATG	E13 zmiany sensu	NO	FTD	włoska	Giaccone i wsp. 2004

E - ekson; I - intron; R - domena wiążąca mikrotubule; IR - domena pomiędzy domenami R;
NO - nie określono; = bez zmian; > wzrost; < spadek

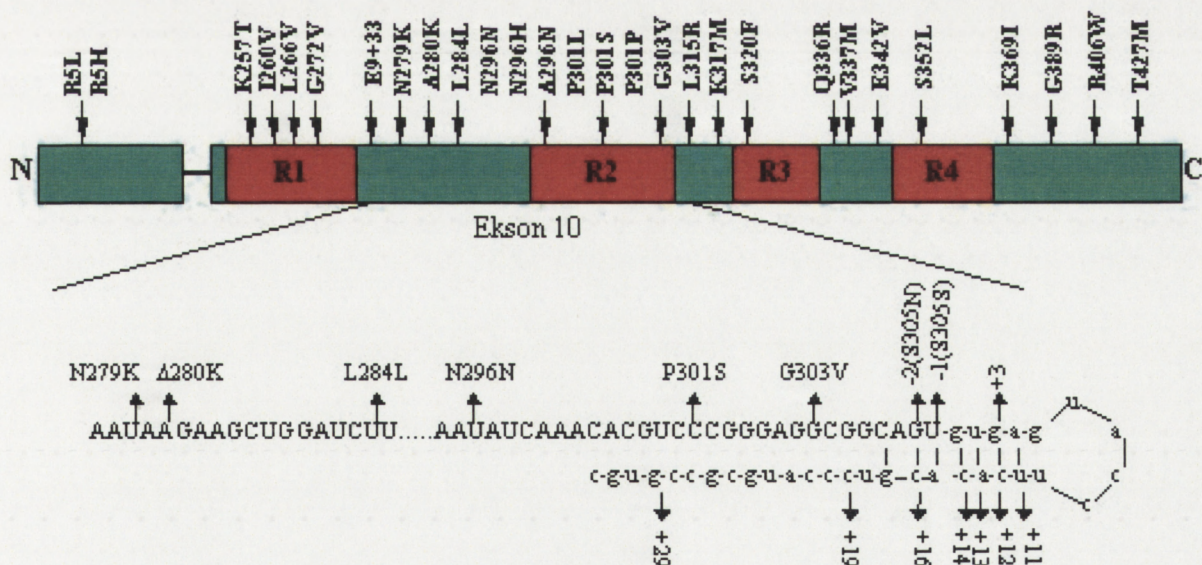
Z pośród wszystkich mutacji *MAPT* tylko 2 ułożone są na N-końcu białka, a 33 związane są z obszarem odpowiedzialnym za oddziaływanie tau z tubulinami. Dwadzieścia z nich lokalizuje się wewnątrz lub w bezpośrednim sąsiedztwie eksonu 10 (Rycina 2).

1.4.1. Mutacje procesowania pre-mRNA

Podstawienia nukleotydowe w obrębie intronu 10 oraz pewien odsetek eksonowych mutacji są już zauważalne na etapie dojrzewania pre-mRNA. Wpływają one na alternatywne składanie (splicing) E10, co w konsekwencji prowadzi do zachwiania proporcji między stężeniem izoform 3R i 4R tau.

1.4.1.1. Niszczanie przestrzennej struktury pre-mRNA

Mutacje intronu 10 obejmują 5' miejsce splicingowe, w obrębie którego znajduje się inhibitorowa struktura przestrzenna typu „pień-pętla” (Rycina 2).



Rycina 2. Lokalizacja mutacji genu *MAPT*.

Wyróżniono domeny odpowiedzialne za oddziaływanie z mikrotubulami (R1-R4) oraz strukturę przestrzenną miejsca 5' splicingowego dla eksonu 10. Proporcje nie zostały zachowane.

Maskując miejsce splicingu, pozwala ona, aby E10 był wycinany z przetwarzanego mRNA. „Pień” formuje podwójna helisa składająca się z par C-G i A-U. Sześć niesparowanych nukleotydów tworzy szczytową „pętlę”. Mutacje ulokowane w „pniu” redukują termodynamiczną stabilność tej trójwymiarowej struktury (Varani i wsp. 1999). Najmniej stabilny mutant, powstały na skutek podstawienia nukleotydu w pozycji +3, redukuje temperaturę topnienia struktury przestrzennej mRNA położonej poza eksonem 10 o 19°C. Słabszy efekt prezentowany jest w przypadku mutacji: +12, +14, -1, +16, +13, obniżających temperaturę odpowiednio o 15°C (z 72°C do 57°C), 15°C, 12°C, 9°C i 6°C (Varani i wsp. 1999; Yasuda i wsp. 2000). Gover i wsp. (1999) stosując metodę *in vitro* „exon trapping” sugerowali, że mutacje -2, -1, +3, +13, +14 i +16 nasilają włączanie eksonu 10. Dla odróżnienia, wprowadzane sztucznie zmiany w obrębie „pętli” (+8 i +9) nie mają żadnego efektu patogenicznego (Grover i wsp. 1999).

Destabilizacja wynikająca z podstawień nukleotydowych umożliwia formowanie kompleksu splicingowego, odpowiedzialnego za usunięcie jedynie intronu 10. Mutacje ujawniają się więc już na etapie procesowania pre-mRNA i prowadzą do nadreprezentacji formy 4R tau, zaburzając tym samym równowagę między poszczególnymi izoformami tego białka (Hong i wsp. 1998; Hutton i wsp. 1998; D'Souza i wsp. 1999; Grover i wsp. 1999; Hasegawa i wsp. 1999; Varani i wsp. 1999). Mechanizm, który prowadzi do neurodegeneracji, na skutek zachwiania proporcji poszczególnych izoform białka tau, pozostaje jednak niejasny. Niewykluczone, że izoformy 3R i 4R wiążą się do odrębnych, ściśle określonych domen mikrotubuli (Goode i Feinstein 1994; Goode i wsp. 1997, D'Souza i wsp. 1999), stąd specyficzne ich proporcje wydają się być konieczne do prawidłowego funkcjonowania komórek. W dodatku, nadprodukcja jednej z izoform może leżeć bezpośrednio u podstaw zwiększenia puli wolnego białka w cytoplazmie, a tym

samym wzmacniać tendencję tau do polimeryzacji i formowania filamentów (Lee i wsp. 2001).

Ostatni kodon eksonu 10, triplet 305, jest również częścią „pnia”. Milcząca mutacja S305S (AGT do AGC) powoduje zaburzenie przestrzennej struktury inhibitorowej „pień-pętla” na skutek tranzycji T do C w pozycji -1, co prowadzi do prawie pięciokrotnego wzrostu częstości włączenia eksonu 10 (Stanford i wsp. 2000). Mutacja S305N (AGT do AAT) zachodzi w wyniku tranzycji G do A w pozycji -2 (Iijima i wsp. 1999) i prowadzi do modyfikacji konserwatywnej sekwencji 5' splicingu E10 z GUgugagu, na sekwencję będącą silniejszym wzmacniaczem splicingu: AUgugagu. Tak zmieniony obszar zbliżony jest do sekwencji miejsca 5' splicingu (AGGu(a/g)agu) dla konstytutywnie włączanych eksonów (D'Souza i wsp. 1999). Na skutek mutacji S305N stosunek izoform 4R/3R wzrasta 26-krotnie (Hasegawa i wsp. 1999), a izoforma 4R stanowi 80.6% białka tau w komórce (D'Souza i wsp. 1999). Mutacje -2 i +3 mogą dodatkowo wzmacniać splicing eksonu 10, przez zwiększenie powinowactwa podstawowego czynnika składania, U1snRNP do zmienionego przez nie regionu (Spillantini i wsp. 1998b; Iijima i wsp. 1999; Varani i wsp. 1999). Podstawienie g→a w pozycji +3 w sposób istotny podnosi częstość włączania E10, powodując że izoforma 4R stanowi 98% całej puli tau (D'Souza i wsp. 1999). Obecność tej mutacji opisano w jednej z największych rodzin FTDP-17, MSTD. Dotychczas zachorowało 41 osób z 7-pokoleniowej rodziny, obejmującej łącznie 383 członków. Średni wiek zachorowania wynosi 49 ± 10 lat. Choroba manifestuje się postępującymi zaburzeniami krótkotrwałej pamięci i równowagi. W końcowej fazie dołączają się otępienie, bradykinezyja, sztywność, dysfagia, porażenie nadjądrowe i wygórowanie odruchów głębokich (Murrel i wsp. 1997; Spillantini i wsp. 1997; 1998b).

Podobnie silnym wpływem, prowadzącym do znacznej nadreprezentacji izoformy 4R (98% wg. D'Souza i wsp. 1999), odznacza się podstawienie c→t w pozycji +14 intronu

10, opisana w rodzinie DDPAC (Lynch i wsp. 1994; Hutton i wsp. 1998). Chorzy demonstrują zaburzenia zachowania i osobowości, do których często dołącza się parkinsonizm. Średni wiek zachorowania wynosi 45 lat. Chorzy umierają w przeciągu 13 lat (Reed i wsp. 2001).

Mutacja +16 jest sprzężona z lżejszym przebiegiem klinicznym, co wykazuje nieco odmienny wpływ poszczególnych podstawień intronowych na stabilność struktury „pień-pętla”. Powoduje ona 11-krotne zwiększenie częstości włączania E10 (Hasegawa i wsp. 1999) i 70% wzrost stosunku 4R/3R tau we frakcji rozpuszczalnej (Goedert i wsp. 1999). Dotychczas zidentyfikowano 9 rodzin obciążonych tą zmianą, wykazujących podobne objawy: zaburzenia osobowości, osłabienie pamięci, ubytki językowe, zachowania rytualne, odhamowanie lub żarłoczność. Parkinsonizm i odruchy deliberacyjne obecne są jedynie u niektórych chorych. Śmierć może nastąpić nawet po 22 latach od rozpoczęcia choroby (w wieku około 50 lat) (Jansen i wsp. 2002).

Podstawienie g→a w pozycji +33 intronu 9, może również przejawiać wpływ na różnicowy splicing E10, chociaż mechanizm jej działania pozostaje niejasny. Według wstępnych koncepcji zmiana ta niszczy pierwszy z ośmiu motywów (a/u)ggg zaangażowanych w proces splicingu (Rizzu i wsp. 1999).

1.4.1.2. Zmiana elementów regulatorowych

Regulacja włączania eksonu 10 w pre-mRNA *MAPT* jest procesem skomplikowanym, angażującym elementy *cis*-regulatorowe, w tym sekwencje wzmacniające splicing, ESE (ang. *exon-splicing enhancer*) oraz sekwencje wyciszające splicing, ESS (ang. *exon splicing silencer*). Elementy *cis*- oddziałują ze złożonymi kompleksami *trans*-regulatorowych czynników białkowych (D'Souza i wsp. 1999; Gao i wsp. 2000). Patogenne mutacje mogą zwiększać ekspresję E10 na poziomie białka przez modyfikację tych właśnie sekwencji.

Mutacja N279K (Clark i wsp. 1998; Delisle i wsp. 1999; Yasuda i wsp. 1999; Arima i wsp. 2000; Tsuboi i wsp. 2002) powoduje wydłużenie szlaku polipurynowego (przejście TAAGAAG na GAAGAAG), wzmacniając już istniejącą sekwencję ESE. Nie wyklucza się też, że generuje ona zupełnie nową sekwencję wzmacniającą, przez formowanie powtórzeń GAR (gdzie R stanowi resztę purynową). Udowodniono, że powtórzenia te, obecne w dwóch lub większej liczbie kopii, zaangażowane są w splicing innych genów (Clark i wsp. 1998; Hong i wsp. 1998; D'Souza i wsp. 1999; Yasuda i wsp. 1999; D'Souza i Schellenberg 2000). Mutacja N279K 18-krotnie zwiększa stosunek izoform 4R/3R (Hasegawa i wsp. 1999) tak, że izoforma 4R stanowi 79.1% całej puli tau w komórce (D'Souza i wsp. 1999). Jedną z lepiej opisanych rodzin obciążonych tą zmianą jest rodzina amerykańska PPND, której rodowód sięga XVIII wieku (Wszolek i wsp. 1992; Clark i wsp. 1998). Obejmuje ona 306 osób z ośmiu pokoleń, w tym 41 chorych (Reed i wsp. 2001; obserwacja własna wg Wszółka, 2003). Czterech chorych wśród 18 krewnych scharakteryzowano w rodzinie o bardzo podobnym obrazie klinicznym, pochodzącej z Japonii i nazwanej PNLD (ang. *pallido-nigro-Luysian degeneration*) (Yasuda i wsp. 1999). Z Japonii wywodzi się również inna rodzina, NCNP (ang. *National Center of Neurology and Psychiatry*) złożona z 16 osób, w której objawy wykazuje dwóch braci (Arima i wsp. 2000) oraz rodzina z pojedynczym przypadkiem zachorowania (Tokyo-1) (Tsuboi i wsp. 2002). Dwadzieścia osiem osób tworzy rodzinę francuską, w której opisano 3 chorych (Delisle i wsp. 1999). Dwie rodziny japońskie: PNLD i NCNP posiadają haplotyp wskazujący na pochodzenie od wspólnego przodka („efekt założyciela”; ang. *founder effect*). N279K jest trzecią, co do częstości występowania mutacją powodującą FTDP-17, po P301L (148 chorych) i +16 (78 chorych) (Wszolek i wsp. 2003b). Te trzy mutacje stanowią podłoże około 60% zachorowań (Ghetti i wsp. 2003). Kliniczna analiza nosicieli mutacji N279K wykazuje, iż prowadzi ona do bardzo podobnego wzorca

zaburzeń. Średni wiek zachorowania jest zbliżony we wszystkich rodzinach i zmienia się od 41 do 45 lat. Wyniszczenie organizmu prowadzi do śmierci w przeciągu 8 lat. Chorzy manifestują szybko narastający zespół parkinsonowski ze spowolnieniem ruchowym, sztywnością pozapiramidową, chwiejnością postawy i, czasami, drżeniem. Przejściową, pozytywną odpowiedź na lewodopę odnotowano tylko w kilku przypadkach i jedynie w początkowym stadium choroby. Chorzy ci demonstrują również typowe zmiany osobowości i zachowania, postępujące obniżenie zdolności poznawczych, zaburzenia pozapiramidowe oraz gałkoruchowe, w tym porażenie nadjądrowe, dysfagię, dystonię, dyzartrię i mutyzm. (Clark i wsp. 1998; Delisle i wsp. 1999; Yasuda i wsp. 1999; Arima i wsp. 2000; Reed i wsp. 2001; Tsuboi i wsp. 2002).

Hipotezę, dotyczącą istotności wskazanego szlaku polipurynowego, zdaje się potwierdzać, obok ciężkiego przebiegu klinicznego u chorych z rodziny PPND, również obserwacja następstw sąsiadującej mutacji - $\Delta 280K$ (Rizzu i wsp. 1999). Wypadnięcie trzech zasad purynowych (AAG) najprawdopodobniej niszczy motyw ESE, gdyż obniża formowanie mRNA zawierającego E10. Jest to jedna z trzech mutacji wzmagających powstawanie izoformy 3R. Sytuacja powodowana tą zmianą może być analogiczna do choroby Picka, gdzie patologiczne agregaty tau złożone są przede wszystkim z izoformy 3R tego białka (D'Souza i wsp. 1999). Nie sposób pominąć patogenego wpływu mutacji na komórkę, który wynika z olbrzymiego obniżenia zdolności tak zmienionego białka do promowania polimeryzacji mikrotubul. $\Delta 280K$ tau prezentuje mniej niż 1% aktywności szczepu dzikiego. Chory, u którego zmiana ta została zidentyfikowana, nie wykazuje historii rodzinnej w kierunku otępienia. Natomiast u ojca probanda rozpoznano chorobę Parkinsona (PD; ang. *Parkinson Disease*) (Rizzu i wsp. 1999). Pozostałe dwie zmiany, skutkujące nadekspresją izoformy 3R, lokalizują się w intronie 10 w rodzinach z kilkupokoleniową prezentacją choroby. Podstawienia +19 i +29 powodują

odpowiednio 15-18 i 2-3 krotne obniżenie składania eksonu 10. Uważa się, że podstawienie +19 niszczy potencjalny element modulatorowy splicing (cccatgcg). Mutacja +29 zasocjowana jest z jednoczesną nieobecnością najdłuższej izoformy tau (brak eksonu trzeciego) w rozpuszczalnej frakcji komórkowej, co skutkować może niestabilnością aksonów o większej średnicy (Stanford i wsp. 2003).

Z kolei mutacja L284L zwiększa częstość włączania eksonu 10 do pre-mRNA poprzez zniszczenie potencjalnego elementu wyciszającego splicing (przejście UUAG na UCAG). Sprawia ona, że 90% tau w komórce, to izoforma 4R. Zmianę tę zidentyfikowano u amerykańskiej rodziny LKL. Osobnicy obarczeni chorobą ujawniają klasyczne zaburzenia zachowania o typie czołowym oraz afazję. Pojedynczy przypadek dostępny autopsji wykazał zarówno tauopatię jak i niespotykane w innych rodzinach FTDP-17 odkładanie złogów β amyloidu w ilości spełniającej kryteria AD. Niewykluczone jest koincydentalne wystąpienie obu chorób, gdyż 88-letnia matka probandki cierpi na późną postać AD, natomiast mutacja *MAPT* wydaje się dziedziczyć w tej rodzinie po linii ojcowskiej (D'Souza i wsp. 1999).

Kodon N296 podlegać może trzem odmiennym mutacjom, o różnym stopniu ekspresji i o zróżnicowanych objawach klinicznych. Asparagina 296 leży wewnątrz wysoce konserwatywnego ewolucyjnie powtórzenia R2. We wszystkich tandemowo ułożonych domenach asparagina zajmuje tę samą pozycję, co sugeruje znaczącą jej funkcję w oddziaływaniu z mikrotubulami (Iseki i wsp. 2001; Yoshida i wsp. 2002). Milczącej mutacji N296N przypisuje się pięciokrotny wzrost częstości izoformy 4R (Yoshida i wsp. 2002). Mutacja N296H, powoduje nie tylko 2.5- krotny wzrost stężenia izoformy 4R, ale również obniżenie polimeryzacji mikrotubul i nukleację tau (Isek i wsp. 2001; Yoshida i wsp. 2002). Jest to druga, obok $\Delta 280K$ opisana zmiana wpływająca jednocześnie na procesowanie mRNA i właściwości białka (Grover i wsp. 2002). Delecja $\Delta 296N$

proceeds to marginal increase in the percentage of 4R isoform, whereas it strongly reduces polymerization of microtubules and significantly promotes formation of relatively short filaments (Pastor et al. 2001; Yoshida et al. 2002). Because substitutions in codon 296 change the ratio of tau isoforms, whereas deletion of the whole codon does not have a significant effect on splicing, it is possible that mutations N296N and N296H act rather through creation of a new strengthening sequence, than through destruction of a susceptible element of the E10 folding (Grover et al. 2002). Δ 296N is one of two mutations leading to dementia only in the homozygous state. Deletion in the heterozygous state may be rather a risk factor for development of classical Parkinson's disease (Pastor et al. 2001). The second type of mutation, S352L, is characterized by early age of onset (around 30 years of age), unusually rapid course (10 days to 40 months) and atypical clinical picture of acute respiratory failure (Nicholl et al. 2003). Mutations appearing only in the homozygous state were observed in individuals from close relatives.

1.4.2. Mutacje zmieniające właściwości białka tau

Mutations of the „change of sense” type, in the vicinity or within highly conserved domains of the repeat region (R), change the physicochemical properties of tau, disorganizing simultaneously many aspects of its function. The mutated protein acts weaker with tubulin, which leads to disturbance of microtubule stabilization and their polymerization. Mutations may simultaneously promote the tendency of tau to aggregation and formation of non-dissolvable filaments, either as a result of conformational changes of the protein, or by contributing to its abnormal phosphorylation.

1.4.2.1. Osłabienie oddziaływania tau z mikrotubulami

Mutacje wywierają negatywny wpływ przez redukcję zdolności tau do wiązania mikrotubul i obniżanie tempa ich polimeryzacji. Efekt ten jest większy dla izoformy 3R (Hasegawa i wsp. 1999). Ekspresja tak zmienionego białka w liniach komórkowych, skutkuje różnym stopniem osłabienia nukleacji mikrotubul oraz niestabilności i dezorganizacji morfologicznej tych struktur. Nawet jednak przy niewielkim obniżeniu właściwości funkcjonalnych tau, efekt kumulacji negatywnych skutków tego zjawiska w czasie, może powodować olbrzymie zmiany, biorąc pod uwagę długość życia człowieka (Lee i wsp. 2001). Mutacja P301L, dotycząca wyłącznie izoformy 4R, działa najsilniej wśród znanych mutacji skutkujących podstawieniem aminokwasu, obniżając zdolność polimeryzacji mikrotubul aż o 90%. R406W ma najniższy inhibitorowy wpływ na wydłużanie mikrotubul. Forma 3R o 40% obniża zdolność formowania mikrotubuli, podczas gdy 4R zaledwie o 20% (Hasegawa i wsp. 1998). Mutacja Q336R, jest jedyną opisaną zmianą powodującą zwiększenie zdolności tau do promowania polimeryzacji mikrotubul. W tym przypadku zbyt silne wiązanie prowadzić może do redukcji dynamiki mikrotubul i utraty przez neuron zdolności odpowiedzi na stres (Pickering-Brown i wsp. 2004).

1.4.2.2. Wzrost tendencji tau do autonukleacji

Z działaniem hamującym polimeryzację mikrotubul związany jest stymulujący wpływ na tworzenie filamentów (Goedert i wsp. 1999). Każda mutacja indywidualnie oddziałuje na kinetykę autopolimeryzacji tau *in vitro*, a właściwości biochemiczne zmutowanego białka są interesujące w świetle badań klinicznych. Mutacja R406W, której wpływ na agregację sprowadza się do początkowego jej spowolnienia a następnie akceleracji, wiąże się z fenotypem późniejszego otępienia (55 lat), długiego czasu trwania choroby (26 lat) i relatywnie łagodnym przebiegiem klinicznym. Znacząco później rozwija

się mutyzm akinetyczny. Przyczyną powolnego narastania objawów klinicznych może być utrata dodatnio naładowanej reszty argininy z C-terminalnego regionu białka. W efekcie osłabiona zostaje interakcja między tau a anionowymi induktorami polimeryzacji, co zwalnia szybkość tego procesu (Nacharaju i wsp. 1999).

Przeciwnie, mutacja P301L warunkuje początkową intensywną dynamikę autopolimeryzacji, w związku z tym u wielu chorych objawy rozwijają się w relatywnie wczesnym wieku (40-50 lat). P301L jest najczęściej identyfikowaną mutacją, opisaną u co najmniej dziewiętnastu rodzin na całym świecie. Nosiciele wykazują znaczną heterogenność objawów klinicznych i neuropatologicznych (Clark i wsp. 1998; Dumanchin i wsp. 1998; Hutton i wsp. 1998; Mirra i wsp. 1999; Nasreddine i wsp. 1999; Kodama i wsp. 2000; Rizzu i wsp. 2000). Mutacja manifestuje się przez zaburzenia zachowania, szczególnie odhamowanie, utratę funkcji wykonawczych i zaburzenia mowy (Heuting i wsp. 1997; Bird i wsp. 1999). Jedną z rodzin amerykańskich cechuje wcześnie pojawiające się pogorszenie pamięci. Parkinsonizm nie jest zasadniczym zespołem, chociaż w pewnym odsetku przypadków dołącza się w późniejszych fazach choroby (Bird i wsp. 1999; Mirra i wsp. 1999; Nasreddine i wsp. 1999). Patogeny efekt tego podstawienia może wiązać się z jego lokalizacją w obrębie konserwatywnego motywu PGGG, obecnego we wszystkich czterech powtórzeniach oddziałujących z mikrotubulami (Nacharaju i wsp. 1999). Mutacje P301L i G272V zmieniają ten sam motyw w R2 i R1 odpowiednio na LGGG i na PGVG. G272V odnaleziono w dużej rodzinie holenderskiej HFTD2 (ang. *hereditary frontotemporal dementia 2*), charakteryzowanej już od 1930 roku (Hutton i wsp. 1998). Obecnie opisano 34 chorych w siedmiu pokoleniach. Prezentują oni klasyczne cechy zaniku płatów czołowo-skroniowych (Reed i wsp. 2001).

Nietypowy obraz dynamiki nukleacji prezentuje V337M tau. Mutant wykazuje dużą zdolność tworzenia filamentów tylko na inicjalnym etapie polimeryzacji, po czym

osiąga *plateau*. Wydaje się, że tak zmieniona forma białka przyspiesza jedynie nukleację, ale ma niewielki wpływ na dalsze fazy polimeryzacji (Nacharaju i wsp. 1999). Zmianę V337M opisano w rodzinie amerykańskiej, u której obok cech zespołu czołowego wystąpiły objawy psychozy podobnej do schizofrenii (Bird i wsp. 1997).

Niemal wszystkie znane mutacje genu *MAPT* prowadzą do tworzenia się filamentów złożonych z hiperfosforylowanego białka tau, przy czym istnieją odmienne mechanizmy ich formowania. Znaczny wzrost stosunku stężenia izoform 4R/3R we frakcji rozpuszczalnej obserwuje się dla mutacji N279K, na skutek zmiany w proporcjach wytwarzanego mRNA. W przypadku P301L obserwuje się 25% spadek tej proporcji we frakcji rozpuszczalnej z powodu selektywnej inkorporacji formy 4R w nierozpuszczalne filamety (Hong i wsp. 1998; Rizzu i wsp. 2000). Wydaje się istnieć bezpośrednia zależność między lokalizacją mutacji, a morfologicznym i biochemicznym charakterem powstających inkluzji. W przypadku mutacji zlokalizowanych w konstytutywnie włączanych eksonach, w powstawanie włókien zaangażowane są wszystkie izoformy białka tau. Niektóre mutacje (V337M i R406W) prowadzą do tworzenia się filamentów nieodróżnialnych od tych charakterystycznych dla AD. Badania mikroskopowo-elektronowe wykazują obecność agregatów o morfologii zbliżonej zarówno do PHF jak i struktur prostych (SF; ang. *straight filament*) (Spillantini i wsp. 1996; Hong i wsp. 1998, Van Swieten i wsp. 1999). Inne mutacje (K257T, L266V G272V, S320F, E342V i G389R) wywołują zmiany przypominające chorobę Picka (Spillantini i wsp. 1998c; Hasegawa i wsp. 1998; Murrell i wsp. 1999; Lipka i wsp. 2000; Rizzini i wsp. 2000). Mutacje wpływające na splicing eksonu 10 obejmują tylko izoformy tau z czterema powtórzeniami. We frakcji nierozpuszczalnej neuronów, ale również w komórkach glejowych, odkłada się wyłącznie izoforma 4R. Ultrastrukturalnie włókna mają morfologię skręconej wstążki (ang. *twisted ribbon*) i przypominają agregaty

charakterystyczne dla CBD i PSP (Hong i wsp. 1998; Reed i wsp. 1998; Spillantini i wsp. 1998b,c; Hulette i wsp. 1999; Mirra i wsp. 1999; Goedert i wsp. 1999; Yasuda i wsp. 2000).

Uwagę zwraca nieobecność nierozpuszczalnych agregatów białka tau u nosicieli mutacji +19 i +29, chociaż wzorzec obserwowanej neurodegeneracji jest typowy dla FTD. Badacze sugerują, że wzrost frakcji rozpuszczalnej 3R tau, który zasocjowany jest z tymi zmianami, może prowadzić do śmierci komórki po przez indukcję apoptozy, a nie akumulację patologicznego białka (Stanford i wsp. 2003). Tym bardziej, że tau stanowi substrat dla kaspazy-3 i kalpajny (Canu i wsp. 1998; Fasulo i wsp. 2000). Mutanty tau wykazują różny stopień podatności na degradację przez te proteazy apoptotyczne. Z tego wynika, że w patogenezę niektórych postaci FTDP-17 zaangażowana może być akumulacja tau wynikająca z obniżenia degradacji proteolitycznej (Yen i wsp. 1999). Jednocześnie indukcja procesu apoptozy tłumaczyć może przyczyny FTD bez różnicującej histopatologii (Stanford i wsp. 2003).

1.4.2.3. Zaburzenia fosforylacji tau

Inna mutacja kodonu 301, P301S, opisana została w dwóch niewielkich rodzinach o bardzo różnorodnym spektrum objawów klinicznych i ciężkim przebiegu. P301S prowadzi do 80% redukcji zdolności polimeryzacji mikrotubul. Jest to efekt słabszy niż w przypadku mutacji P301L. Tym trudniej zrozumieć znacznie wcześniejszy wiek wystąpienia objawów u nosicieli P301S w stosunku do innych mutacji (27 lat) oraz heterogeny obraz neuropatologiczny. Możliwe, że podstawienie wysoce konserwatywnej reszty prolinowej seryną generuje nowe, potencjalne miejsce fosforylacji. Prawdopodobne jest, że fosforylacja dodatkowej reszty serynowej w drugim motywie powtórzonym (R2) skutkuje znacznym obniżeniem zdolności wiązania tau do mikrotubul. Zjawisko to może nie być zauważalne w doświadczeniach *in vitro* (Bugiani i wsp. 1999; Sperfeld i wsp.

1999). Na podobnej zasadzie obecność mutacji K257T prowadzi do zakłócenia oddziaływania tau z tubulinami (Rizzini i wsp. 2000). Mutacja ta generuje dodatkowe miejsce fosforylacji, redukując zdolność polimeryzacji mikrotubul o 70% (Pickering-Brown i wsp. 2000a). Do patologii prowadzić może nie tylko hiperfosforylacja, ale również sama zmiana wzorca ufosforylowania. Mutacja S320F prowadzi do 90% spadku zdolności promowania polimeryzacji tubulin, na skutek likwidacji potencjalnego miejsca akceptorowego dla grupy fosforanowej. Reszta serynowa zlokalizowana w obrębie trzeciego powtórzenia jest wysoce konserwatywna i znajduje się we wszystkich białkach pełniących podobną funkcję. Sugeruje się, że fosforylacja w tej pozycji hamuje tworzenie filamentów (Rosso i wsp. 2002a).

1.4.2.4. Zmiany konformacyjne tau

Mutacje genu *MAPT* mogą powodować rozwój choroby przez przyczynianie się do promowania autonukleacji tau. Białko ma wyjątkowo silny charakter hydrofilowy z dużą zawartością aminokwasów polarnych, co sprawia, że w roztworze pozostaje w formie nieustrukturyzowanej. W wyniku zmian konformacyjnych, polegających na wzroście odsetka struktur typu arkusza- β , powstają helikalne filamenty przypominające PHF w AD. Białka tworzą agregaty dzięki ułożeniu struktur β prostopadle do osi powstającego włókna (ang. *cross- β -sheet structure*). Rdzeń filamentów stanowią domeny powtórzone, które w prawidłowym białku odpowiadają za oddziaływanie tau z mikrotubulami. Najmniejszym motywem wykazującym potencjał formowania struktury arkusza- β jest heksapeptyd PHF6: 306 VQIVYK $_{311}$, kodowany przez ekson 11 i ulokowany w drugiej interdomenie (IR2). W izoformie 4R między pierwszą a drugą domeną powtórzoną istnieje dodatkowy motyw PHF6*: 275 VQIINK $_{280}$, sprzyjający nabyciu lokalnej struktury β , kodowany przez ekson 10. W przypadku mutacji prowadzących do nadreprezentacji izoformy 4R, istnienie dwóch krytycznych punktów inicjowania zmian konformacyjnych w jednej cząsteczce, może

znacznie wzmacniać zdolność formowania PHF (Von Bergen i wsp. 2000; Von Bergen i wsp. 2001). Elementy leżące poza heksapeptydowymi motywami są niezbędne do kształtowania struktury filamentów (Von Bergen i wsp. 2001). Kilka spośród znanych mutacji dotyczy bliskiego sąsiedztwa motywu PHF6: P301L, P301S, S305N, L315R, S320F i V337M, inne wpływają na motyw PHF6*: G272V, N279K, Δ280K (Von Bergen i wsp. 2000). Dwie z nich: P301L i Δ280K znacznie zwiększają tendencję tau do agregacji. Delecja Δ280K prowadzi do zmiany sekwencji obejmującej motyw PHF6* z ${}_{273}\text{GKVQIINKKLDL}_{284}$ na ${}_{273}\text{GKVQIINK-LDL}_{284}$. Wskutek utraty dodatnio naładowanej lizyny 280 i kompensacji ładunku lizyny 281 przez bliskość ujemnie naładowanej reszty asparaginowej (N283), obniża się polarność cząsteczki i zwiększa jej hydrofobowość, wzmagająca zdolność Δ280K tau do autonukleacji (Von Bergen i wsp. 2001).

1.5. Podstawowe korelacje fenotypowo-genotypowe i różnicowanie

FTDP-17 powinien być wzięty pod uwagę w każdym przypadku cechującym się objawami otępienia, sztywności pozapiramidowej, zaburzeń osobowości i zachowania, a także innymi objawami klinicznymi z równoczesnym dodatnim wywiadem rodzinnym wskazującym na dziedziczenie autosomalne dominujące. Czynnikiem utrudniającym różnicowanie jest istnienie bardzo szerokiego spektrum objawów klinicznych między rodzinami obciążonymi tą samą mutacją, a nawet wśród członków tej samej rodziny. Znamienny jest tutaj opis dwóch braci, nosicieli mutacji P301L, z których jeden prezentował zanik płata czołowego, drugi zaś objawy typowe dla PSP (Bird i wsp. 1999). Mutacja P301S doprowadziła do rozwoju u ojca i syna szybko postępującej jednostki chorobowej. Przy czym, u ojca, do typowego obrazu FTDP-17 dołączyły się cechy psychozy schizofreno-podobnej. U syna, klinicznie rozpoznano CBD (Bugiani i wsp. 1999). Różnorodność fenotypowa zaznacza się niezwykle wyraźnie w rodzinie z mutacją S305S. Chory z otępieniem przedstarczym początkowo został zdiagnozowany jako AD,

w czasie progresji choroby rozwinął cechy typowe dla FTD. Jego siostra w inicjalnym stadium prezentowała obraz zaburzeń zbliżony do CBD, ostateczna diagnoza PSP została potwierdzona nie tylko klinicznie, ale również w badaniu histopatologicznym (Stanford i wsp. 2000). Według danych literaturowych mutacje *MAPT* identyfikowane były u pacjentów z rozpoznaniem AD, FTD, PiD, CBD, PSP, DLB i zaniku wieloukładowego (MSA; ang. *multiple system atrophy*). Ze względu jednak na osiowe objawy chorobowe, które prezentują rodziny FTDP-17 wyróżniono dwa zasadnicze fenotypy:

- Z dominującym obrazem otępiennym połączonym z zaburzeniami osobowości i zachowania. Ten obraz wiąże się z nosicielstwem mutacji eksonowych, nie powodujących zaburzeń splicingu. W diagnostyce różnicowej należy uwzględnić sporadyczny zespół otępienia czołowo-skroniowego, pierwotną postępującą afazję, otępienie semantyczne, otępienie towarzyszące chorobie neuronu ruchowego i inne rzadkie postaci otępienia (np. chorobę Gerstmann-Sträusslera-Scheinkera). Niektóre przypadki FTDP-17, w zależności od przebiegu i zaawansowania choroby, mogą także przypominać typową chorobę Alzheimera.

- Z przeważającymi objawami parkinsonowskimi. Ten obraz obserwowany jest u nosicieli mutacji intronowych i eksonowych, prowadzących do nadreprezentacji izoformy 4R tau. Diagnostyka różnicowa powinna dotyczyć: choroby Parkinsona, postępującego porażenia nadjądrowego i zwyrodnienia korowo-podstawnego (Reed i wsp. 2001; Ghetti i wsp. 2003; Wszolek i wsp. 2003a,b).

1.6. Potencjalne czynniki modyfikujące wpływ mutacji

MAPT jest jedynym dotychczas znanym genem, którego mutacje są przyczyną rozwinięcia otępienia czołowo-skroniowego u ich nosicieli. Niewątpliwy jest jednak modyfikujący wpływ innych czynników genetycznych, czego dowodzi niezwykle zróżnicowany obraz kliniczny pacjentów FTDP-17. W rozważaniu tego zagadnienia

nie sposób pominąć polimorfizmu genu sprawczego. Jako pierwszy opisano polimorfizm powtórzeń dwunukleotydowych (TG) w intronie 9 *MAPT* (Conrad i wsp. 1997). W powiązaniu z dziewięcioma innymi jeszcze polimorfizmami wyznaczono dwa haplotypy *MAPT*: H1 i H2, obejmujące cały gen. Na haplocyplu H1 dziedziczą się allele: a0 (11 powtórzeń TG), a1 (12 powtórzeń) i a2 (13 powtórzeń), podczas gdy a3 (14 powtórzeń) i a4 (15 powtórzeń) są składową haplocyplu H2. Z H2 związana jest też delecja 238 bp w intronie 9 (Baker i wsp. 1999). Udział haplocyplu *MAPT* rozważany jest we wszystkich tauopatiach.

Wewnątrz intronu 9 genu *MAPT* scharakteryzowano niewielki gen pozbawiony intronów, *saitohinę* (*STH*). Koduje on 128-aminokwasowe białko o nieznaney funkcji, istniejące w dwóch polimorficznych wariantach. Podstawienie nukleotydowe pociąga za sobą zmianę aminokwasu w pozycji 7 białka (Q7R). Pierwsze doniesienie wykazywało nadreprezentację polimorfizmu R w postaci homozygotycznej u pacjentów z chorobą Alzheimera i w sposób oczywisty sugerowało zaangażowanie *STH* w etiopatogenezę innych schorzeń neurozwyrodnieniowych (Conrad i wsp. 2002).

Apolipoproteina E (*APOE*) zaangażowana jest w transport i redystrybucję lipidów, działa jako kofaktor enzymów biorących udział w ich metabolizmie oraz stabilizuje cząsteczki lipoprotein. Dlatego początkowo zainteresowanie skupiało się na udziale białka w patogenezie chorób naczyniowych (Weisgraber 1994). Gen dla białka zlokalizowany jest na chromosomie 19q13.2. Zmiany nukleotydowe skutkujące podstawieniem argininy i cysteiny w pozycjach 112 i 158, prowadzą do wyróżnienia trzech form polimorficznych *APOE*: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. Obecnie polimorfizm *APOE* jest jedynym ustalonym czynnikiem ryzyka choroby Alzheimera o późnym początku. Jego udział rozważany jest w szeregu innych chorób neurodegeneracyjnych.

2. CEL PRACY

Celem pracy były:

1. Identyfikacja potencjalnych zmian w części kodującej oraz bliskich sekwencjach intronowych genu *MAPT* w grupie chorych z otępieniemczołowo-skroniowym w populacji polskiej.
2. Korelacja zidentyfikowanych zmian z prezentowanym fenotypem klinicznym.
3. Ocena znaczenia polimorfizmu genów: apolipoproteiny E i saitohiny, jako potencjalnych, genetycznych czynników ryzyka.
4. Szacunkowa ocena przydatności analizy genu *MAPT* i innych genetycznych czynników modulujących w diagnostyce klinicznej oraz poradnictwie genetycznym.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka badanej grupy

Badaniem objęto 48 osób z klinicznie zdiagnozowanym otępieniem czołowo-skroniowym. Są to pacjenci znajdujący się głównie pod opieką Poradni Alzheimerowskiej Zakładu Badawczo-Leczniczego Chorób Zwyrodnieniowych CUN, IMDiK PAN/MSWiA. Dziesięcioro pacjentów zdiagnozowanych zostało w Instytucie Psychiatrii i Neurologii, jeden pacjent w Klinice Neurologii Akademii Medycznej w Warszawie. Rozpoznanie choroby zgodne jest z kryteriami Lund-Manchester (Lund and Manchester Groups 1994; Neary i wsp. 1998). U pacjentów przeprowadzone zostało badanie neurologiczne, neuropsychologiczne, psychiatryczne oraz neuroobrazowanie i badania dodatkowe. Grupa chorych składa się z 20 kobiet i 28 mężczyzn. Średni wiek zachorowania wynosi 56.2 ± 12.5 lat, a przeciętny czas trwania choroby 7 ± 4.3 lat.

Grupa kontrolna liczy 100 osób. W jej skład wchodzi słuchacze Uniwersytetu Trzeciego Wieku oraz pacjenci klinik internistycznych i chirurgicznych. U osób tych nie stwierdzono odchyłeń od normy w badaniu neurologicznym, a wynik badania w skali MMSE (ang. *Mini Mental State Examination*) wynosił ≥ 27 pkt. Do analizy porównawczej posłużono się grupą kontrolną, w której średnia wieku wynosi 71.2 ± 6 lat. Posłużenie się grupą kontrolną, w której średnia wieku jest wyższa w porównaniu z chorymi, miało na celu zminimalizowanie szansy włączenia przypadków FTD o późnym początku.

3.2. Izolacja DNA z krwi obwodowej

Genomowy DNA do badań uzyskano z leukocytów krwi obwodowej. Standardowo pobierano 10 ml pełnej krwi obwodowej na 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH=8.0). Izolację DNA przeprowadzano wykorzystując technikę wysalania nasyconym roztworem chlorku sodu (6 M NaCl) wg metody Millera (Miller i wsp. 1988). DNA zawieszano w 96% alkoholu

etylowym, a następnie w buforze TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA (pH=8)). DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.3. Przeszukiwanie sekwencji kodujących genu *MAPT*

3.3.1. Amplifikacja kodujących odcinków DNA

Amplifikacje DNA przeprowadzano metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR; ang. *polymerase chain reaction*), przy użyciu termocyklera Biometra UNO II. Specyficzne startery (M. Cruys, Uniwersytet w Antwerpii, informacja ustna) zostały wykonane przez Sigma-ARK GmgH. Warunki amplifikacji ustalane były doświadczalnie. Eksony amplifikowano wraz z bliskimi sekwencjami intronowymi (nie mniejszymi niż 200 bp). Produkty reakcji PCR wizualizowano w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydydy, celem kontroli przeprowadzonej reakcji.

3.3.1.1. Amplifikacja eksonów: E1, E2, E3, E4, E6, E7, E10, E11, E12

Amplifikacja DNA techniką PCR przy użyciu odpowiednich starterów:

E1F: 5'-CCC CCA ACA CTC CTC AGA ACT TAT C-3'

E1R: 5'-CAC CGTGTC TGG CCA TTA TCT CA-3'

E2F: 5'-CAC AGG GAG CGA TTT TCA GC-3'

E2R: 5'-CCA CGC TGT CCT GCA AAG C-3'

E3F: 5'-GGG CTG CTT TCT GGC ATA TG-3'

E3R: 5'-CCT CAC TTC TGT CAC AGG TC-3'

E4F: 5'-GGT GCT GTG CCT TTT GTT TAG TGA-3'

E4R: 5'-ATG CCT TAG GAA TTA CCC AGA A-3'

E6F: 5'-TTC AAC CAT TAC CTG CCT TAT TTA-3'

E6R: 5'-CTA TTT TAC ACG GTG CTT CTA TGC-3'

E7F: 5'-GTG GGG CTG GTG TTG ACT CTT G -3'

E7R: 5'-CAG CTG CCA GGG GTT ATT CAT TCT-3'

E10F: 5'-GCA GCC CTC TAT CCC TTC AGC-3'

E10R: 5'-GTA CGC ACT CAC ACC ACT TCC TAA-3'

E11F: 5'-AGG GCC TGG GCT TAC ACA-3'

E11R: 5'-TGC CTG CCT TAT TTC ACT TCA CT-3'

E12F: 5'-TGG CCC TGG TTC AAG TCC T-3'

E12R: 5'-GCC CAC ATC CAG CCA GTC AAC-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM Tris-HCl, pH=8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 μM każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP; 1,5 U Taq Polimerase (Qiagen); 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 μl wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 3 min
2. Powielanie fragmentu DNA (37 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94°C przez 45 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 58°C przez 30 s
 - 2c. Synteza w temp. 72°C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72°C przez 7 min

3.3.1.2. Amplifikacja eksonu 4A

Ze względu na duży rozmiar ampifikowanego odcinka reakcja PCR prowadzona była niezależnie dla dwóch zachodzących na siebie fragmentów, przy użyciu starterów:

E4A1F: 5'-GCG GGG ACT GGG CCG AGA A-3'

E4A1R: 5'-CCT TTG GCC CGC CCT ACA CTG G-3'

E4A2F: 5'-GAA GGG GGC AGG GGG CAA AGA G-3'

E4A2R: 5'-GTC GGG AGG CCT GGA AGC TCA GTG-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM Tris-HCl, pH=8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 μM każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP; 1,5 U Taq Polimerase (Qiagen); 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 μl wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 3 min
2. Powielanie fragmentu DNA (35 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 95°C przez 30 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 65°C przez 20 s
 - 2c. Synteza w temp. 72°C przez 40 s
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72°C przez 7 min

3.3.1.3. Amplifikacja eksonu 9

Amplifikacja DNA techniką PCR przy użyciu starterów:

E9F: 5'-GAG CGG GTA TTG GAT GGT GGT TGA-3'

E9R: 5'-AGA GGG GAC TGG GGT GTT ATG-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM Tris-HCl, pH=8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 μM każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP; 1,5 U Taq Polimerase (Qiagen); 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 μl wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 3 min
2. Powielanie fragmentu DNA (36 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94°C przez 45 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 59°C przez 30 s
 - 2c. Synteza w temp. 72°C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72°C przez 7 min

3.3.1.4. Amplifikacja eksonu 13

Amplifikacja DNA techniką PCR przy użyciu starterów:

E13F: 5'-AGT TGG CAG GGC TGG TCT TTC-3'

E13R: 5'-GGG GGC CGG GTC ATT ATT C-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM Tris-HCl, pH=8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 μM każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP; 1,5 U Taq Polimerase (Qiagen); 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 μl wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 3 min
2. Powielanie fragmentu DNA (37 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94°C przez 45 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 54°C przez 30 s
 - 2c. Synteza w temp. 72°C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72°C przez 7 min

3.3.1.5. Amplifikacja eksonów 5 i 8

Amplifikacja DNA techniką PCR przy użyciu starterów:

E5F: 5'-TCC ACC AGA CCC AAC TAA ACA AAC-3'

E5R: 5'-AAA AGC CTG CCC CAA AAT ACA AAG-3'

E8F: 5'-GCC CTG TTT AAG CCT GAT GAT A-3'

E8R: 5'-TCC TCC CGG CTC TAG AAA CAC AAG-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM Tris-HCl, pH=8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,4 μM każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP; 1,5 U Hot Start Taq Polimerase (Qiagen); 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 25 μ l wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 95°C przez 10 min
2. Powielanie fragmentu DNA (1 cykl)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94°C przez 40 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 54°C przez 55 s
 - 2c. Synteza w temp. 72°C przez 30 s
3. Powielanie fragmentu DNA (6 cykli)
 - 3a. Denaturacja w temp. 94°C przez 40 s
 - 3b. Przyłączanie starterów w temp. 55°C przez 55 s
 - 3c. Synteza w temp. 72°C przez 30 s
4. Powielanie fragmentu DNA (11 cykli)
 - 4a. Denaturacja w temp. 94°C przez 40 s
 - 4b. Przyłączanie starterów w temp. 58°C przez 40 s
 - 4c. Synteza w temp. 72°C przez 30 s
5. Powielanie fragmentu DNA (24 cykle)
 - 5a. Denaturacja w temp. 94°C przez 40 s
 - 5b. Przyłączanie starterów w temp. 59°C przez 40 s
 - 5c. Synteza w temp. 72°C przez 30 s
6. Synteza uzupełniająca w temp. 72°C przez 7 min

3.3.2. Oczyszczanie produktów amplifikacji

Do oczyszczania produktów PCR z niezwiązanych starterów, nukleotydów oraz zanieczyszczeń wynikłych z prowadzenia reakcji, takich jak sole, enzymy, detergenty, agarozę, bromek etydyny użyto zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), zgodnie z zaleceniami producenta. Zestaw wykorzystuje zdolność adsorpcji DNA przez membranę

silikonową w wysokim stężeniu soli i $\text{pH} \leq 7,5$ (wydajność: 95%). Oczyszczone DNA wymywane było 14 μl wody dejonizowanej.

W przypadku eksonów 5 i 8, dla których nie uzyskano czystego produktu amplifikacji zastosowano technikę ekstrakcji i oczyszczania DNA z żelu agarozowego, przy użyciu zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), stosownie do załączonego protokołu.

3.3.3. Bezpośrednie, cykliczne sekwencjonowanie fluorescencyjne

Eksony amplifikowano przy użyciu zestawu BIG Dye Terminator version 1.1 kit (Applied Biosystems) obejmującego polimerazę AmpliTaq FS oraz terminatory dideoksynukleotydowe znakowane na końcach 3' barwnikami wykazującymi fluorescencję o różnej długości fali. Zastosowano stężenia reagentów ustalone przez producenta. Do pojedynczej reakcji amplifikacji użyto ok. 10 ng produktu PCR i 5 pmoli startera sensownego (F). Dla potwierdzenia zmian sekwencji amplifikację powtarzano używając startera antysensownego (R). Reakcja prowadzona była z wykorzystaniem termocyklera Biometra UNO II, w objętości 20 μl , wg następującego schematu,

dla eksonów E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E10, E11, E12:

Powielanie znakowanego fragmentu DNA (25 cykli):

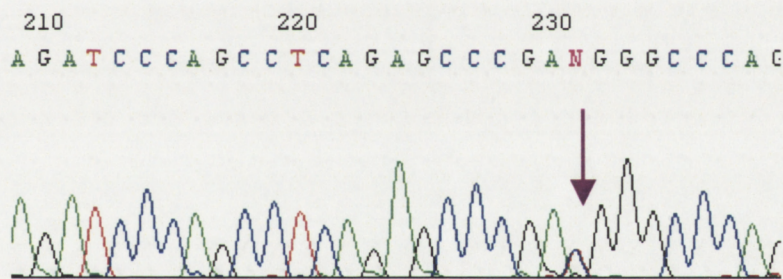
1. Denaturacja w temp. 96°C przez 20 s
- 2 Przyłączanie starterów w temp. 57°C przez 10 s
3. Synteza w temp. 60°C przez 4 min

W przypadku pozostałych eksonów zmianie uległa jedynie temperatura przyłączania starterów:

Dla E13 wynosiła 56°C

Dla E4A i E9 wynosiła 58°C

Wyznakowane sekwencje DNA oczyszczano z niezwiązanych znaczników fluorescencyjnych na kolumnach DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen). Eluat liofilizowano w wirówce próżniowej. Oczyszczone DNA zawieszano w buforze formamidowym, w warunkach denaturujących. Do sekwencjonowania używano automatycznego analizatora genetycznego ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Fluorescencja emitowana przez znaczniki wzbudzone światłem lasera argonowo-jonowego była analizowana przez oprogramowanie Sequencing Analysis (Applied Biosystems), określające kolejność zasad (Rycina 3). Odczytane sekwencje nukleotydowe porównywane były z sekwencjami zawartymi w bazie GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



Rycina 3. Przykładowy obraz otrzymany z automatycznego analizatora genetycznego. Poszczególnym nukleotydom przypisane są odpowiednie kolory: adenina – zielony, tymina – czerwony, guanina – czarny, cytozyna – niebieski. Na wydruku widoczne jest podstawienie cytozyny tyminą w postaci heterozygotycznej (zmiana: E4A n+482 C/T u pacjenta R.M.)

3.4. Analiza genotypów

Oznaczenie genotypów prowadzono stosując technikę zmienności długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP; ang. *restriction fragments length polymorphism*). W tym celu przeprowadzano amplifikacje DNA metodą PCR, przy użyciu termocyklera Biometra UNO II. Następnie produkty reakcji PCR trawiono odpowiednim enzymem restrykcyjnym. Do rozdziału produktów trawienia stosowano technikę elektroforezy w żelu

agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Specyficzne startery zostały wykonane przez TIB MOL BIOL w Poznaniu.

3.4.1. Oznaczanie genotypu *apolipoproteiny E*

Amplifikacja DNA techniką PCR przy użyciu starterów:

F: 5'-TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA-3'

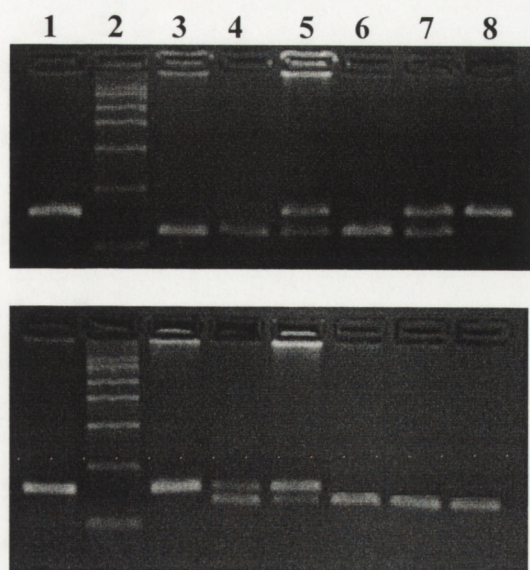
R: 5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 10 mM Tris-HCl, pH=8.3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 1,5 μl DMSO (dimetylosulfotlenek); 0,5 μM każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP (Perkin Elmer); 1,5 U Taq Polimerase (Sigma); 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 30 μl wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (30 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94°C przez 30 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 65°C przez 30 s
 - 2c. Synteza w temp. 70°C przez 1 min
3. Synteza uzupełniająca w temp. 70°C przez 10 min

Produkty PCR trawiono następnie dwoma enzymami restrykcyjnymi Afl III i Hae II (New England Biolabs) w dwóch oddzielnych mieszaninach reakcyjnych (Chapman i wsp. 1996) przez co najmniej 4h w temperaturze 37°C. Do rozdziału produktów obu reakcji trawienia użyto 3% żelu agarozowego barwionego bromkiem etydyny. Jednoczesna analiza wyniku trawienia dwoma enzymami pozwala na identyfikację genotypu (Rycina 4).



Rycina 4. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji fragmentu genu *apolipoproteiny E* trawionego enzymami restrykcyjnymi Afl III i Hae II.

Po trawieniu enzymem Afl III powstają fragmenty o długości: $\epsilon 2$: 50 bp i 177 bp; $\epsilon 3$: 50 bp i 177 bp; $\epsilon 4$: 227 bp. Po trawieniu enzymem Hae II fragmenty restrykcyjne mają długość: $\epsilon 2$: 227 bp; $\epsilon 3$: 32 bp i 195 bp; $\epsilon 4$: 32 bp i 195 bp. Ścieżka 1 - produkt PCR (227 bp); ścieżka 2 - marker wielkości (Sigma, wielkości produktów: 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 3 – genotyp $\epsilon 2/2$; ścieżka 4 - genotyp $\epsilon 2/3$; ścieżka 5 - genotyp $\epsilon 2/4$; ścieżka 6 - genotyp $\epsilon 3/3$; ścieżka 7 - genotyp $\epsilon 3/4$; ścieżka 8 - genotyp $\epsilon 4/4$.

3.4.2. Oznaczanie genotypu *Saitohiny*

Amplifikacja DNA techniką „touchdown PCR” przy użyciu starterów:

F: 5'-CCC TGT AAA CTC TGA CCA CAC-3'

R: 5'-ACA GGG AAG CTA CTT CCC ATG-3' (Conrad i wsp. 2002)

Skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM Tris-HCl, pH=8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂;

0,5 μ M każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP; 1,5 U Taq Polimerase (Qiagen);

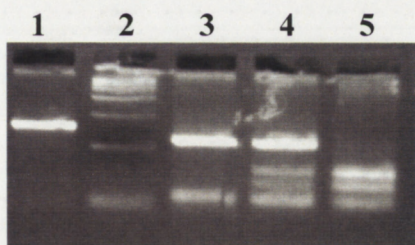
100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 25 μ l wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (25 cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94°C przez 30 s

- 2b. Przyłączanie starterów w temp. 65°C przez 30 s (w każdym kolejnym cyklu temperatura była obniżana o $-\Delta 0,2^{\circ}\text{C}$)
- 2c. Synteza w temp. 72°C przez 30 s
3. Powielanie fragmentu DNA (10 cykli)
- 3a. Denaturacja w temp. 94°C przez 30 s
- 3b. Przyłączanie starterów w temp. 60°C przez 30 s
- 3c. Synteza w temp. 72°C przez 30 s
4. Synteza uzupełniająca w temp. 72°C przez 7 min

Produkty PCR trawiono następnie enzymem restrykcyjnym Hinf I (Fermentas), przez co najmniej 4h w temperaturze 37°C. Do rozdziału produktów reakcji trawienia użyto 4% żelu agarozowego barwionego bromkiem etydyny (Rycina 5).



Rycina 5. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji fragmentu genu *saitohiny* trawionego enzymem restrykcyjnym Hinf I.

Produkt PCR ma długość 226 bp. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym Hinf I powstają fragmenty o długości: allel Q: 55 bp i 171 bp; allel R: 55 bp, 74 bp, 97 bp. Ścieżka 1 - produkt PCR; ścieżka 2 - marker wielkości (Sigma, wielkości produktów: 50, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 3 - genotyp Q/Q; ścieżka 4 - genotyp Q/R; ścieżka 5 - genotyp R/R.

3.4.3. Określanie haplotypu genu *MAPT*

Określenie haplotypu oparte jest na analizie obecności 238 bp delecji w intronie 9, będącej częścią haplotypu H2 *MAPT* (de Silva i wsp. 2002).

Amplifikacja DNA techniką PCR przy użyciu starterów:

F: 5'-GGA AGA CGT TCT CAC TGA TCT G-3'

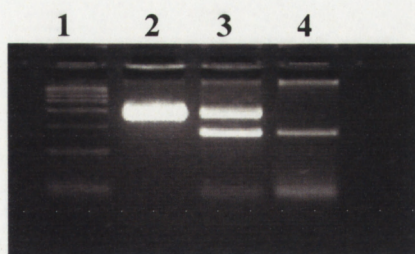
R: 5'-AGG AGT CTG GCT TCA GTC TCT C-3'

Skład mieszaniny reakcyjnej: 20 mM Tris-HCl, pH=8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 μM każdego startera; 0,2 mM każdego dNTP; 1,5 U Taq Polimerase (Qiagen); 100 ng genomowego DNA.

Reakcję PCR prowadzono w objętości 25 μl wg następującego schematu:

1. Denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 5 min
2. Powielanie fragmentu DNA (37cykli)
 - 2a. Denaturacja w temp. 94°C przez 40 s
 - 2b. Przyłączanie starterów w temp. 55°C przez 30 s
 - 2c. Synteza w temp. 72°C przez 40 s
3. Synteza uzupełniająca w temp. 72°C przez 7 min

Produkty reakcji PCR wizualizowano w 3% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (Rycina 6).



Rycina 6. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji fragmentu genu *MAPT*, wizualizujący obecność 238 bp delecji w H2. ścieżka 1 - marker wielkości (Sigma, wielkości produktów: 50, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 i 2000 bp); ścieżka 2 – genotyp H1/H1; ścieżka 3 – genotyp H1/H2; ścieżka 4 – genotyp H2/H2.

3.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną rozkładu częstości poszczególnych alleli i genotypów w grupie osób z otępieniem czołowo-skroniowym i w grupie kontrolnej przeprowadzono przy użyciu testu χ^2 . Za poziom istotności przyjęto $p \leq 0.05$. Do obliczeń statystycznych zastosowano program STATISTICA 6.0.

4. WYNIKI

W czasie 3 lat realizacji projektu uzyskano grupę badaną złożoną z 30 osób wykazujących pozytywną historię rodzinną w kierunku otępienia oraz 18 osób zdiagnozowanych, jako sporadyczna postać prawdopodobnego otępienia czołowo-skroniowego. W okresie, w którym prowadzone były badania, zmarło dwóch chorych (T.M. i K.M.). W jednym przypadku (T.M.) badanie histopatologiczne potwierdziło wcześniejsze rozpoznanie, jednak bez cech tauopatii. U 4 osób niemożliwe było przeprowadzenie badania neuropsychologicznego, ze względu na zaawansowany proces otępienny. U dwóch osób (T.K. i B.D.) do obrazu FTD dołączyły się cechy psychozy schizofrenopodobnej, u trzech osób (Ł.A., R.M. i B.A.) wystąpiły napady drgawkowe, u jednej (O.H.) ruchy płasawicze kończyny górnej. W wyniku równoległe prowadzonych analiz u dwóch osób (K.M. i Ł.A.) potwierdzono obecność mutacji w genie preseniliny 1 (*PSEN1*) oraz w jednym przypadku (O.H.) w genie huntingtyny. Osoby te wyłączono z badań dotyczących wpływu innych czynników genetycznych na rozwój FTD. Dane kliniczne oraz wyniki analiz genetycznych u poszczególnych pacjentów zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2. Kliniczny i genetyczny obraz pacjentów.

Pacjenci	Płeć	KLINICZNY OBRAZ PACJENTÓW										GENETYKA			
		wiek zachorowania	czas trwania	zmiany zachowania ¹	objawy psychiatryczne	depresja	dysfunkcja czołowa ²	MMSE/GDS	atrofia w CT	objawy deliberacyjne	objawy pozapiramido	APOE	Haplotyp MAPT	STH	Dodatkowe polimorfizmy MAPT
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
POSTAĆ RODZINNA															
B.D.	K	38	5	+	+	-	+	18/4	skroń	+	-	E3/E4	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
B.A	K	68	4	+	-	+	+	24/3	czoło	-	-	E3/E4	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
C.J	M	44	6	+	-	+	+	25/3	czoło/ skroń	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	IVS11 nt+90 g/a IVS11 nt+104 a/g
C.Z	M	38	21	+	-	-	+	24/3	czoło/ skroń	+	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h IVS11 nt+90 g/a
D.H.	K	61	7	+	+	-	+	10	czoło	+	-	E3/E4	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h E8 n+5 T/C (ACT/ACC;T/T)
D.D.	K	72	5	+	-	-	+	24/4	czoło	+	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y)
F.D.	M	64	4	+	-	-	+	26/3	czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
G.C.	M	60	8	+	+	+	+	20/4	czoło	-	-	E4/E4	H1/H2	Q/R	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y)
K.M.*	M	35	5	+	+	-	+	16/5	czoło	+	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h IVS11 nt+90 g/a
Ka.M.	K	51	3	+	+	+	+	18	norma	-	-	E2/E4	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
K.T.	M	55	7	+	-	-	+	29/3	czoło	+	-	E3/E4	H2/H2	R/R	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D);h E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h E8 n+5 T/C (ACT/ACC;T/T);h
K.K.	K	70	4	+	+	-	+	24/4	skroń	+	+	E3/E4	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h E8 n+5 T/C (ACT/ACC;T/T)
K.A	M	63	6	+	-	+	+	8/5	czoło/ skroń	+	+	E2/E4	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
Ł.C.	K	70	8	+	-	+	+	27/3	czoło	-	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
M.E.	K	65	15	+	-	-	+	22/3	czoło	+	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
M.D.	K	67	6	+	+	-	N	3/6	czoło	+	+	E3/E4	H1/H1	Q/Q	IVS11 nt+90 g/a
O.H*	K	42	7	+	-	-	+	23/2	czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
O.K.	M	67	7	+	-	-	N	4/6	czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) E8 n+5 T/C (ACT/ACC;T/T)
P.K.	M	42	4	+	-	-	+	28/2	czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
R.K.	M	54	3	+	-	-	+	20	czoło	+	-	E3/E3	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
S.R.	M	57	7	+	+	-	+	9/5	czoło	-	+	E2/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
S.M.	K	68	4	+	+	+	+	18/4	czoło	+	-	E3/E3	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h E8 n+5 T/C (ACT/ACC;T/T)
S.C.	M	67	7	+	-	+	+	26/3	czoło	+	-	E2/E4	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
U.H.	M	72	3	+	-	+	+	29/2	czoło	-	-	E2/E3	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
W.W	K	62	4	+	-	-	+	22	czoło	-	-	E4/E4	H1/H1	Q/Q	E4A n+316 A/G (CAA/CGA;Q/R) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h P270P (CCG/CCA)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
W.A.	M	62	4	+	-	+	+	24/4	norma	+	+	E4/E4	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
W.S.	K	58	22	+	-	-	+	20	czoło	+	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	
Z.A.	M	52	6	+	-	-	+	27/3	czoło	-	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+316 A/G (CAA/CGA;Q/R) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h IVS9 nt-47c/a
Z.S.	M	61	8	+	-	-	+	28	ogólna	-	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y)
T.K.	K	22	3	+	+	-	+		czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
POSTAĆ SPORADYCZNA															
B.J.	M	56	12	+	-	-	+	17/5	czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
B.H.	K	51	12	+	-	-	N	1/6	czoło/ skroń	-	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y)
D.K.	M	68	8	+	-	+	N	0/6	czoło	+	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
G.J.	M	57	3	+	-	-	+	24	ogólna	-	+	E3/E4	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
Gr.J.	M	62	8	+	-	-	+	15/5	czoło	+	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
K.I.	K	60	2	+	-	-	+	27/4	skroń	+	+	E3/E3	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h E8 n+5 T/C (ACT/ACC;T/T)
Ł.A.*	K	36	4	+	-	-	+	12/4	czoło/ skroń	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
M.H.	K	59	12	+	-	+	+	19/3	czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y)
M.T.	M	38	3	+	-	+	+	11	czoło	+	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y)
M.B.	M	41	14	+	+	+	+	23/4	czoło/ skroń	-	-	E2/E3	H1/H2	Q/R	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
P.A.	M	46	7	+	-	-	+	14/5	czoło	-	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	IVS9 nt-47c/a IVS11 nt+90 g/a
R.M.	M	43	6	+	+	-	+	26/3	czoło/ skroń	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E4A n+482 C/T (GAC/GAT; D/D) E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y)
R.S.	M	77	3	+	+	-	+	20/4	czoło	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
S.J.	K	51	7	+	+	+	+	26	czoło	+	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
S.T.	M	67	7	+	-	-	+	29/3	czoło	+	+	E2/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y) IVS11 nt+90 g/a
Ś-F. K.	K	41	13	+	-	+	+	9/6	czoło/ skroń	-	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
T.E.	M	70	7	+	-	-	+	26/3	czoło	+	-	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h
W.M.	M	70	3	+	-	+	+	26	czoło	+	+	E3/E3	H1/H1	Q/Q	E6 n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y);h IVS11 nt+90 g/a

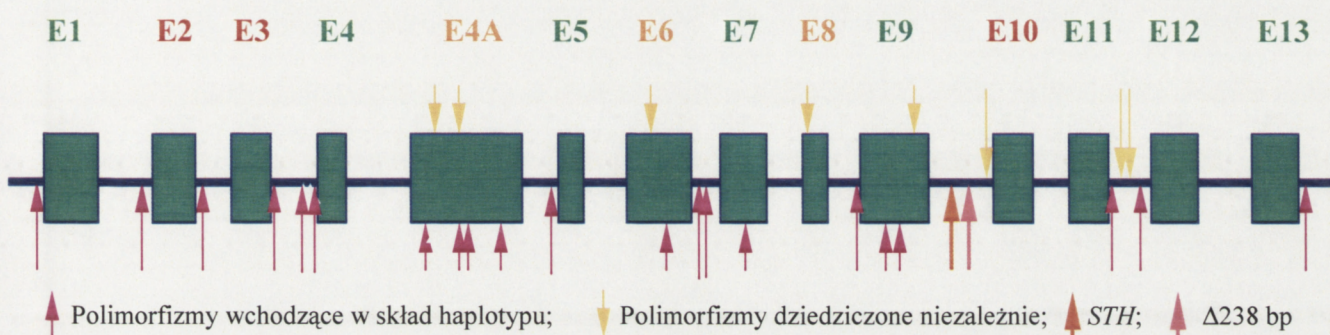
¹w początkowej fazie choroby

²widoczna w badaniu neuropsychologicznym

N – badanie niemożliwe do wykonania

* osoby posiadające mutację w genie preseniliny1 lub huntingtyny

U wszystkich chorych przeprowadzono analizę części kodującej genu *MAPT*, w kierunku poszukiwania zmian sekwencyjnych. Nie odnaleziono żadnej mutacji przyczynowo związanej z chorobą. Opisano natomiast 29 zmian polimorficznych pojedynczego nukleotydu (SNP; ang. *single nucleotide polymorphism*). Rycina 7 przedstawia ich schematyczne rozmieszczenie.



Rycina 7. Schematyczne rozmieszczenie zidentyfikowanych zmian polimorficznych *MAPT*.

Polimorfizmy ulokowane wzdłuż całej cząsteczki genu, szczególnie licznie pojawiają się w bliskich sekwencjach intronowych flankujących eksony oraz w eksonach nie ulegających ekspresji w mózgu. Najbardziej podatny na podstawienia nukleotydowe jest ekson E4A. Osiem polimorfizmów pojawia się niezależnie, natomiast dwadzieścia jeden SNP dziedziczy się łącznie tworząc haplotyp *MAPT*. Cztery stosunkowo rzadkie polimorfizmy: E4A n+316 A/G (Z.A. i W.W.), P270P (W.W.), IVS9 nt-47 c/a (Z.A. i P.A.), IVS11 nt+104 a/g (C.J.) występują zawsze na genotypie H1/H1. Zidentyfikowane zmiany polimorficzne zebrane zostały w tabeli 3.

Tabela 3. Zmiany polimorficzne *MAPT* scharakteryzowane w grupie pacjentów z FTD.

EKSON/INTRON	POLIMORFIZMY
E1	5'UTR -13 a/g
I1	nt-93 t/c
I2	nt+18 c/t
I3	nt+9 a/g; nt-103 t/a; nt-94 a/t
E4A	n+232 C/T (CCG/CTG;P/L); n+316 A/G (CAA/CGA;Q/R); n+480 G/A (GAC/AAC;D/N); n+482 C/T (GAC/GAT;D/D); n+493 T/C (GTA/GCA;V/A); n+735 C/T (CGG/TGG;R/W)
I4A	nt-72 t/c
E6	n+139 C/T (CAC/TAC;H/Y); n+157 T/C (TCC/CCC;S/P)
I6	nt+67 a/g; nt+105 t/c
E7	P176P (CCG/CCA)
E8	n+5 T/C (ACT/ACC;T/T)
I8	nt-26 g/a
E9	A227A (GCA/GCG); N255N (AAT/AAC); P270P (CCG/CCA)
I9	nt-47 c/a; Δ238bp
I11	nt+34 g/a; nt+90 g/a; nt+104 a/g; nt+196 c/t
I13	nt+34 t/c

Grubą czcionką oznaczono polimorfizmy wchodzące w skład haplotypu. W przypadku eksonów nie ulegających ekspresji w mózgu (eksony: 4A, 6, 8) lokalizację miejsc polimorficznych określono licząc od pierwszego nukleotydu w eksonie.

U 45 osób z otępieniem czołowo-skroniowym oraz u 100 osób z grupy kontrolnej przeprowadzono analizę haplotypu *MAPT* i polimorfizmu genu *saitohiny* (*STH*). *STH* pozostaje w całkowitej nierównowadze sprzężeń z haplotypem i stanowi jego integralną część (Tabela 2). Częstość poszczególnych genotypów oraz alleli *MAPT* nie wykazywała istotnych różnic między grupą kontrolną a chorymi. Genotyp H2/H2 występuje niezwykle rzadko ($\approx 3\%$), odnaleziono go tylko u jednego pacjenta (K.T.) oraz u 3 osób z grupy kontrolnej. Wyniki analizy zamieszczone zostały w tabeli 4.

Tabela 4. Rozkład częstości haplotypów i alleli *MAPT* oraz *STH* w populacji zdrowej i wśród chorych z FTD.

Genotyp\ haplotyp <i>MAPT</i>	Genotyp\ haplotyp <i>STH</i>	Kontrole n=100	FTD n=45	Test χ^2
H1/H1 (%)	Q/Q (%)	72 (72%)	34 (75.6%)	0.6551
H1/H2 (%)	Q/R (%)	25 (25%)	10 (22.2%)	0.7176
H2/H2 (%)	R/R (%)	3 (3%)	1 (2.2%)	0.7914
H1 (%)	Q (%)	169 (84.5%)	78 (86.7%)	0.6310
H2 (%)	R (%)	31 (15.5%)	12 (13.3%)	0.6310

Objawy pozapiramidowe opisano u 20 osób. Osiemnaścioro (90%) z nich posiada jednocześnie genotyp H1/H1. Objawy parkinsonowskie rozwinęły się u 53% (18 na 34 osoby) osób homozygotycznych względem H1, podczas gdy tylko u 18% (2 na 11 osób) nosicieli przynajmniej jednego allelu H2. Zauważalna jest więc silna tendencja w kierunku rozwijania się zespołu pozapiramidowego u osób H1/H1 ($p=0.0954$; Test χ^2 z korekcją Yatesa, dla małych grup). Podobna zależność nie ujawniła się w stosunku do odruchów deliberacyjnych ($p=0.4361$), chociaż czołowe odruchy „z uwolnienia” częściej asocjują z genotypem H1/H2. Rozwinęły się one u 64% osób z przynajmniej jednym allelem H2, i u 44% osób H1/H1.

Przy stratyfikacji grupy badanej ze względu na obecność wywiadu rodzinnego obserwuje się różnice w częstości poszczególnych genotypów i alleli *MAPT*. Szczególnie zauważalna jest zwiększona frekwencja genotypu H1/H1 wśród przypadków sporadycznych (88.2% vs 67.8%; $p=0.2362$). Jednak, być może, ze względu na małą liczebność poszczególnych grup, nie wykazano istotności statystycznej badanej zależności (Tabela 5).

Tabela 5. Rozkład częstości haplotypów i alleli *MAPT* oraz *STH* w przypadkach zachorowań rodzinnych i sporadycznych.

Genotyp\ haplotyp <i>MAPT</i>	Genotyp\ haplotyp <i>STH</i>	FTD spor. n=17 (38%)	FTD rodz n=28 (62%)	Test χ^{2*}
H1/H1 (%)	Q/Q (%)	15 (88.2)	19 (67.8)	0.2362
H1/H2 (%)	Q/R (%)	2 (11.8)	8 (28.6)	0.3447
H2/H2 (%)	R/R (%)	0 (0)	1 (3.6)	0.7988
H1 (%)	Q (%)	32 (94)	46 (82.1)	0.1934
H2 (%)	R (%)	2 (6)	10 (17.9)	0.1934

* z korekcją Yatesa

Średni wiek zachorowania w grupie osób z historią rodzinną i wśród chorych bez rodzinnego obciążenia był zbliżony i wynosił odpowiednio: 58.7 ± 11.8 oraz 56.6 ± 12.2 . Średni czas trwania choroby w obu grupach był podobny i wynosił, odpowiednio: 6.8 ± 4.6 lat oraz 7.2 ± 3.9 lat. Brak wpływu haplotypu genu *MAPT* na wiek zachorowania potwierdza niemal identyczny rozkład częstości genotypów i alleli w dwóch grupach wiekowych, poniżej i powyżej 64 roku życia, który ilustruje tabela 6.

Tabela 6. Rozkład częstości haplotypów i alleli *MAPT* oraz *STH* w przypadkach późnych i wczesnych zachorowań.

Genotyp\ haplotyp <i>MAPT</i>	Genotyp\ haplotyp <i>STH</i>	FTD<64 n=28 (62%)	FTD>64 n=17 (38%)	Test χ^{2*}
H1/H1 (%)	Q/Q (%)	21 (75)	13 (76.5)	0.8053
H1/H2 (%)	Q/R (%)	6 (21.4)	4 (23.5)	0.8372
H2/H2 (%)	R/R (%)	1 (3.6)	0 (0)	0.7988
H1 (%)	Q (%)	48 (85.7)	30 (88.2)	0.9830
H2 (%)	R (%)	8 (14.3)	4 (11.8)	0.9830

* z korekcją Yatesa

Ze względu na sprzeczne doniesienia literaturowe przeprowadziłam metaanalizę dotychczasowych wyników oznaczania haplotypu *MAPT* wśród zdrowej populacji i chorych na FTD. Metaanaliza objęła początkowo wyniki opublikowane w 3 pracach o charakterze negatywnym (Morris i wsp. 1999b; Ingelson i wsp. 2001; Sorbido i wsp. 2003). Po włączeniu do analizy dwóch prac, wskazujących na asocjację haplotypu *MAPT* z zachorowaniem (Verpillat i wsp. 2002a; Hughes i wsp. 2003), uzyskano istotność statystyczną analizowanej zależności. Pełną informację o badaniach uwzględnionych w metaanalizie przedstawia tabela 7. Próba interpretacji wyników metaanalizy zawarta została w rozdziale „Dyskusja” niniejszej rozprawy.

Tabela 7. Rozkład częstości alleli i genotypów *MAPT* w różnych populacjach –
Metaanaliza.

	n	H1/H1 (%)	H1/H2 (%)	H2/H2 (%)	H1 (%)	H2 (%)	Referencje
FTD	32	23 (71.9)	8 (25)	1 (3.1)	54 (84.4)	10 (15.6)	Morris i wsp. 1999b
K*	75	50 (66.3)	23 (31)	2 (2.7)	123 (82)	27 (18)	
FTD	36	27 (75)	9 (25)	0 (0)	63 (88)	9 (12)	Ingelsson i wsp. 2001
K	39	23 (59)	14 (36)	2 (5)	60 (77)	18 (23)	
FTD	45	26 (58)	15 (33)	4 (9)	67 (74)	23 (26)	Sorbido i wsp. 2003
K	36	23 (64)	8 (22)	5 (14)	54 (75)	18 (25)	
FTD	113	76 (67.3)	32 (28.3)	5 (4.4)	184 (81.4)	42 (18.6)	Łączna analiza powyższych prac
K	150	96 (64)	45 (30)	9 (6)	237 (79)	63 (21)	
χ^2		0.5826	0.7667	0.5732	0.4926		
FTD	100	62 (62)	38 (38)		154 (77)	46 (23)	Verpillat i wsp. 2002a
K	79	36 (46)	43 (54)		110 (70)	48 (30)	
FTD	58	39 (67.3)	18 (31)	1 (1.7)	96 (82.8)	20 (17.2)	Hughes i wsp. 2003
K	168	90 (53.6)	64 (38.1)	14 (8.3)	244 (72.6)	92 (27.4)	
FTD	271	177 (65.3)	94 (34.7)		434 (80.1)	108 (19.9)	Łączna analiza wszystkich prac
K	397	222 (55.9)	175 (44.1)		591 (74.4)	203 (25.6)	
χ^2		0.0151			0.0166		

* grupa kontrolna

Analizowano rozkład alleli genu apolipoproteiny E w grupie badanej i kontrolnej. Wśród 145 osób żadna nie posiadała genotypu $\epsilon 2/2$. Nie odnotowano też statystycznie istotnej różnicy częstości występowania allelu $\epsilon 2$ u pacjentów w stosunku do grupy kontrolnej ($p=0.4570$). Opisano natomiast silną tendencję do zwiększenia częstości występowania genotypu $\epsilon 4/4$ u osób z FTD ($p=0.0539$), przy jednoczesnym braku wpływu pojedynczego allelu $\epsilon 4$ na zachorowanie ($p=0.1136$). W grupie osób zdrowych przeważał allel $\epsilon 3$ ($p=0.0707$). Pełne wyniki oznaczania genotypu *apolipoproteiny E* przedstawia tabela 8.

Tabela 8. Rozkład częstości alleli i genotypów *apolipoproteiny E*.

	Częstość allelu, n (%)			Rozkład genotypów, n (%)					
	$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$	$\epsilon 2/2$	$\epsilon 2/3$	$\epsilon 2/4$	$\epsilon 3/3$	$\epsilon 3/4$	$\epsilon 4/4$
FTD; n=45	7 (7.8)	67 (74.4)	16 (17.8)	0 (0)	4 (8.9)	3 (6.7)	28 (62.2)	7 (15.5)	3 (6.7)
Kontrolne; n=100	11 (5.5)	167 (83.5)	22 (11)	0 (0)	9 (9)	2 (2)	70 (70)	18 (18)	1 (1)
Test χ^2	0.4570	0.0707	0.1136	-	0.9827	0.1542	0.3546	0.7185	0.0539

Wszystkie osoby z genotypem *APOE* $\epsilon 4/4$ obciążone są dodatnim wywiadem rodzinnym (wiek zachorowania: 68, 62, 62). Wśród zachorowań sporadycznych tylko jedna osoba posiada allel $\epsilon 4$ (genotyp: $\epsilon 3/4$, wiek zachorowania: 57 lat). W grupie przypadków rodzinnych allel $\epsilon 4$ pojawia się istotnie częściej ($p=0.0041$). Obecność pojedynczego allelu $\epsilon 4$ wydaje się nie wpływać jednak na wiek zachorowania ($p=0.9178$). Średni wiek zachorowania u nosicieli allelu $\epsilon 4$ wynosi 60.85 ± 8.7 lat, podczas gdy osoby nie posiadające tego allelu chorują w wieku około 56.74 ± 12.8 lat. Dystrybucję allelu $\epsilon 4$ w zależności od rodzinności oraz wieku zachorowania przedstawia tabela 9.

Tabela 9. Częstość allelu *APOE* $\epsilon 4$ w przypadkach rodzinnych i sporadycznych oraz w zależności od wieku zachorowania.

APOE	FTD sporadycz. n=17 (%)	FTD rodzinne n=28 (%)	FTD<64 n=28 (%)	FTD>64 n=17 (%)
$\epsilon 4+$	1 (2.9)	15 (26.8)	10 (17.9)	6 (17.6)
$\epsilon 4-$	33 (97.1)	41 (73.2)	46 (82.1)	28 (82.3)
Test χ^2	0.0041		0.9178	

Przeprowadzono analizę jednoczesnego wpływu polimorfizmu *APOE* i haplotypu *MAPT* na rozwinięcie FTD. Szczegóły analizy zamieszczono w tabeli 10. Nie odnotowano zależności pomiędzy zachorowaniem a jednoczesnym wystąpieniem *APOE* $\epsilon 4$ i genotypu H1/H1 *MAPT* ($p=0.8055$). Bardziej prawdopodobny wydaje się jednoczesny wpływ allelu $\epsilon 2$ występującego łącznie z genotypem H1/H1. Częstość takiego układu jest znacznie wyższa w grupie FTD niż wśród osób zdrowych (57.1% vs 36.4%; $p=0.2329$). Zależność nie wykazuje jednak istotności statystycznej, co spowodowane może być niską frekwencją badanego allelu w populacji.

Tabela 10. Jednoczesna analiza polimorfizmu *APOE* i haplotypu *MAPT* w grupie kontrolnej i wśród chorych z FTD.

<i>ApoE</i>	n	Genotyp/Haplotyp <i>MAPT</i> (%)				
		H1/H1	H1/H2	H2/H2	H1	H2
FTD $\epsilon 4+$	13	7 (15.6)*	5 (11.1)	1 (2.2)	19 (21.1)	7 (7.8)
FTD $\epsilon 4-$	32	27 (60)	5 (11.1)	0 (0)	59 (65.6)	5 (5.5)
Kontrole $\epsilon 4+$	21	14 (14)	7 (7)	0 (0)	35 (17.5)	7 (3.5)
Kontrole $\epsilon 4-$	79	58 (58)	18 (18)	3 (3)	134 (67)	24 (12)
FTD $\epsilon 2+$	7	4 (57.1)**	3 (42.9)	0 (0)	11 (78.6)	3 (21.4)
FTD $\epsilon 2-$	38	30 (79)	7 (18.4)	1 (2.6)	67 (88.2)	9 (11.8)
Kontrole $\epsilon 2+$	11	4 (36.4)	7 (63.6)	0 (0)	15 (68.2)	7 (31.8)
Kontrole $\epsilon 2-$	89	68 (76.4)	18 (20.2)	3 (3.4)	154 (86.5)	24 (13.5)

* p=0.8055

** p=0.2329

5. DYSKUSJA

5.1. Złożoność diagnostyki przyżyciowej FTD a prawidłowy dobór badanej grupy

Istotną trudnością związaną z prowadzeniem badań nad genetycznym podłożem FTD jest dobór właściwej grupy badanej, gdyż otępienie czołowo-skroniowe reprezentuje niejednorodną klinicznie, patologicznie i genetycznie grupę chorób neurozwyrodnieniowych. Ostateczne rozpoznanie postawić można dopiero *post mortem*, na podstawie badania histopatologicznego lub biopsji mózgu. Z tego względu istnieje niebezpieczeństwo włączenia do badań pacjentów cierpiących na inne choroby. Z drugiej strony, ze względu na obszerne i różnorodne spektrum objawów FTD może być często nierozpoznawane. Stąd odnotowuje się stosunkowo niewielką liczbę chorych z tego typu rozpoznaniem, mimo iż FTD stanowi trzecią przyczynę otępień. Najczęściej zamiast FTD rozpoznaje się AD. Klasycznym przykładem jest praca Mendez i wsp. z 1993 roku, w której 18/21 chorych z rozpoznaną autopsyjnie chorobą Picka (klasyczna postać FTD) miało postawione kliniczne rozpoznanie choroby Alzheimera. Trafność przyżyciowych rozpoznań poprawiła się po wprowadzeniu w 1994 roku kryteriów klinicznych dla FTD. Jednak i obecnie prowadzenie diagnostyki różnicowej tych dwóch jednostek nastęrcza trudności, gdyż ponad 70% chorych z FTD spełnia także kryteria kliniczne Narodowego Instytutu Chorób Neurologicznych i Udaru dla Choroby Alzheimera i Chorób Pokrewnych (NINCDS/ADRDA; ang. *The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) dla prawdopodobnej choroby Alzheimera (Varma i wsp. 1999). W odróżnieniu od AD, której objawem wiodącym są swoiste zaburzenia pamięci, w FTD, zależnie od wariantu, dominują bądź zaburzenia funkcji wykonawczych, bądź zaburzenia językowe. Według Millera i wsp. (1997), obecność zachowań stereotypowych, perseweracyjnych oraz

niewłaściwe zachowania społeczne i hiperoralność w połączeniu z postępującą redukcją mowy przy zachowanej orientacji przestrzennej różnicują FTD i AD w 100% (Miller i wsp. 1997). Studia retrospektywne dowodzą jednak, że tylko od 60% - 93% pacjentów z FTLD jest prawidłowo diagnozowanych klinicznie, podczas gdy dla AD wskaźnik ten sięga 97% (Rosen i wsp. 2002; Slachevsky i wsp. 2004). Ze względu na wcześnie występujące w FTD zaburzenia zachowania przy początkowym braku ewidentnych zaburzeń pamięci, często rozpoznawano również choroby psychiczne - depresję, schizofrenię, histerię, czy chorobę dwubiegunową (Gregory i wsp. 1996; Swartz i wsp. 1997). Objawy czołowe mogą wiązać się także z istnieniem nowotworów płatów czołowych, choroby Huntingtona lub rodzinnych postaci chorób wywołanych przez priony. W przebiegu PSP, stosunkowo wcześnie spotyka się objawy psychopatologiczne typowe dla zespołu czołowego (apatia, stereotypie, echolalia, zaburzenia myślenia abstrakcyjnego, fluencji słownej, zaburzenia emocjonalne, psychotyczne, hipochondrię, odruchy deliberacyjne).

Główne warianty kliniczne mogące pojawiać się w przebiegu choroby związane są z topografią zaniku w obrębie płatów czołowych i/lub przedniej części płatów skroniowych. Brak tego typu zmian, stwierdzony na podstawie wyniku tomografii komputerowej (CT; ang. *computed tomography*), nie wyklucza jednak rozpoznania choroby. Najskuteczniejszym narzędziem w rękach klinicystów są obecnie obrazowanie czynnościowe oraz badanie neuropsychologiczne. Analiza neuropsychologiczna staje się jednak w ograniczonym stopniu użyteczna w przypadku nietypowego przebiegu choroby. W grupie badanej emisyjna tomografia pojedynczego fotonu (SPECT; ang. *single photon emission computed tomography*) wykonywana była w uzasadnionych przypadkach. Testom neuropsychologicznym poddani zostali wszyscy chorzy z wyjątkiem 4 osób, u których proces otępienny był silnie zaawansowany. W grupie chorych objętych

badaniem prawdopodobieństwo obecności innych jednostek chorobowych zostało sprowadzone do minimum dzięki współpracy zespołu klinicystów. Chorzy znajdowali się pod jednoczesną opieką neurologa, neuropsychologa i psychiatry. Każdy z nich miał wykonywane podstawowe badania biochemiczne oraz badania laboratoryjne, takie jak: poziom hormonów tarczycy, witaminy B12, homocysteiny, badanie elektroencefalograficzne (EEG). Wszyscy mieli wykonaną tomografię komputerową mózgu, zgodnie z techniką pozwalającą na pośrednią ocenę stopnia zaniku mózgu w rejonie hipokampów (George i wsp. 1990), co zwiększa szansę wykluczenia z grupy badanej chorych z nietypowym przebiegiem AD.

Ze względu na trudności diagnostyczne, które przedstawiłam wcześniej, argumentując doniesieniami literaturowymi, grupa chorych z otępieniem czołowo-skroniowym scharakteryzowana w prezentowanym badaniu jest unikatowa w polskich warunkach. A biorąc pod uwagę restrykcyjne dopasowanie do kryteriów diagnostycznych, również jest to grupa stosunkowo liczna. Poszerzenie pracy, przez włączenie chorych budzących zastrzeżenia co do trafności rozpoznania, znacznie zmniejszyłoby wartość poznawczą prowadzonych analiz. Jednocześnie doniesienia literaturowe podkreślają, że nie istnieją cechy fenotypowe jednoznacznie sugerujące obecność mutacji *MAPT* (Reed i wsp. 2001; Ghetti i wsp. 2003; Wszolek 2004). Grupa badana została więc słusznie skonstruowana w oparciu o włączenie chorych prezentujących szerokie i zróżnicowane spektrum objawów. Preferencyjne włączanie do grupy osób prezentujących wybrane cechy, na przykład parkinsonizm, mogłoby doprowadzić do nieuzasadnionego zawężenia grupy i w efekcie nieadekwatnych wyników analizy. Cechom przypisanym otępieniu czołowo-skroniowemu z zespołem parkinsonowskim towarzyszą często zaburzenia o innym charakterze: padaczka, psychoza schizofreno-podobna, amyotrofia, a nawet niewydolność oddechowa (Bugiani i wsp. 1999; Sperfeld i wsp. 1999; Miyamoto i wsp.

2001; Nicholl i wsp. 2003). Z tego powodu chorzy, prezentujący obok klasycznego zespołu czołowego również wspomniane nietypowe objawy, nie zostali wyłączeni z prowadzonych przeze mnie badań.

Trudności przyżyciowej diagnostyki doskonale odzwierciedla przypadek jednego (K.M.) z dwóch nieżyjących chorych. Mężczyzna zachorował w wieku 33 lat. W tym samym wieku otępienie o nieznanym podłożu rozwinęło się także u jego matki. Prawdopodobne otępienie czołowo-skroniowe zdiagnozowano u probanda zgodnie z obowiązującymi kryteriami Lund-Manchester na podstawie typowych objawów klinicznych oraz wyników neuroobrazowania. CT wykazało nasilone czołowe zaniki mózgu bez cech zaniku hipokampa. SPECT uwidoczniał znaczne obniżenie przepływów w obszarze płatów czołowych. Badanie neuropsychologiczne ujawniło typowe dla FTD cechy: zmianę osobowości, nawyków, obojętność emocjonalną, utratę empatii, zachowania stereotypowe, inercyjność reakcji, persewacje, konkretyzację myślenia, okresowe rozhamowanie, obniżony krytycyzm. Obserwowano deficyty poznawcze w zakresie funkcji wykonawczych, głównie w planowaniu, rozwiązywaniu problemów i w zakresie świadomego kierowania uwagą. Nietypowa dla FTD wydaje się głęboka deterioracja pamięci krótkotrwałej i zdolności uczenia, które to cechy rozwinęły się w czasie trwania choroby. Po 18 miesiącach wynik badania MMSE wynosił 14/30. Badanie neurologiczne wykazało obecność wyraźnych obustronnych odruchów deliberacyjnych i zaznaczonych objawów pozapiramidowych. Chory zmarł w wieku 38 lat w głębokim mutyzmie akinetycznym. Analiza histopatologiczna wykazała obecność blaszek amyloidowych oraz NFT i pozwoliła na postawienie rozpoznania pewnej choroby Alzheimerera, zgodnie z przyjętymi kryteriami (CERAD; ang. *Consortium to Establish a Registry for AD*). Co więcej, analiza molekularna ujawniła obecność mutacji w genie preseniliny 1. Chory ten został wyłączony z dalszych analiz genetycznych.

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, cytowanymi we wstępie tej pracy, mutacji *MAPT* należałoby się spodziewać wyłącznie wśród przypadków zachorowań rodzinnych, o wyraźnie zarysowanym profilu dziedziczenia i rozbudowanej genealogii. Dlatego za słuszne uważam przytoczyć wybrane przypadki zachorowań opisywane w literaturze światowej, które przeczą temu założeniu i jednocześnie uzasadniają włączenie do moich badań osób bez wyraźnego podłoża rodzinnego lub o niejasnym wzorze dziedziczenia. Nie odnotowano przypadków postępujących zaburzeń neurologicznych w rodzinach probandów z mutacjami: $\Delta 280K$ (Rizzu i wsp. 1999), w jednej z rodzin L266V (Hogg i wsp. 2003), I260V (Grover i wsp. 2003), u angielskiej chorej z podstawieniem G389R (Pickering-Brown i wsp. 2000a). W rodzinie z mutacją S320F zachorowali jedynie matka i syn. Żadne z rodziców matki, ani jej siedmiorga rodzeństwa nie wykazywało objawów otępienia (Rosso i wsp. 2002a). Na podstawie przytoczonych doniesień wydaje się prawdopodobne istnienie mutacji *de novo*. Zaburzony wzorec dziedziczenia wskazywać może natomiast na niepełną penetrację, zróżnicowaną ekspresję mutacji w rodzinie, czy też istnienie modyfikatorów (np. polimorfizmów modulujących podstawowy fenotyp choroby, zmian epigenetycznych lub ponadgenomowych). Rodzice nosiciela mutacji K257T zmarli w wieku 80 lat bez cech otępienia, natomiast dwóch braci matki zmarło w średnim wieku, jeden z nich na niezidentyfikowaną chorobę umysłową (Rizzini i wsp. 2000). Nosicielka włoskiej mutacji G389R odziedziczyła zmianę najprawdopodobniej po chorym dziadku, gdyż również brat ojca wykazywał podobne objawy chorobowe. Żadne z jej rodziców nie ujawniło natomiast objawów neurodegeneracji (Murrell i wsp. 1999). Na niepełną penetrację mutacji L315R wskazywało odnalezienie zmiany u 82 letniej matki chorego rodzeństwa, u której nie obserwowano otępienia. Historia rodzinna sugeruje brak penetracji jeszcze u dwóch osób. Mutacja ta prowadzi do zróżnicowanej ekspresji klinicznej: od pojawienia się objawów chorobowych już w wieku 25 lat, do całkowitego

ich braku w wieku podeszłym (van Herpen i wsp. 2003). Odnotowano przypadek 72 letniego nosiciela mutacji E10+16, u którego w ogóle nie rozwinęły się objawy chorobowe (Houlden i wsp. 1999a). W przypadku dwóch mutacji: S352L (Nicholl i wsp. 2003) i Δ 296N (Pastor i wsp. 2001; Grover i wsp. 2002) opisano dziedziczenie o charakterze autosomalnym recesywnym. Wydaje się, że przypadki podobne do wymienionych mogłyby pozostać nierozpoznane, przy stosowaniu rutynowych wskazań do diagnostyki molekularnej.

Ze względu na złożony i niejednorodny obraz dziedziczenia, jaki wyłania się z doniesień literatury światowej, do grupy badanej włączone zostały przypadki FTD, zarówno z dobrze udokumentowaną historią rodzinną, jak i uznane za sporadyczne na podstawie wywiadu rodzinnego. Tym bardziej, że wywiad zbierany od opiekunów pacjenta, nie zawsze jest rzetelny i rzeczywisty, a brak wnikliwej diagnostyki chorób otępiennych w poprzednich pokoleniach często uniemożliwia tworzenie drzew genealogicznych, jednoznacznie wizualizujących sposób dziedziczenia. Do form rodzinnych zaliczono osoby, u których odnotowano przynajmniej jeden przypadek otępienia wśród bliskich krewnych. 62% osób z mojej grupy badanej cechuje rodzinność, co stanowi nieco większy odsetek w porównaniu z doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na obecność elementów dziedzicznych w 40 - 60% zachorowań (Chow i wsp. 1999).

5.2. Mutacje w patogenezie otępienia czołowo-skroniowego

W badanej grupie 48 osób nie odnaleziono mutacji w części kodującej genu *MAPT* i bliskich sekwencjach intronowych (Żekanowski i wsp. 2003a). Mutacje mogły pojawić się w nieanalizowanych w ramach tego badania regionach, które obejmują nieznanne elementy promotorowe i regulatorowe sekwencje intronowe. Bardziej prawdopodobne jest jednak, że mutacje *MAPT* są rzadką przyczyną otępienia czołowo-skroniowego.

Szansa odnalezienia mutacji *MAPT* zależy też od analizowanej populacji. Brak mutacji wynikać może ze specyfiki populacji polskiej i odmiennego podłoża genetycznego prowadzącego do patologii. W Polsce nie była dotychczas przeprowadzana podobna analiza, poza jednym doniesieniem dotyczącym braku mutacji u czterech polskich chorych (Kowalska i wsp. 2001), co uniemożliwia prowadzenie adekwatnych porównań. Powodem może być również zastosowane kryterium doboru grupy badanej. Chorzy włączeni zostali do badania wyłącznie na podstawie cech klinicznych, a obraz histopatologiczny uzyskany został tylko w przypadku dwóch zmarłych osób. Z tego względu nie można wykluczyć innego podłoża zaburzeń, niż gromadzenie wtrętów tau. FTD histopatologicznie klasyfikowane jest do trzech kategorii: z neuronalnymi i glejowymi depozytami tau (45%), z inkluzjami ubikwitynowymi (33%) oraz z zanikiem neuronów i mikrowakuolizacją bez inkluzji wewnątrzkomórkowych (22%) (Rosso i wsp. 2003). Nie istnieją cechy kliniczne, które różnicowałyby omawiane podtypy, mimo niewątpliwej genetycznej ich heterogenności. Sytuacja ta znacznie utrudnia prowadzenie genetycznych badań populacyjnych. Otrzymane wyniki mogą różnić się w zależności od doboru grupy badanej, który przy niedostępności badań histopatologicznych może okazać się przypadkowy.

Częstość identyfikowania mutacji genu *MAPT* w prowadzonych dotychczas badaniach populacyjnych waha się od 0% - 50%. Dwa pierwsze badania przeprowadzone zostały w 1999 roku. Rizzu i wsp. analizując populację holenderską odnaleźli mutacje w 17.8% przypadków FTD. Badaniem objęto 90 osób. Trzydziestu pacjentów pochodziło z rodzin, w których chorowały co najmniej dwie osoby. Przy zawężeniu grupy badanej tylko do tych szczególnych przypadków, wykrywalność mutacji wzrosła do 40.5% (Rizzu i wsp. 1999). W 2003 roku rozszerzono badaną grupę do 154 osób. Mutację odnaleziono wyłącznie u osób z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku otępienia z częstością 32% (dla całej populacji 14%) (Rosso i wsp. 2003). Houlden i wsp. nie opisali żadnej

mutacji wśród 71 przypadków otępienia typu niealzheimerowskiego z Minesoty. Odnaleźli natomiast mutacje w 13.6% przypadków, gdy grupę badaną stanowiły 22 osoby z Manchester, spełniające kryteria diagnostyczne i neuropatologiczne FTD, jednocześnie posiadające co najmniej jednego krewnego pierwszego stopnia, cierpiącego na podobny typ otępienia (Houlden i wsp. 1999a). Zespół Poorkaja zidentyfikował mutacje w 5.9 % grupy badanej złożonej ze 101 osób z Północnej Ameryki. Nie stwierdził mutacji w przypadkach sporadycznych (44 osoby). Gdy pod uwagę wzięto wyłącznie rodzinne przypadki, mutacje stwierdzono w 10.5%. Kiedy dodatkowo zawężono kryteria do przypadków rodzinnych z patologią tau potwierdzoną histopatologicznie, odsetek zidentyfikowanych mutacji wzrósł do 33% (Poorkaj i wsp. 2001b). Morris i wsp. zidentyfikowali mutacje aż w 50% przypadków. Grupę badaną stanowili probandzi z 22 rodzin o wyraźnie zarysowanym profilu dziedziczenia, u 80% z nich rozpoznanie potwierdzone było badaniem histopatologicznym (Morris i wsp. 2001). Analiza przeprowadzona w 2004 roku przez zespół Stanford wydaje się potwierdzać te obserwacje. W całej grupie 64 pacjentów mutacje odnaleziono w 4 przypadkach (6.3%). 3 mutacje stwierdzono w grupie chorych, u których otępienie dziedziczone było wyraźnie w sposób autosomalny dominujący i dotyczyło wielu członków rodziny na przestrzeni dwóch pokoleń (25%). Jedną mutację stwierdzono wśród przypadków uznanych za sporadyczne (4%). Natomiast wśród osób z historią rodzinną w kierunku chorób neurodegeneracyjnych i co najmniej jednym chorym krewnym pierwszego stopnia, mogącym prezentować różnice w fenotypie chorobowym, nie opisano żadnej mutacji, jedynie 2 rzadkie polimorfizmy. U osób tych wzór dziedziczenia nie był tak oczywisty, jak w grupie poprzedniej (Stanford i wsp. 2004). W populacji włoskiej, częstość identyfikowania mutacji w przypadkach rodzinnych wynosiła 7.6% (Binetti i wsp. 2003), podczas gdy wśród chorych kanadyjskich (wywodzących się z Anglii i Francji) nie odnaleziono żadnej

patogennej zmiany (Levchenko i wsp. 2004). Doniesienia literaturowe potwierdzają, że mutacje w genie *MAPT* nie są częstą przyczyną FTD i w ogólnej grupie chorych wynoszą od 0% do 17.8% przypadków, a częstość ich odnajdywania wzrasta, jeśli uwzględni się historię rodzinną, profil dziedziczenia oraz obecność tauopatii w badaniu histopatologicznym.

Jak się wydaje, brak wykrycia mutacji w regionie kodującym *MAPT* u analizowanej przeze mnie grupy chorych, nie jest spowodowany błędnym rozpoznaniem, a wskazuje raczej na odmienne podłoże molekularne prowadzące do patogenezy. Prawdopodobna jest lokalizacja zmian przyczynowo związanych z chorobą w innych regionach genomu lub synergistyczny wpływ licznych czynników o charakterze polimorficznym, zlokalizowanych w wielu genach. Nie można pominąć potencjalnego udziału czynników epigenetycznych i bliżej nieokreślonych czynników środowiskowych w patogenezie większości zachorowań.

Hipotezę, o zaangażowaniu genów innych niż *MAPT* w rozwój otępienia czołowo-skroniowego, potwierdzają coraz liczniejsze doniesienia literatury światowej (Brown i wsp. 1995; Froelich i wsp. 1997; Hosler i wsp. 2000; Rademakers i wsp. 2002). Odnaleźć można w nich opisy wielopokoleniowych rodzin FTD, w których choroba dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący, a jednak nie stwierdza się zmian sekwencji kodującej *MAPT*. Chorzy prezentują typowy obraz kliniczny FTD. W obrazie neuropatologicznym dominują ubikwityno-dodatnie i tau-ujemne inkluzje cytoplazmatyczne obecne w powierzchniowych warstwach kory czołowo-skroniowej (Kovari i wsp. 2000, Savioz i wsp. 2000; Savioz i wsp. 2003). Interesująca jest podobna dystrybucja zmian neurodegeneracyjnych szczególnie w drugiej i trzeciej warstwie kory czołowej i skroniowej, zasocjowana z dwoma różnymi patologicznymi fenotypami, charakteryzowanymi albo przez depozyty tau, albo przez inkluzje ubikwitynowe.

Jednocześnie cechy kliniczne, mieszczące się w szerokim spektrum FTD, uniemożliwiają rozróżnienie tych przypadków przyżyciowo. Obecnie znanych jest 11 rodzin, w których przy jednoczesnym braku nieprawidłowości w ilości i rozkładzie izoform tau, odnotowuje się różny stopień sprzężenia z obszarem 17q21-22 (Rademakers i wsp. 2005). Gen *MAPT* ulokowany jest wewnątrz krytycznego regionu. W „rodzinie Ontario” maksymalny LOD score wynosi 1.68 (Kertesz i wsp. 2000). Na przestrzeni 4 pokoleń opisano 34 przypadki zachorowań w rodzinie pochodzącej z południowych Włoch. Maksymalny LOD score do mapowanego regionu wynosi w niej 2.7 (Curcio i wsp. 2002). W dużej rodzinie holenderskiej, Dutch III (32 chorych na przestrzeni 4 pokoleń), wykazano silną asocjację (LOD score = 3.46) z tym obszarem (Heuting i wsp. 1997; Rosso i wsp. 2001). Bezsprzeczne sprzężenie z markerami regionu 17q21 (LOD score = 5.51), odnotowano też w holenderskiej rodzinie 1083. Ołepienie, typowe dla FTD dotknęło 16 osób w czterech pokoleniach (Rademakers i wsp. 2002). Prowadzone badania nie mogą całkowicie wykluczyć mutacji w regionach *MAPT*, które nie były dotychczas sekwencjonowane, w tym również w sekwencjach regulatorowych. Jednak nieobecność mutacji w regionie kodującym w powiązaniu z brakiem patologii białka tau, sugeruje istnienie innego genu (lub genów) pozostającego w pobliżu *MAPT* i odpowiedzialnego za manifestację fenotypową schorzenia zbliżoną do FTDP-17. Tym bardziej, że do analizowanego obszaru mapuje się szereg genów (<http://www.ncbi.nlm.nih/UniGene>).

Znacznie słabiej rozbudowana genealogia rodzin probandów włączonych do mojego badania oraz niedostępność materiału genetycznego od ich krewnych, uniemożliwia przeprowadzenie analizy sprzężeń, która mogłaby potwierdzić istnienie podobnej zależności w populacji polskich chorych. Nie mniej, jest bardzo prawdopodobne, że u podłoża zachorowań pacjentów w grupie analizowanej przeze mnie leżą zmiany w genach innych niż *MAPT*.

Nowe spojrzenie na genezę FTD, które uzasadniałoby brak identyfikacji mutacji *MAPT* w większości zachorowań, a jednocześnie potwierdzało hipotezę o zaangażowaniu w patologię otępienia czołowo-skroniowego innych genów, wniosły ostatnie badania prowadzone przez zespół Crutsa. Analizując region 17q11.2-17q24.2 ustalili oni, że jest to obszar genetycznie niezwykle złożony, niestabilny i skłonny do mutacji. Zlokalizowanych jest w nim 5 sekwencji LCR (ang. *low-copy repeat*), w tym 3 wysoce homologiczne *MAPT* LCR (Cruts i wsp. 2005). Udowodnione jest, że genomowe rearanżacje (głównie niealleliczna rekombinacja) między sekwencjami LCR, stanowiące jeden z mechanizmów specjacji, leżą też u podłoża wielu chorób, między innymi raka piersi (Lupski 1998; Stankiewicz i Lupski 2002). FTD może być więc chorobą genomową. Znaczący jest fakt, że w obrębie sekwencji LCR lub między nimi zidentyfikowano szereg genów, w tym również geny białek istotnych w procesach nerwowych: receptor 1 hormonu uwalniającego kortykotropinę (*CRHR1*; ang. *corticotropin releasing hormone receptor 1*), wewnątrzłonową proteazę 5 (*IMP5*; ang. *intramembrane protease 5*), *MAPT*, *STH*, *WNT3* (ang. *wingless-type MMTV integration site member 3*). Krystalizuje się w ten sposób grupa genów – kandydatów, których zmiany mogą leżeć u podłoża zachorowań. Nie można też wykluczyć efektu pozycyjnego, jako przyczyny zachorowania osób, u których nie zidentyfikowano mutacji *MAPT* (Cruts i wsp. 2005).

Istnienie genetycznej heterogenności locus FTD, nie stanowi jedynie zjawiska hipotetycznego, ale jest ilustrowane doniesieniami literaturowymi, wskazującymi, że zmiany w różnych regionach genomowych prowadzą do ujawnienia fenotypu charakterystycznego dla otępienia czołowo-skroniowego. W duńskiej rodzinie FTD potwierdzono sprzężenie (maksymalny LOD score = 5.6) z regionem perycentromerycznym chromosomu 3 (Brown i wsp. 1995; Brown 1998; Ashworth i wsp. 1999; Brown i wsp. 2004). Dotychczas odnotowano 22 przypadki zachorowań

na przestrzeni 3 pokoleń. Fenotyp chorobowy nie jest zróżnicowany i całkowicie odpowiada przyjętym kryteriom dla FTD (Gydesen i wsp. 2002). Mała ilość złożeń tau nie pozwala stwierdzić tauopatii, chociaż wydaje się, że defekt genetyczny może wzmacniać akumulację białka (Yancopoulou i wsp. 2003). W kilku rodzinach odnotowano też związek zachorowania ze zmianami zlokalizowanymi na 9 chromosomie. Przy czym objawy FTD współistnieją z innymi jednostkami neurologicznymi. Sprzężenie (LOD score = 3.34) z regionem 9q21-22 wykazano w 16 rodzinach, w których odnotowano jednoczesne zachorowania na FTD i stwardnienie zanikowe boczne (ALS; ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*). Dla rodzin z ALS, bez współistniejącego otępienia nie potwierdzono istotności tego krytycznego locus (Hosler i wsp. 2000). Prowadząc analizę sprzężeń wewnątrz 4 rodzin Kovach i wsp. wykazali, że ujawnienie się dziedzicznej miopatii z chorobą Pageta i otępieniem czołowo-skroniowym (IBMPFD; ang. *Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia*) w jednej rodzinie, a nawet u jednej osoby, powiązane jest ze zmianami w locus 9p13.3-12 (LOD score = 3.64) (Kovach i wsp. 2001). Wystąpienie fenotypu chorobowego wynika z mutacji w genie *VCP* (ang. valosin-containing protein). Dotychczas opisano 6 mutacji zidentyfikowanych u 14 rodzin (Watts i wsp. 2004; Schroder i wsp. 2005).

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi również mutacje w *PSEN1* mogą prowadzić do ujawnienia się fenotypu chorobowego klinicznie i neuropatologicznie tożsamego z FTD (Hutton i wsp. 2004). Dotychczas uważano, że mutacje presenilin skutkują nieprawidłowym procesowaniem białka prekursorowego amyloidu (APP; ang. *amyloid precursor protein*) przez kompleks γ -sekreazy i wiązano je głównie z dziedziczną postacią choroby Alzheimera (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>). Zagadnienie to jest szczególnie znaczące dla prowadzonej przeze mnie analizy, gdyż mutacje *PSEN1* zidentyfikowano u dwóch pacjentów z grupy badanej, w wyniku równoległe

prorowadzonych prac. Mutację L226F opisano u jednego zmarłego pacjenta (K.M., charakterystyka kliniczna na str. 71). Druga mutacja, P117R, została odnaleziona u 36 letniej pacjentki (Ł.A.), u której dominującymi objawami wskazującymi na uszkodzenie struktur czołowo-skroniowych były we wczesnej fazie choroby: apatia, wycofanie, zachowania stereotypowe i perseweracyjne, brak wglądu, sztywność myślenia i kojarzenia, kontaminacje słowne, echolalie. W obrazie CT widoczny był zanik korowo-podkorowy w obrębie płatów czołowych i skroniowych. SPECT potwierdził obniżenie przepływów w tym rejonie. Również odczyt EEG z tego obszaru był zaburzony. W badaniu neurologicznym stwierdzono bradykinezę, mioklonie oraz napady epilepsji. W ciągu trzech lat obserwowano gwałtownie narastający zanik mózgu towarzyszący pogłębianiu zaburzeń pamięci (MMSE = 10/30). Chora nie miała obciążającego wywiadu rodzinnego (ojciec popełnił samobójstwo w wieku 50 lat). U jednego chorego (R.M.) zidentyfikowano w *PSEN1* zmianę polimorficzną E318G, która według części badaczy, może stanowić czynnik ryzyka rozwoju otępienia (Żekanowski i wsp. 2004).

Objawy kliniczne obejmujące zmiany osobowości i zachowania oraz zmiany w neuroobrazowaniu całkowicie spełniające kryteria Lund – Manchester opisano także w literaturze u nosicieli mutacji: L113P (Raux i wsp. 2000), insR352 (Amtul i wsp. 2002; Tang-Wai i wsp. 2002), G183V (Dermaut i wsp. 2004). Szczególnie informatywna jest mutacja G183V, dla której uzyskano obraz histopatologiczny wykazujący obecność tauopatii przy braku zewnątrzkomórkowych złogów amyloidu. Asocjacja klinicznej ekspresji FTD z mutacjami preseniliny 1 (PS1) sugeruje, że dysfunkcja PS1 prowadzić może do neurodegeneracji przez więcej niż jeden mechanizm. Mutacja insR352 hamuje proteolityczną aktywność γ -sekreazy zarówno wobec APP, jak i NOTCH. Niewykluczone więc, że zmniejszenie aktywności kompleksu γ -sekreazy, przez obniżenie poziomu funkcjonalnej preseniliny, może predysponować do rozwoju otępienia typu

niealzheimerowskiego, na skutek zaburzeń transdukcji sygnału na szlaku NOTCH lub gromadzenia substratów γ -sekreazy (Amtul i wsp. 2002). W innych przypadkach FTD zidentyfikowano nietypowe produkty transkrypcji *PSEN1*, będące wynikiem alternatywnego składania genów. Ich nieobecność u osób zdrowych, a także w innych chorobach neurodegeneracyjnych, włączając AD, chorobę Parkinsona, chorobę Huntingtona i schizofrenię sugeruje szczególny związek z degeneracją płatów czołowych. (Evin i wsp. 2002).

Modelowanie *in silico* (prowadzone przez zespół prof. S. Filipka / IIMCB), z wykorzystaniem rodopsyny bakteryjnej jako matrycy, potwierdziło patogenny charakter zmiany L226F obecnej u chorego K.M.. Pojawiająca się hydrofobowa interakcja między dwoma pierścieniami benzenowymi (Y225 i F226) znacząco zmienia powierzchnię domeny transbłonowej PS1. W ten sposób mutacja może wpływać na oddziaływanie preseniliny z białkami błonowymi kompleksu γ -sekreazy (Żekanowski i wsp. 2005, wysłane do redakcji). Co więcej, znajduje się ona w bliskim sąsiedztwie regionu odpowiedzialnego za bezpośrednie wiązanie tau i GSK-3 β z preseniliną. Zdolność jednoczesnego wiązania tau i GSK-3 β do tego samego regionu PS1 (250 aa – 298 aa), w bardzo bliskim sąsiedztwie, sugeruje, że presenilina może regulować oddziaływanie między tymi białkami. W obecności mutacji preseniliny dochodzić może do zmiany aktywności kinazy, co w efekcie prowadzić może do zaburzeń fosforylacji tau (Takashima i wsp. 1998; Gantier i wsp. 2000). W obrazie histopatologicznym mózgu pacjenta K.M. obecne było zwyrodnienie neurofibrilaryjne. Mutację w tym samym kodonie: L226R opisano wcześniej u chorego z AD, przy czym pierwsze rozpoznanie wskazywało na encefalopatię. Chory ten wykazywał znaczne deficyty zdolności motorycznych jako dziecko i kilkunastoletnią historię nadużywania środków odurzających, co mogło wpłynąć na obraz chorobowy. AD o wczesnym początku opisano u matki i siostry matki probanda,

podczas gdy u syna chorej ciotki zdiagnozowano chorobę Picka (Coleman i wsp. 2004). Taka sytuacja świadczy o przenikaniu się fenotypów klinicznych choroby Alzheimera i otępienia czołowo-skroniowego w jednej rodzinie z mutacją *PSEN1*.

W Zakładzie Badawczo-Lecznicznym Chorób zwyrodnieniowych CUN opisano dotychczas 7 mutacji *PSEN1* u osób w młodym wieku (33, 33, 36, 37, 39, 40 i 50 lat). Narastającym zaburzeniom pamięci i koncentracji uwagi towarzyszyły u nich również wybiórczo cechy „czołowe”: zaburzenia zachowania, praktyki, labilność emocjonalna, deterioracja funkcji wykonawczych, afazja, odhamowanie, a w badaniu neurologicznym: objawy deliberacyjne i pozapiramidowe, sztywność, bradykinezja, napady epilepsji oraz mioklonie. Mutacje *PSEN1* dają więc obraz choroby charakteryzujący się dużą zmiennością, obejmującą zarówno wiek zachorowania, jak i objawy początkowe, tempo progresji, towarzyszące nietypowe objawy neurologiczne oraz profil i kolejność pojawiania się zaburzeń funkcji poznawczych (obserwacja własna). Złożone korelacje między genotypem *PSEN1*, a fenotypem klinicznym potwierdza też delecja eksonu 9, związana z rodzinną postacią spastycznego porażenia kończyn dolnych (SP; ang. *spastic paraparesis*). W rodzinach z tą mutacją opisano kliniczną zmienność objawów, z obecnością przypadków o typowym obrazie AD (Brooks i wsp. 2003). Na tle obecnego stanu wiedzy pojawiają się wątpliwości: czy mutacje *PSEN1* powodują otępienie o patofizjologii innej niż AD, a tym samym stały się markerem szerszej pojętej neurodegeneracji, czy też inne czynniki modyfikują wpływ mutacji i oddziałują na kliniczną prezentację klasycznej postaci AD, nie będąc bezpośrednio zaangażowanymi w jej etiologię?

Obok zmian zachodzących na poziomie DNA, niewykluczone jest również zaburzenie mechanizmów kontroli potranskrypcyjnej lub obniżenie stabilności białka, jako przyczyny rozwoju otępienia czołowo-skroniowego w nieobecności mutacji *MAPT*.

W rodzinie HDDD2 wartość LOD score wynosi 3.68, co oznacza definitywne sprzężenie z regionem 17q21-22 (Lendon i wsp. 1998), jakkolwiek nie stwierdzono mutacji części kodującej genu *MAPT* u członków tej rodziny. U chorych nie stwierdza się też tau-immunoreaktywnych inkluzji, a poziom rozpuszczalnego białka tau jest znacznie obniżony lub niemal całkowicie zredukowany, podobnie jak w przypadkach DLDN. Przy braku wszystkich sześciu izoform białka odnotowano prawidłowe poziomy mRNA (Zhukareva i wsp. 2001, Zhukareva i wsp. 2003). Niewykluczone, że DLDN jest sporadycznym odpowiednikiem tych rodzinnych zachorowań (Liberski i wsp. 2003). Nie jest jednak oczywiste, czy konsekwencje braku prawidłowego poziomu tau mogą być porównywalne do zmian zaburzających jego fizjologiczną funkcję.

Biorąc pod uwagę fakt, że u żadnej z 45 osób cierpiących na otępienie czołowo-skroniowe, ujętych w prezentowanym badaniu, nie odnaleziono mutacji *MAPT* i wobec zacytowanych powyżej doniesień literaturowych, wskazujących na olbrzymią różnorodność zmian, które leżeć mogą u podłoża patogenezy FTD, wydaje się niezasadne wprowadzanie analizy mutacji genu *MAPT* do rutynowej diagnostyki klinicznej, czy poradnictwa genetycznego. Jednocześnie należy rozważać przeszukiwanie genu *PSENI* w kierunku mutacji, jako potencjalnego źródła zaburzeń o charakterze FTD, szczególnie u osób młodych.

5.3. Zmiany w części kodującej oraz bliskich sekwencjach intronowych genu *MAPT*

Mutacje genów sprawczych stanowią zagadnienie coraz lepiej poznane i opisane, ale odpowiadają one tylko za niewielki odsetek zachorowań. Chociaż przy obecnym stanie wiedzy wpływ polimorfizmów na zachorowanie, przebieg i rokowanie pozostaje wciąż niejasny, jest wysoce prawdopodobne, że może on wyjaśniać etiologię przypadków zachorowań nie związanych z mutacjami w genach. Polimorfizmy funkcjonalne mogą

zaburzać ekspresję i aktywność białek kodowanych przez polimorficzny gen, stanowiąc potencjalny, genetyczny czynnik ryzyka chorób złożonych. Z tego względu, podjęcie badań mających na celu wykazanie związku zmian sekwencji genu z chorobą może przyczynić się do poszerzenia wiedzy o mechanizmach patogenezy chorób neurozwyrodnieniowych, a w dalszej perspektywie stworzyć cel dla poszukiwań nowych strategii terapeutycznych nakierowanych na gen i jego produkt. Istnieją również sugestie o genetycznym uwarunkowaniu niektórych cech obrazu klinicznego. Modulujący wpływ zmian polimorficznych prowadzić może do rozwoju odmiennych, choć zbliżonych objawami jednostek chorobowych. Wiedza taka jest istotna dla diagnostyki różnicowej chorób neurozwyrodnieniowych.

Analizując sekwencję kodującą genu *MAPT* u osób z otępieniem czołowo-skroniowym odnalazłam 29 zmian polimorficznych w eksonach i bliskich sekwencjach intronowych. Tylko 8 z nich występuje niezależnie. Biorąc pod uwagę ich lokalizację oraz pojawianie się również u osób zdrowych z różną częstością w zależności od populacji (<http://www.molgen.ua.ac.be/ftdmutations>), z dużym prawdopodobieństwem można wykluczyć ich charakter sprawczy. Zmiany te mogą być jednak markerami genetycznymi mutacji przyczyniających się do powstania fenotypu chorobowego. Mogą też prowadzić do patologii na skutek interakcji z czynnikami epigenetycznymi i środowiskowymi. Wobec czego ich udział w patogenezie może być różny w zależności od populacji, a nawet rodziny, w której są identyfikowane. Ze względu jednak na liczebność grupy badanej, w połączeniu z niską częstością pojawiania się wspomnianych zmian, nie jest możliwe określenie wywieranego przez nie modyfikującego wpływu na manifestowany fenotyp chorobowy. Z tego samego powodu nie było możliwe odszukanie korelacji między pojawianiem się określonych cech fenotypowych a obecnością niezależnych zmian polimorficznych.

Pozostałe 21 polimorfizmów, odnalezionych w czasie prowadzenia badań, dziedziczy się łącznie, wchodząc w skład haplotypu *MAPT*. Odnotowano wyraźną tendencję w kierunku rozwijania się objawów pozapiramidowych u osób homozygotycznych względem H1 ($p=0.0954$). Obserwacja zgodna jest z innym doniesieniem (Baba i wsp. 2005) oraz wydaje się spójna z faktem asocjacji haplotypu H1/H1 z rozwojem PSP, którego cechą dominującą są zaburzenia ruchowe (Liberski i wsp. 2005).

W czasie prowadzonej analizy nie odnotowałam żadnej rekombinacji wewnątrz haplotypu *MAPT*, co pozostaje w zgodzie z doniesieniami literaturowymi i świadczy, że haplotypy zostały ustalone we wczesnych etapach historii populacji kaukaskiej, a zjawisko rekombinacji jest hamowane w tym obszarze lub też rekombinanty podlegają negatywnej regulacji. Dodatkowe polimorfizmy pojawiają się więc na skutek niezależnych mutacji, nie zaś mejoetycznych rearanżacji chromosomowych. W wyniku „ślizgania” polimerazy powstał polimorfizm powtórzeń dwunukleotydowych (TG) w intronie 9 (Conrad i wsp. 1997). Bezsprzecznie ustalono zwiększoną częstość występowania allelu a_0 w postaci homozygotycznej wśród chorych z PSP, wywodzących się z populacji kaukaskiej (Conrad i wsp. 1997; Conrad i wsp. 1998). Podobną zależność odnotowano dla CBD (Di Maria i wsp. 2000) i dla PD (Pastor i wsp. 2000). Doniesienia te świadczą o zaangażowaniu genu *MAPT* w rozwój patologii neurozwyrodnieniowej, przy jednoczesnym braku mutacji. Pozostaje niejasne, który specyficzny polimorfizm, czy kombinacja polimorfizmów w obrębie H1 jest odpowiedzialna za zwiększone ryzyko zachorowania. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być istnienie nierównowagi sprzężeń między polimorfizmami a sąsiadującym, istotnym funkcjonalnie regionem genomowym, bądź mutacją. Niewykluczony też jest bezpośredni wpływ haplotypu na rozwój choroby. Jako możliwą przyczynę wskazuje się udział delekcji/insercji lub innych zmian w obszarze

związanym ze składaniem genu. Coraz częściej grupy badawcze udowadniają istniejącą zależność między polimorfizmami regionu promotorowego *MAPT* a neuropatologią (Ezquerria i wsp. 1999; De Silva i wsp. 2001). Co więcej, wykazano nieznacznie silniejszą transkrypcję zachodzącą z promotora H1 (Kwok i wsp. 2004). Bardziej prawdopodobne wydaje się jednak, że zmienność w genie *MAPT* tylko moduluje wpływ innego czynnika sprawczego lub jest jego markerem, aniżeli leży u podstaw patogenezy. Sytuacja ta staje się interesująca z punktu widzenia prowadzonych przeze mnie badań, gdyż może naświetlić podłoże przypadków FTD bez wyraźnego czynnika dziedzicznego.

W badanej grupie nie odnotowano statystycznie istotnej zależności między częstością wystąpienia któregoś z genotypów *MAPT*, czy alleli H1 vs. H2, a zachorowaniem na otępienie czołowo-skroniowe (Tabela 4). Otrzymany rezultat jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi populacji angielskiej (Morris i wsp. 1999b), szwedzkiej (Ingelsson i wsp. 2001), australijskiej (Panegyres i Zafiris-Toufexis 2002) oraz amerykańskiej (Sorbido i wsp. 2003). W przypadku innych jednostek chorobowych związanych z degeneracją płatów czołowych i/lub skroniowych (choroba Picka, otępienie semantyczne, postępująca afazja) również nie ujawnia się wpływ haplotypu *MAPT* (Russ i wsp. 2001; Morris i wsp. 2002; Hughes i wsp. 2003). Nie wykazano też oddziaływania haplotypów na wiek zachorowania (Tabela 6). Odnotowano natomiast wzrost częstości występowania genotypu H1/H1 w grupie chorych bez historii rodzinnej (88.2% vs. 67%, $p=0.2362$). Różnica ta jednak nie wykazuje istotności statystycznej, być może ze względu na niewielki rozmiar analizowanych grup (Tabela 5). Podobną zależność opisał wcześniej Verpillat i wsp. (2002a). Zespół Sorbido zauważył natomiast tendencję do zwiększonej częstości pojawiania się haplotypu H2 wśród pacjentów z pozytywną historią rodzinną w porównaniu z kontrolami (36% vs. 25%, $p<0.08$) (Sorbido i wsp. 2003). Obserwacje te, mogą świadczyć o silniejszym

wpływie genotypu H1/H1, pod nieobecność innych genetycznych czynników ryzyka, charakterystycznych dla rodzin wykazujących tendencję do zachorowań. Wiek zachorowania pacjentów rodzinnych i sporadycznych jest zbliżony.

Jedyną pracą wykazującą silny związek pomiędzy genotypem H1/H1 a rozwinięciem FTD są badania prowadzone na populacji francuskiej. Porównanie grupy badanej, złożonej ze 100 niespokrewnionych pacjentów, z 79 osobową grupą kontrolną, wykazało znaczną nadreprezentację badanego genotypu u chorych (62% vs 46%; $P=0.01$) (Verpillat i wsp. 2002a). Nie można wykluczyć zafałszowania wyników obecnością w badanej grupie osób z PSP i CBD. Rok później Hughes i wsp. opisali zwiększoną częstość jedynie allelu H1, przy odnotowanej tendencji do wzrostu częstości występowania genotypu H1/H1. Do grupy badanej włączono 58 chorych i 168 osób bez cech otępienia. Rezultat wskazujący, że jedynie jedna kopia genu wystarczy do wywołania procesu patologicznego, sugerować może istnienie niezidentyfikowanej zmiany przyczynowo związanej z chorobą, ulokowanej w genie *MAPT* lub jego pobliżu i świadczy o związku badanego locus z patologią w tej właśnie populacji (Hughes i wsp. 2003).

Wcześniejsze doniesienia o charakterze negatywnym prowadzone były na mniejszych grupach chorych, dlatego przeprowadziłam łączną analizę opisanych w nich przypadków, aby zniwelować błąd wynikający z małej liczebności grupy badanej. Do metaanalizy początkowo włączyłam wyniki opublikowane w 3 pracach. Umożliwiło to ocenę rozkładu poszczególnych genotypów u 113 chorych i 150 zdrowych osób. Rozkład ten był proporcjonalnie zgodny z wynikami uzyskanymi w mojej pracy i nie wykazywał istotności statystycznej. Genotyp H1/H1 pojawiał się w moich badaniach częściej w stosunku do wyników literaturowych, zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej (odpowiednio, FTD: 75.6% vs 67.3%; kontrole: 72% vs 64%). Po włączeniu do analizy dwóch dużych prac, wskazujących na asocjację haplotypu *MAPT*

z zachorowaniem, grupa badana powiększyła się do 271 osób, a liczebność grupy kontrolnej wzrosła do 397 osób. Przy względnie zachowanej częstości występowania poszczególnych genotypów wśród chorych, w stosunku do analizy poprzedniej, obniżyła się znacznie częstość genotypu H1/H1 w grupie kontrolnej (z 64% do 55.9%), czego skutkiem stało się uzyskanie istotności statystycznej dla badanej zależności. Rezultat należy jednak interpretować z dużą ostrożnością ze względu na widoczny, zróżnicowany rozkład genotypów w samych grupach kontrolnych, co świadczy o lokalnej zmienności w dystrybucji alleli (Tabela 7). Częstość występowania genotypu H1/H1 w mojej grupie kontrolnej (72%) jest znacznie wyższa w porównaniu z badaniami francuskimi (46% u kontroli vs. 62% u osób chorych) (Verpillat i wsp. 2002a). Co ciekawe, ten sam autor w publikacji dotyczącej AD, określił częstość występowania analizowanego genotypu na 55.2% w grupie kontrolnej (Verpillat i wsp. 2002b). Również niespójne są doniesienia z dwóch grup angielskich, w których częstość H1/H1 określono na 66.3% (Morris i wsp. 1999b) oraz 53.6% (Hughes i wsp. 2003). Spośród 139 osób z populacji japońskiej, analizowanej przez zespół Conrada, 100% posiada allel H1 w postaci homozygotycznej. Wśród badanych były zarówno osoby zdrowe, jak i chorzy z PSP i AD (Conrad i wsp. 1998).

Ostatnio prowadzona analiza etniczna wykazała, że w populacji europejskiej oraz na Środkowym Wschodzie częstość allelu H2 zbliżona jest do 25%, w Azji Centralnej allel H2 pojawia się z częstością około 5%, podczas gdy w innych, badanych populacjach (Afryka, Azja Wschodnia, Ameryka Południowa – autochtoni) nie występuje w ogóle. Haplotyp H2 jest więc w zasadzie charakterystyczny wyłącznie dla populacji kaukaskiej (Evans i wsp. 2004), a jego rozpowszechnienie mogłoby wynikać z efektu założyciela lub dryftu genetycznego. Tę hipotezę osłabia jednak fakt występowania u małych naczelników wyłącznie haplotypu H2/H2, przy jednoczesnym stwierdzeniu 100% identyczności

sekwencji kodującej białko tau u szympansa, 99.5% u goryla oraz 99.0% u gibona, względem białka człowieka (Holzer i wsp. 2004). Haplotyp H2 wydaje się więc allelem pierwotnym, a haplotyp H1 ewoluował, być może, w wyniku presji selekcyjnej i stał się specyficzny wyłącznie dla gatunku Homo Sapiens. Nie wiadomo dlaczego doszło do tak znacznego rozpowszechnienia nowego haplotypu w populacjach ludzkich. Być może haplotyp ten mógł być związany z korzystnym ewolucyjnie fenotypem, którego negatywne skutki w życiu konkretnych osobników ujawniają się dopiero w wieku późniejszym. Istnieją sugestie, że utrwalanie haplotypu H1 mogłoby służyć doskonaleniu funkcji nerwowych, a możliwość neurodegeneracji byłaby ceną, jaką płaci człowiek za korzystne zmiany w powiązaniu z długością jego życia. Nie można też wykluczyć, że układ polimorfizmów skutkuje patologią dopiero w obecności określonego „tła” genetycznego. Fenomen pojawiania się mutacji patogennych dla człowieka u zwierząt, bez jednoczesnej ekspresji fenotypu chorobowego, może podkreślać wpływ innych czynników, głównie genetycznych na manifestację mutacji. Może też wynikać tylko ze znacznie krótszego czasu życia zwierząt, który nie daje możliwości kumulacji negatywnych zmian. U orangutana odnaleziono mutację R5H tau, a u szympansa E10+29, obydwie związane z wystąpieniem FTDP-17 u człowieka (Holzer i wsp. 2004; Conrad i wsp. 2004). Podobna sytuacja ma miejsce w genie α -synukleiny, gdzie szczur i zebra są nosicielami mutacji powodującej rodzinną postać choroby Parkinsona (Polymeropoulos i wsp. 1997).

Ten sam haplotyp może więc różnie wpływać w zależności od współwystępowania innych genów. Obecność haplotypu H1/H1 w jednej populacji może być niekorzystna, w innej natomiast nie mieć znaczenia. Dodatkowo na haplocyfie w pewnych populacjach mogą gromadzić się inne zmiany o charakterze patogennym, bądź to w postaci mutacji sprawczej, bądź w postaci funkcjonalnych wariantów polimorficznych. Skutkują one wydzielaniem podtypów haplotypu H1, znacznie częstszych wśród chorych (Pastor i wsp.

2004; Pittman i wsp. 2004). Również w prowadzonej przeze mnie analizie zidentyfikowano rzadkie polimorfizmy, występujące wyłącznie na haplocybie H1. Sama więc analiza klasycznego haplocybu H1 zaczyna być niewystarczająca. Tym bardziej, że rozbudowaniu uległo pojęcie haplocybu *MAPT*. Zauważono mianowicie, że sprzężenie polimorfizmów opisywane do niedawna wyłącznie w obrębie samego genu sprawczego rozciąga się na znacznie szerszym obszarze (Pastor i wsp. 2004; Pittman i wsp. 2004; Fung i wsp. 2005). H1E haplocyb (ang. *extended haplotype*) zmapowano do regionu 17q21.31 (około 1.1 Mb). Zawiera się w nim przynajmniej 9 przypuszczalnych transkryptów i 8 znanych genów. *MAPT* stanowi więc centralną część haplocybu, w skład którego wchodzi również geny kodujące inne białka zaangażowane w procesy nerwowe, takie jak wspomniane już wcześniej: *CRHR1*, *IMP5*, *WTN3* oraz *NSF* (ang. *N-ethylmaleimide-sensitive factor*), białko synaptyczne istotne dla uwalniania neurotransmiterów, którego udział sugerowany jest w rozwoju schizofrenii i epilepsji (Pastor i wsp. 2004; Pittman i wsp. 2004). Co ciekawe, objawy schizofrenii i padaczki obecne były w badanej przeze mnie grupie chorych, obok typowych cech FTD. Prace nad charakterystyką H1E odbywają się w oparciu o grupy pacjentów z PSP i CBD. W FTD nie stwierdza się bowiem tak jednoznacznego wpływu haplocybu na zachorowania. Sugerować to może odmienne mechanizmy zaangażowane w patogenezę tych schorzeń.

5.4. Inne geny zaangażowane w rozwój FTD

Poza niewielkim odsetkiem przypadków rodzinnych, w których wpływ zmutowanego genu jest dobrze udokumentowany, etiopatologia większości zachorowań jest nieznana. Zwiększona częstość występowania otępienia wśród krewnych chorych pacjentów wskazuje na istotny udział czynnika genetycznego (Knopman i wsp. 1990; Stevens i wsp. 1998). Wzór dziedziczenia często jednak nie jest wyraźny. Może to być wynikiem współwystępowania pewnej liczby genotypów związanych z podatnością

na rozwój FTD lub zmian o niepełnej penetracji. Pojedyncze czynniki ryzyka, w przypadku dziedziczenia wielogenowego, nie wystarczą do wywołania patologii. Trwają więc poszukiwania zmian DNA, które w powiązaniu z czynnikami epigenetycznymi i działaniem szeroko pojętego środowiska zwiększają prawdopodobieństwo zachorowania lub modulują przebieg choroby. Badania skupiają się na polimorfizmach innych genów, poza *MAPT*, które mogą być pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane w patogenezę. Ponieważ prowadzone przeze mnie poszukiwania mutacji przyczynowo związanej z chorobą w genie *MAPT* wykazały, że nie są one powodem zachorowań w analizowanej grupie pacjentów, postanowiłam sprawdzić wpływ innych czynników genetycznych na rozwój FTD w mojej grupie badanej.

5.4.1. Saitohina

Duże nadzieje wiązano z odkryciem w 2002 roku genu *saitohiny*. Jego lokalizacja, w intronie 9 genu *MAPT*, wskazywała na możliwy udział w neurodegeneracji z obecnością patologii tau. Doszukiwano się analogii do genu transportera acetylocholine, *VCHAT* (ang. *vesicular acetylcholine transporter*), który znajduje się w intronie genu dla acetylotransferazy cholinowej. Oba geny ulegają skoordynowanej ekspresji a funkcje ich produktów białkowych uzupełniają się. *STH* istnieje w dwóch polimorficznych wariantach: Q i R. Pierwsze doniesienie wykazywało nadreprezentację polimorfizmu R w postaci homozygotycznej u pacjentów z chorobą Alzheimera. Do badania włączono 51 chorych i 30 osób z grupy kontrolnej (Conrad i wsp. 2002). Dalsze prace bazujące na większych grupach badanych nie potwierdziły tej obserwacji (Cook i wsp. 2002; Verpillat i wsp. 2002b; Clark i wsp. 2003; Oliveira i wsp. 2003).

Analiza, którą prowadziłam wraz z innymi pracownikami Zakładu Badawczo-Leczniczego Chorób Zwyczajnych CUN na grupie 300 osób, wykazała natomiast całkowitą asocjację polimorfizmu *STH* z haplotypem genu *MAPT*. Allel Q wchodzi

w skład haplotypu H1, natomiast allel R jest składową H2 (Peplowska i wsp. 2003), (Tabela 2). Zaobserwowana zależność jest zgodna z doniesieniem Verpillat i wsp. (2002b), bazującym na badaniu grupy złożonej z 992 osób. Częstości genotypów Q/Q *STH* i H1/H1 *MAPT* są identyczne i mogą być analizowane łącznie. Niewykluczone, że właśnie polimorfizm *STH* jest jednym z funkcjonalnych elementów, mogących zwiększać ryzyko patologii w obecności innych czynników genetycznych i pozagenetycznych. W prowadzonym przeze mnie badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic we frekwencji poszczególnych alleli między grupami FTD i kontrolną (Tabela 4). Nieznaczna tendencja do zwiększenia częstości genotypu Q/Q *STH* w grupie 91 osób z FTD ($p < 0.23$), którą odnotowali Verpillat i wsp. (2002b), wynikać może z niskiej częstości genotypu H1/H1 w grupie kontrolnej, stanowiącej punkt odniesienia dla badań francuskich.

5.4.2. Apolipoproteina E

Częstość występowania poszczególnych alleli *APOE* dla populacji kaukaskiej wynosi w przybliżeniu $\epsilon 2=8\%$, $\epsilon 3=77\%$ i $\epsilon 4=15\%$ (Utermann i wsp. 1980) i nie zmienia się do późnego wieku, o czym świadczą badania prowadzone dla różnych grup wiekowych (Bednarska-Makaruk i wsp. 2001; Styczyńska i wsp. 2003). Zbliżony rozkład został otrzymany dla grupy kontrolnej włączonej do prezentowanych badań i przedstawia się odpowiednio: 5.5%, 83.5%, 11% (Tabela 8).

Wpływ *APOE* na rozwój FTD jest niejednoznaczny i dyskutowany od 1995 roku, kiedy to pojawiły się pierwsze analizy wskazujące na udział allelu $\epsilon 4$ w rozwoju choroby Picka (Farrer i wsp. 1995; Schneider i wsp. 1995). Istnieją doniesienia, oparte na obserwacji myszy transgenicznym, zgodnie z którymi zwiększony poziom ekspresji *APOE* $\epsilon 4$ koreluje ze wzrostem fosforylacji tau (Tesseur i wsp. 2000) oraz sprzyja tworzeniu filamentów (Strittmatter i wsp. 1994). Jednak udział izoform *APOE* może mieć znaczenie w rozwoju NFT w AD i tau-immunoreaktywnej patologii cytoszkieletu w PiD,

przy braku wpływu na formy FTD bez akumulacji tau. Analiza proteomiczna płynu mózgowo-rdzeniowego wskazuje na ograniczony udział apolipoproteiny E w etiopatologii FTD (Davidsson i wsp. 2002) oraz na brak korelacji allelu *APOE* $\epsilon 4$ ze znaczącym wzrostem poziomu tau w badanym materiale (Fabre i wsp. 2001). Brak analiz histopatologicznych w cytowanych badaniach uniemożliwia jednak ocenę strukturalnego podłoża patologii. Część badań populacyjnych wskazuje na wzrost ryzyka rozwinięcia FTD u nosicieli pojedynczego allelu $\epsilon 4$ (Gustafson i wsp. 1997; Fabre i wsp. 2001) inne wykazują nadreprezentację tego allelu w postaci homozygotycznej wśród chorych. Sugerowano jednocześnie, że wiek zachorowania jest niższy u pacjentów z przynajmniej jednym allelem $\epsilon 4$ i zależy od dawki genu (Stevens i wsp. 1997). Stwierdzono istotne statystycznie obniżenie wieku zachorowania, średnio o 10 lat, u nosicieli allelu $\epsilon 4$, przy niezminionej częstości badanego allelu u chorych, w stosunku do grupy kontrolnej. Na tej podstawie wysnuto wniosek, że polimorfizm *APOE* nie leży u podłoża etiologii zachorowań, ale może być czynnikiem akcelerującym procesy degeneracyjne (Minthon i wsp. 1997).

Otrzymane przeze mnie wyniki są zgodne z drugą grupą doniesień nie wykazujących istotnego związku polimorfizmu *APOE* z częstością zachorowań na FTD oraz jego wpływem na wiek i przebieg zachorowania (Pickering-Brown i wsp. 1995; Geschwind i wsp. 1998; Houlden i wsp. 1999b; Pickering-Brown i wsp. 2000b; Short i wsp. 2002; Engelborghs i wsp. 2003; Hughes i wsp. 2003; Nielsen i wsp. 2003). Szczególnie wiarygodne wydają się rezultaty otrzymane przez zespół duński, gdyż w całości oparte są na materiale pochodzącym z autopsji (49 osób). W prowadzonych przeze mnie badaniach da się zauważyć jedynie tendencję do zwiększenia częstości genotypu *APOE* $\epsilon 4/4$ w postaci homozygotycznej u pacjentów z FTD ($p=0.0539$). Jednak mała liczba homozygot nie pozwala wiarygodnie ocenić ryzyka, jakie niesie ze sobą

wystąpienie tego genotypu. Są to zaledwie 3 przypadki, u których rozpoznanie nie zostało potwierdzone badaniem histopatologicznym. W zasadzie wszystkie badania (z wyjątkiem prac zespołu Pickering-Brown) prowadzone były na stosunkowo mało licznych grupach chorych (od 25 do 50), w stosunku do wymogów analiz statystycznych, czym można próbować tłumaczyć rozbieżność wyników. Istotnym elementem są też kryteria, według których komponowane były grupy badane. Brak analizy histopatologicznej uniemożliwiało postawienie pewnego rozpoznania otępienia czołowo-skroniowego i uniknięcia włączenia do badań nietypowych przypadków AD.

Wpływ genotypu *APOE* na rozwój otępienia wynikającego z degeneracji płątów czołowych i skroniowych odnotowywano głównie we wcześniejszych badaniach, w których najprawdopodobniej nie separowano pacjentów ze względu na prezentację kliniczną. Rosso i wsp. (2002b) sugerują, że zwiększona częstość allelu $\epsilon 4$ wiąże się z dominującą atrofią części skroniowej mózgu, związanej z artykulacją i rozumieniem mowy. Badacze, z grupy 98 pacjentów z FTD, wyodrębnili 31 osób z atrofią skroniową widoczną w obrazie CT. Dziewięcioro z nich całkowicie spełniało kryteria dla otępienia semantycznego, u 4 obserwowano nasilone problemy w rozumieniu języka, 18 wykazywało głównie redukcję mowy spontanicznej i trudności w odnajdywaniu słów. Częstość allelu $\epsilon 4$ u tych chorych była niezmiernie wysoka i wynosiła 29%, w porównaniu z grupą kontrolną, 15.3%, podczas gdy u osób z zanikami czołowo-skroniowymi lub czołowymi wynosiła zaledwie 18.7% (Rosso i wsp. 2002b). Wzrost częstości tego allelu u chorych z otępieniem semantycznym odnotowała równocześnie inna grupa badawcza (Short i wsp. 2002). Wpływ polimorfizmu *APOE* na rejonizację zmian degeneracyjnych był już wcześniej obserwowany u pacjentów z chorobą Alzheimera (Geroldi i wsp. 1999). Nie wykluczone więc, że $\epsilon 4$ może modyfikować kliniczną prezentację przez wzmacnianie

specyficznego działania czynników neurodegeneracyjnych na określone obszary mózgu (Boccardi i wsp. 2004).

Osoby z otępieniem semantycznym i postępująca afazją bez płynności mowy nie były włączone do analizowanej przeze mnie grupy, a więc niewielki udział chorych z atrofią skroniową w obrazie CT uniemożliwia badanie sugerowanej zależności.

Niewykluczone również, że allel $\epsilon 4$ może tylko w obecności jednoczesnej kumulacji innych czynników genetycznych i środowiskowych predysponować do rozwoju FTD, czy przyspieszać procesy degeneracji. Stąd też u chorych z historią rodzinną można odnotować wzrost jego częstości, przynajmniej w niektórych populacjach. Taka sytuacja zaistniała w prowadzonej przeze mnie analizie ($p=0.0041$) (Tabela 9). Podobne zjawisko miało miejsce w czasie analizy częstości genotypu $\epsilon 4/4$ u chorych z AD. W badanej w Zakładzie Badawczo-Lecznym Chorób Zwyrodnieniowych CUN grupie 41 pacjentów z rodzinną postacią choroby Alzheimera o wczesnym początku tylko u 7 pacjentów zidentyfikowano mutacje przyczynowo związane z chorobą i co ciekawe, żaden z nosicieli mutacji nie posiadał jednocześnie allelu *APOE* $\epsilon 4$. Natomiast u pozostałych 34 osób allel pojawiał się prawie dwukrotnie częściej niż w grupie kontrolnej (0.19 vs 0.1; $p=0.2$) (Żekanowski i wsp. 2003b).

Wpływ polimorfizmu *APOE* jest ograniczony jednak do pewnych grup etnicznych. Przyjmuje się, iż w ewolucji allel $\epsilon 4$ był pierwotną formą genu, natomiast odmiany polimorficzne pojawiły się w wyniku mutacji znacznie później – allel $\epsilon 3$ około 300 000 lat temu, natomiast allel $\epsilon 2$ około 200 000 lat temu (Fullerton i wsp. 2000). Do chwili obecnej w niektórych populacjach wariant *APOE* $\epsilon 4$ występuje znacznie częściej: u Pigmejów jego częstość wynosi 0.407 (Zekraoui i wsp. 1997), u Aborygenów 0.26 (Kamboh i wsp. 1991), u rdzennych mieszkańców Ameryki 0.28 (Scacchi i wsp. 1997). Znacznie rzadziej allel ten stwierdza się w krajach śródziemnomorskich. U mieszkańców Sardynii jego częstość jest

najniższa w Europie i wynosi 0.052 (Corbo i wsp. 1999a). Obserwacje te nasunęły hipotezę, iż allel $\epsilon 4$ spełniał rolę wariantu ochronnego, ułatwiającego przeżycie w trudnych warunkach (Corbo i Scacchi 1999b). Wraz z wydłużeniem średniej długości życia człowieka ujawniło się niekorzystne jego działanie, przyczyniające się do nasilenia zmian miażdżycowych i rozwoju choroby Alzheimera. Różnice etniczne utrudniają ocenę wpływu polimorfizmu *APOE*, gdyż w różnych populacjach jego wpływ na zachorowanie nie musi być tak samo wyrażony.

50% chorych na FTD ma wśród krewnych pierwszego stopnia osoby wykazujące cechy otępienia (Knopman i wsp. 1990), co świadczy o znaczącym udziale czynników dziedzicznych w rozwoju tego zespołu. Prawdopodobne, że dopiero współwystępowanie kilku lub kilkunastu polimorfizmów w różnych genach zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania. Ingelson i wsp. (2001) odnotowali, że jednoczesne wystąpienie haplotypu H1/H1 i *APOE* $\epsilon 4$ w sposób istotny statystycznie zwiększa prawdopodobieństwo rozwinięcia otępienia czołowo-skroniowego ($p=0.006$). Wpływ ten nie został potwierdzony przez żadną inną grupę badaczy (Short i wsp. 2002; Hughes i wsp. 2003). Również prowadzone przeze mnie badania nie przyniosły pozytywnych korelacji tych czynników (Tabela 10). Co więcej, grupa francuska wskazała na allel $\epsilon 2$, jako potencjalny czynnik zwiększający ryzyko zachorowania, przy jednoczesnym wystąpieniu genotypu H1/H1 *MAPT* ($p=0.03$). W czasie analizy porównywano 100 osób z FTD w stosunku do 79-osobowej grupy kontrolnej (Verpillat i wsp. 2002a). Otrzymana zależność była zgodna z wcześniejszym doniesieniem opracowanym w oparciu o mało liczną grupę 11 chorych ($p=0.0007$) (Lechmann i wsp. 2000) oraz badaniami, w których wprowadzenie nie odnotowano statystycznie istotnej zależności, ale wskazano na tendencję do zwiększenia częstości tego allelu w grupie osób chorych (Gustawson i wsp. 1997; Engelborghs i wsp. 2003). W prowadzonych przeze mnie badaniach również zauważalne

jest częstsze jednoczesne występowanie allelu $\epsilon 2$ i genotypu H1/H1 *MAPT* u chorych w stosunku do grupy kontrolnej, jednak pozbawione istotności statystycznej (0.571 vs 0.364; $p=0.2329$) (Tabela 10). Wśród 148 osób, włączonych do prezentowanej analizy, nikt nie posiadał genotypu *APOE* $\epsilon 2/2$.

Zespół francuski przygotował metaanalizę w oparciu o 10 publikacji. Analiza obejmująca 364 osoby z FTD i 2671 kontroli wykazała znaczący statystycznie wzrost częstości allelu $\epsilon 2$ w grupie chorych (0.102 vs 0.078; $p=0.014$), jednocześnie wykluczyła allel $\epsilon 4$ jako czynnik ryzyka (Verpillat i wsp. 2002c). Istotność statystyczną uzyskano jednak dopiero po włączeniu do metaanalizy 3 prac, z których dwie sygnowane były przez ten sam zespół badawczy i co prawdopodobne, przynajmniej w części oparte na tej samej grupie badanej. Do interpretacji wyników metaanalizy należy podejść z dużą ostrożnością również ze względu na niezwykle rzadkie występowanie genotypu $\epsilon 2/2$ (4 osoby na 228 osób z FTD i 16 na 2607 osób z grupy kontrolnej) oraz allelu $\epsilon 2$ (74 allele na łączną sumę 728 alleli). Przy tak niskiej częstości badanych czynników nie można wykluczyć błędów statystycznych. Tym bardziej, że w takiej sytuacji, nawet pojedyncze błędnie zdiagnozowane przypadki mogą wpływać na wynik analizy. Nie mniej wyszczególnienie z metaanalizy zachorowań potwierdzonych badaniami histopatologicznymi podtrzymuje istnienie tej zależności (Verpillat i wsp. 2002c). Rola formy polimorficznej $\epsilon 2$ nie jest wyjaśniona. Dotychczas analizowano jej wpływ w odniesieniu do choroby Alzheimera. W powszechnej opinii uważana jest ona za protektora rozwoju tego schorzenia. Równocześnie istnieją prace wskazujące, iż obecność allelu $\epsilon 2$ może być niekorzystnym czynnikiem dla postaci AD o wczesnym początku (Van Duijn i wsp. 1995; Styczyńska i wsp. 2001). Stwierdzono jednocześnie częstsze występowanie tego wariantu u osób z chorobą Alzheimera wśród Afroamerykanów i Hiszpanów pochodzenia innego niż kaukaskie (Maestre i wsp. 1995). Przypadki FTD nie są jeszcze tak wnikliwie

analizowane w literaturze światowej, dlatego odwołałam się do badań nad chorobą Alzheimera, które wskazywać mogą na zróżnicowany udział poszczególnych alleli *APOE* w zależności od innych współwystępujących czynników genetycznych. Podobnie jak ma to miejsce w przypadku haplotypu *MAPT*.

Ponieważ obecność określonych alleli *APOE*, *STH*, czy haplotypu *MAPT* nie jest warunkiem wystarczającym, ani koniecznym do rozwinięcia otępienia czołowo-skroniowego, nie są to markery użyteczne w diagnostyce klinicznej oraz nie powinny być wykorzystywane w poradnictwie genetycznym. Tym bardziej, że ich rozkład jest zróżnicowany w zależności od analizowanej populacji. Badanie wpływu tych czynników powinno być jednak kontynuowane ze względu na znaczną wartość poznawczą. Słuszne wydaje się również podjęcie analizy funkcjonalnej identyfikowanych zmian.

6. WNIOSKI

Przedstawione w pracy wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Mutacje *MAPT* nie są częstą przyczyną otępienia czołowo-skroniowego wśród polskich chorych.
2. Duża część polimorfizmów genu *MAPT* istnieje w całkowitej nierównowadze sprzężeń, tworząc nie podlegający rekombinacji haplotyp.
3. Częścią haplotypu *MAPT* jest polimorfizm genu *saitohiny*.
4. Formy polimorficzne mogą znajdować odbicie w przebiegu klinicznym choroby. Postać homozygotyczna haplotypu H1 stanowi czynnik ryzyka wystąpienia zespołu pozapiramidowego u chorych z FTD.
5. Haplotyp *MAPT* oraz polimorfizm *APOE* nie stanowią w sposób jednoznaczny genetycznych czynników ryzyka rozwoju choroby. Odmienny rozkład tych alleli w przypadkach rodzinnych i sporadycznych sugeruje jednak ich złożony udział w patogenezie FTD. Niewykluczony jest synergistyczny wpływ alleli *APOE* i genotypu *MAPT* na zachorowanie.
6. Zróżnicowana częstość występowania alleli badanych genów nie tylko między grupami etnicznymi, ale także w bliskich sobie rejonach geograficznych, świadczyć może o odmiennym wpływie poszczególnych markerów w zależności od innych współwystępujących czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych
7. Przeszukiwanie genu *MAPT* w kierunku mutacji nie jest uzasadnione w praktyce klinicznej. Polimorfizmy *MAPT*, *APOE* i *STH* nie są markerami użytecznymi w diagnostyce klinicznej oraz nie powinny być wykorzystywane w poradnictwie genetycznym.

7. PIŚMIENICTWO

1. AD Mutation Database <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/>.
2. Amtul Z, Lewis PA, Piper S, Crook R, Baker M, Findlay K, Singleton A, Hogg M, Younkin L, Younkin SG, Hardy J, Hutton M, Boeve BF, Tang-Wai D, Golde TE. A presenilin 1 mutation associated with familial frontotemporal dementia inhibits gamma-secretase cleavage of APP and notch. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 269-73.
3. Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992; 31: 10626-10633.
4. Arima K, Kowalska A, Hasegawa M, Mukoyama M, Watanabe R, Kawai M, Takahashi K, Iwatsubo T, Tabira T, Sunohara N. Two brothers with frontotemporal dementia and parkinsonism with an N279K mutation of the tau gene. *Neurology* 2000; 54: 1787-1795.
5. Ashworth A, Lloyd S, Brown J, Gydesen S, Sorensen SA, Brun A, Englund E, Humphreys C, Housman D, Badura M, Stanton V Jr, Taylor K, Cameron J, Munroe D, Johansson J, Rossor M, Fisher EM, Collinge J. Molecular genetic characterisation of frontotemporal dementia on chromosome 3. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 10 Suppl 1: 93-101.
6. Baba Y, Tsuboi Y, Baker MC, Uitti RJ, Hutton ML, Dickson DW, Farrer M, Putzke JD, Woodruff BK, Ghetti B, Murrell JR, Boeve BF, Petersen RC, Verpillat P, Brice A, Delisle MB, Rascol O, Arima K, Dysken MW, Yasuda M, Kobayashi T, Sunohara N, Komure O, Kuno S, Sperfeld AD, Stoppe G, Kohlhase J, Pickering-Brown S, Neary D, Bugiani O, Wszolek ZK. The Effect of tau genotype on clinical features in FTDP-17. *Parkinsonism Relat Disord* 2005; 11: 205-8.
7. Baker M, Litvan I, Houlden H, Adamson J, Dickson D, Perez-Tur J, Hardy J, Lynch T, Bigio E, Hutton M. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 711-715.
8. Baudier J, Cole RD. Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem* 1987; 262: 17577-17583.
9. Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnicka-Worms H, Mandelkow E. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 1993; 336: 417-424.
10. Bednarska-Makaruk M, Broda G, Kurjata P, Rodo M, Roszczyńko M, Rywik S, Wehr H. Apolipoprotein E genotype, lipid levels and coronary heart disease in a Polish population group. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 789-792.
11. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 1993; 11: 153-163.
12. Binetti G, Nicosia F, Benussi L, Ghidoni R, Feudatari E, Barbiero L, Signorini S, Villa A, Mattioli F, Zanetti O, Alberici A. Prevalence of TAU mutations in an Italian clinical series of familial frontotemporal patients. *Neurosci Lett* 2003; 338: 85-87.
13. Bird TD, Nochlin D, Poorkaj P, Cherrier M, Kaye J, Payami H, Peskind E, Lampe TH, Nemens E, Boyer PJ, Schellenberg GD. Clinical pathological comparison of

- three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain* 1999; 122: 741-756.
14. Bird TD, Wijsman EM, Nochlin D, Leehey M, Sumi SM, Payami H, Poorkaj P, Nemens E, Rafkind M, Schellenberg GD. Chromosome 17 and hereditary dementia: linkage studies in three non-Alzheimer families and kindreds with late-onset FAD. *Neurology* 1997; 48: 949-954.
 15. Boccardi M, Sabattoli F, Testa C, Beltramello A, Soininen H, Frisoni GB. APOE and modulation of Alzheimer's and frontotemporal dementia. *Neurosci Lett* 2004; 356: 167-170.
 16. Brandt R, Leger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 1995; 131: 1327-1340.
 17. Brooks WS, Kwok JB, Kril JJ, Broe GA, Blumbergs PC, Tannenberg AE, Lamont PJ, Hedges P, Schofield PR. Alzheimer's disease with spastic paraparesis and 'cotton wool' plaques: two pedigrees with PS-1 exon 9 deletions. *Brain* 2003; 126: 783-791.
 18. Brown J, Ashworth A, Gydesen S, Sorensen A, Rossor M, Hardy J, Collinge J. Familial non-specific dementia maps to chromosome 3. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1625-1628.
 19. Brown J, Gydesen S, Johannsen P, Gade A, Skibinski G, Chakrabarti L, Brun A, Spillantini M, Yancopoulou D, Thusgaard T, Sorensen A, Fisher E, Collinge J; FReJA (Frontotemporal Dementia Research in Jutland Association). Frontotemporal dementia linked to chromosome 3. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 17: 274-276.
 20. Brown J. Chromosome 3-linked frontotemporal dementia. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 925-927.
 21. Brun A. Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. I. Neuropathology. *Arch Gerontol Geriatr* 1987; 6: 193-208.
 22. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 33: 95-130.
 23. Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G, Tabaton M, Morbin M, Primavera A, Carella F, Solaro C, Grisoli M, Savoardo M, Spillantini MG, Tagliavini F, Goedert M, Ghetti B. Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 667-677.
 24. Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P. Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci* 1998; 18: 7061-7074.
 25. Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA. Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 1984; 66: 305-311.
 26. Chapman J, Estupinan J, Asherov A, Goldfarb LG. A simple and efficient method for apolipoprotein E genotype determination. *Neurology* 1996; 46: 1484-1485.
 27. Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 1992; 360: 674-677.

28. Chow TW, Miller BL, Hayashi VN, Geschwind DH. Inheritance of frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 1999; 56: 817-822.
29. Clark LN, Levy G, Tang MX, Mejia-Santana H, Ciappa A, Tycko B, Cote LJ, Louis ED, Mayeux R, Marder K. The Saitohin 'Q7R' polymorphism and tau haplotype in multi-ethnic Alzheimer disease and Parkinson's disease cohorts. *Neurosci Lett* 2003; 347: 17-20.
30. Clark LN, Poorkaj P, Wszolek Z, Geschwind DH, Nasreddine ZS, Miller B, Li D, Payami H, Awert F, Markopoulou K, Andreadis A, D'Souza I, Lee VM, Reed L, Trojanowski JQ, Zhukareva V, Bird T, Schellenberg G, Wilhelmsen KC. Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13103-13107.
31. Coleman P, Kurlan R, Crook R, Werner J, Hardy J. A new presenilin Alzheimer's disease case confirms the helical alignment of pathogenic mutations in transmembrane domain 5. *Neurosci Lett* 2004; 364: 139-140.
32. Conrad C, Amano N, Andreadis A, Xia Y, Namekataf K, Oyama F, Ikeda K, Wakabayashi K, Takahashi H, Thal LJ, Katzman R, Shackelford DA, Matsushita M, Masliah E, Sawa A. Differences in a dinucleotide repeat polymorphism in the tau gene between Caucasian and Japanese populations: implication for progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 1998; 250: 135-137.
33. Conrad C, Andreadis A, Trojanowski JQ, Dickson DW, Kang D, Chen X, Wiederholt W, Hansen L, Masliah E, Thal LJ, Katzman R, Xia Y, Saitoh T. Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 1997; 41: 277-281.
34. Conrad C, Vianna C, Freeman M, Davies P. A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7751-7756.
35. Conrad C, Vianna C, Schultz C, Thal DR, Ghebremedhin E, Lenz J, Braak H, Davies P. Molecular evolution and genetics of the Saitohin gene and tau haplotype in Alzheimer's disease and argyrophilic grain disease. *J Neurochem* 2004; 89: 179-188.
36. Cook L, Brayne CE, Easton D, Evans JG, Xuereb J, Cairns NJ, Rubinsztein DC. No evidence for an association between Saitohin Q7R polymorphism and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002; 52: 690-691.
37. Corbo RM, Scacchi R, Mureddu L, Mulas G, Castrechini S, Rivasi AP. Apolipoprotein B, apolipoprotein E, and angiotensin-converting enzyme polymorphisms in 2 Italian populations at different risk for coronary artery disease and comparison of allele frequencies among European populations. *Hum Biol* 1999a; 71: 933-945.
38. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet* 1999b; 63: 301-310.
39. Correas I, Padilla R, Avila J. The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* 1990; 269: 61-64.

40. Cruts M, Rademakers R, Gijselinck I, van der Zee J, Dermaut B, De Pooter T, De Rijk P, Del-Favero J, Van Broeckhoven C. Genomic architecture of human 17q21 linked to frontotemporal dementia uncovers a highly homologous family of low copy repeats in the tau region. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1753-1762.
41. Curcio SA, Kawarai T, Paterson AD, Maletta RG, Puccio G, Perri M, Di Natale M, Palermo S, Foncin JF, Hyslop PH, Bruni AC. A large Calabrian kindred segregating frontotemporal dementia. *J Neurol* 2002; 249: 911-922.
42. Davidsson P, Sjogren M, Andreasen N, Lindbjer M, Nilsson CL, Westman-Brinkmalm A, Blennow K. Studies of the pathophysiological mechanisms in frontotemporal dementia by proteome analysis of CSF proteins. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 109: 128-133.
43. de Silva R, Hardy J, Crook J, Khan N, Graham EA, Morris CM, Wood NW, Lees AJ. The tau locus is not significantly associated with pathologically confirmed sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2002; 330: 201-203.
44. de Silva R, Weiler M, Morris HR, Martin ER, Wood NW, Lees AJ. Strong association of a novel Tau promoter haplotype in progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 2001; 311: 145-148.
45. Delisle MB, Murrell JR, Richardson R, Trofatter JA, Rascol O, Soulagés X, Mohr M, Calvas P, Ghetti B. A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 98: 62-77.
46. Dermaut B, Kumar-Singh S, Engelborghs S, Theuns J, Rademakers R, Saerens J, Pickut BA, Peeters K, van den Broeck M, Vennekens K, Claes S, Cruts M, Cras P, Martin JJ, Van Broeckhoven C, De Deyn PP. A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques. *Ann Neurol* 2004; 55: 617-626.
47. Di Maria E, Tabaton M, Vigo T, Abbruzzese G, Bellone E, Donati C, Frasson E, Marchese R, Montagna P, Munoz DG, Pramstaller PP, Zanusso G, Ajmar F, Mandich P. Corticobasal degeneration shares a common genetic background with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2000; 47: 374-377.
48. Drewes G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 1997; 89: 297-308.
49. Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J* 1992; 11: 2131-2138.
50. D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 5598-5603.
51. D'Souza I, Schellenberg GD. Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 2000; 275: 17700-17709.
52. Dumanchin C, Camuzat A, Champion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, Saugier-Verber P, Martin C, Penet C, Charbonnier F, Agid Y, Frebourg T, Brice A.

- Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1825-1829.
53. Ebner A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 1998; 143: 777-794.
 54. Engelborghs S, Dermaut B, Goeman J, Saerens J, Marien P, Pickut BA, Van den Broeck M, Serneels S, Cruts M, Van Broeckhoven C, De Deyn PP. Prospective Belgian study of neurodegenerative and vascular dementia: APOE genotype effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 1148-1151.
 55. Evans W, Fung HC, Steele J, Eerola J, Tienari P, Pittman A, Silva R, Myers A, Vrieze FW, Singleton A, Hardy J. The tau H2 haplotype is almost exclusively Caucasian in origin. *Neurosci Lett* 2004; 369: 183-185.
 56. Evin G, Smith MJ, Tziotis A, McLean C, Canterford L, Sharples RA, Cappai R, Weidemann A, Beyreuther K, Cotton RG, Masters CL, Culvenor JG. Alternative transcripts of presenilin-1 associated with frontotemporal dementia. *Neuroreport* 2002; 13: 917-921.
 57. Ezquerra M, Pastor P, Valdeoriola F, Molinuevo JL, Blesa R, Tolosa E, Oliva R. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the tau gene highly associated to progressive supranuclear palsy in humans. *Neurosci Lett* 1999; 275: 183-186.
 58. Fabre SF, Forsell C, Viitanen M, Sjogren M, Wallin A, Blennow K, Blomberg M, Andersen C, Wahlund LO, Lannfelt L. Clinic-based cases with frontotemporal dementia show increased cerebrospinal fluid tau and high apolipoprotein E epsilon4 frequency, but no tau gene mutations. *Exp Neurol* 2001; 168: 413-418.
 59. Farrer LA, Abraham CR, Volicer L, Foley EJ, Kowall NW, McKee AC, Wells JM. Allele epsilon 4 of apolipoprotein E shows a dose effect on age at onset of Pick disease. *Exp Neurol*. 1995 Dec;136(2):162-70.
 60. Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem* 2000; 75: 624-633.
 61. Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. *Ann Neurol* 1997; 41: 706-715.
 62. Froelich S, Basun H, Forsell C, Lilius L, Axelman K, Andreadis A, Lannfelt L. Mapping of a disease locus for familial rapidly progressive frontotemporal dementia to chromosome 17q12-21. *Am J Med Genet* 1997; 74: 380-385.
 63. FTD Mutation Database <http://www.molgen.ua.ac.be/ftdmutations>
 64. Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengard JH, Salomaa V, Vartiainen E, Perola M, Boerwinkle E, Sing CF. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 881-900.

65. Fung HC, Evans J, Evans W, Duckworth J, Pittman A, de Silva R, Myers A, Hardy J. The architecture of the tau haplotype block in different ethnicities. *Neurosci Lett* 2005; 377: 81-84.
66. Gantier R, Gilbert D, Dumanchin C, Champion D, Davoust D, Toma F, Frebourg T. The pathogenic L392V mutation of presenilin 1 decreases the affinity to glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 2000; 283: 217-220.
67. Gao QS, Memmott J, Lafyatis R, Stamm S, Sreaton G, Andreadis A. Complex regulation of tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia. *J Neurochem* 2000; 74: 490-500.
68. GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
69. George AE, de Leon MJ, Stylopoulos LA, Miller J, Kluger A, Smith G, et al. CT diagnostic features of Alzheimer disease: importance of the choroidal/hippocampal fissure complex. *Am J Neuroradiol* 1990; 11: 101-107.
70. Geroldi C, Pihlajamaki M, Laakso MP, DeCarli C, Beltramello A, Bianchetti A, Soininen H, Trabucchi M, Frisoni GB. APOE-epsilon4 is associated with less frontal and more medial temporal lobe atrophy in AD. *Neurology* 1999; 53: 1825-1832.
71. Geschwind D, Karrim J, Nelson SF, Miller B. The apolipoprotein E epsilon4 allele is not a significant risk factor for frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998; 44: 134-138.
72. Ghetti B, Hutton M, Wszolek ZK. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 associated with tau gene mutations (FTDP-17), w: Dickson DW, ed. *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*, International Society of Neuropathology Press 2003, Basel, Switzerland, 86-102.
73. Giaccone G, Rossi G, Di Fede G, Marcon G, Farina L, Sacco L, Tagliavini F. Familial Frontotemporal dementia is associated with the novel Tau mutation T427M. *Neurobiology of Aging* 2004; 25: 449.
74. Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 1997; 409: 57-62.
75. Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA, Chen SG, Parchi P, Tabaton M, Lanska DJ, Markesbery WR, Wilhelmsen KC, Dickson DW, Petersen RB, Gambetti P. Tau gene mutation in familial progressive subcortical gliosis. *Nat Med* 1999; 5: 454-457.
76. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989b; 3: 519-526.
77. Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 1989a; 8: 393-399.
78. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4051-4055.

79. Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 353-365.
80. Goode BL, Feinstein SC. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 1994; 124: 769-782.
81. Gregory CA, Hodges JR. Clinical features of frontal lobe dementia in comparison to Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 1996; 47: 103-123.
82. Grover A, DeTure M, Yen SH, Hutton M. Effects on splicing and protein function of three mutations in codon N296 of tau in vitro. *Neurosci Lett* 2002; 323: 33-36.
83. Grover A, England E, Baker M, Sahara N, Adamson J, Granger B, Houlden H, Passant U, Yen SH, DeTure M, Hutton M. A novel tau mutation in exon 9 (1260V) causes a four-repeat tauopathy. *Exp Neurol* 2003; 184: 131-140.
84. Grover A, Houlden H, Baker M, Adamson J, Lewis J, Prihar G, Pickering-Brown S, Duff K, Hutton M. 5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10. *J Biol Chem* 1999; 274: 15134-15143.
85. Gustafson L, Abrahamson M, Grubb A, Nilsson K, Fex G. Apolipoprotein-E genotyping in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1997; 8: 240-243.
86. Gydesen S, Brown JM, Brun A, Chakrabarti L, Gade A, Johannsen P, Rossor M, Thusgaard T, Grove A, Yancopoulos D, Spillantini MG, Fisher EM, Collinge J, Sorensen SA. Chromosome 3 linked frontotemporal dementia (FTD-3). *Neurology* 2002; 59: 1585-1594.
87. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 1992; 147: 58-62.
88. Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 1998; 437: 207-210.
89. Hasegawa M, Smith MJ, Iijima M, Tabira T, Goedert M. FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett* 1999; 443: 93-96.
90. Hayashi S, Toyoshima Y, Hasegawa M, Umeda Y, Wakabayashi K, Tokiguchi S, Iwatsubo ., Takahashi H. Late-onset frontotemporal dementia with a novel exon 1 (Arg5His) tau gene mutation. *Ann Neurol* 2002; 51: 525-530.
91. Heutink P, Stevens M, Rizzu P, Bakker E, Kros JM, Tibben A, Niermeijer MF, van Duijn CM, Oostra BA, van Swieten JC. Hereditary frontotemporal dementia is linked to chromosome 17q21-q22: a genetic and clinicopathological study of three Dutch families. *Ann Neurol* 1997; 41: 150-159.
92. Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW Jr. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1381-1388.

93. Hogg M, Grujic ZM, Baker M, Demirci S, Guillozet AL, Sweet AP, Herzog LL, Weintraub S, Mesulam MM, LaPointe NE, Gamblin TC, Berry RW, Binder LI, de Silva R, Lees A, Espinoza M, Davies P, Grover A, Sahara N, Ishizawa T, Dickson D, Yen SH, Hutton M, Bigio EH. The L266V tau mutation is associated with frontotemporal dementia and Pick-like 3R and 4R tauopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 2003; 106: 323-336.
94. Holzer M, Craxton M, Jakes R, Arendt T, Goedert M. Tau gene (MAPT) sequence variation among primates. *Gene* 2004; 341: 313-322.
95. Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee VM. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 1998; 282: 1914-1917.
96. Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, Daube JR, Nance M, Fan C, Kaplan J, Hung WY, McKenna-Yasek D, Haines JL, Pericak-Vance MA, Horvitz HR, Brown RH Jr. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA* 2000; 284: 1664-1669.
97. Houlden H, Baker M, Adamson J, Grover A, Waring S, Dickson D, Lynch T, Boeve B, Petersen RC, Pickering-Brown S, Owen F, Neary D, Craufurd D, Snowden J, Mann D, Hutton M. Frequency of tau mutations in three series of non-Alzheimer's degenerative dementia. *Ann Neurol* 1999a; 46: 243-248.
98. Houlden H, Rizzu P, Stevens M, de Knijff P, van Duijn CM, van Swieten JC, Heutink P, Perez-Tur J, Thomas V, Baker M, Morris H, Rossor M, Janssen JC, Petersen RC, Dodd P, Dark F, Boeve B, Dickson D, Davies P, Pickering-Brown S, Mann D, Adamson J, Lynch T, Payami H, Hardy J, et al. Apolipoprotein E genotype does not affect the age of onset of dementia in families with defined tau mutations. *Neurosci Lett* 1999b; 260: 193-195.
99. Hughes A, Mann D, Pickering-Brown S. Tau haplotype frequency in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2003; 181: 12-16.
100. Hulette CM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Schmechel DE, Yamaoka LH, Gaskell PC, Welsh-Bohmer KA, Crowther RA, Spillantini MG. Neuropathological features of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17q21-22 (FTDP-17): Duke Family 1684. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 859-866.
101. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Heutink P. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393: 702-705.
102. Hutton M. Presenilin mutations associated with fronto-temporal dementia. *Ann Neurol* 2004; 55: 604-606.
103. Hwang SC, Jhon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG. Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 1996; 271: 18342-18349.

104. Iijima M, Tabira T, Poorkaj P, Schellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee VM, Schmidt ML, Takahashi K, Nabika T, Matsumoto T, Yamashita Y, Yoshioka S, Ishino H. A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene. *Neuroreport* 1999; 10: 497-501.
105. Ikeda M, Ishikawa T, Tanabe H. Epidemiology of frontotemporal lobar degeneration. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004; 17: 265-268.
106. Ingelsson M, Fabre SF, Lilius L, Andersen C, Viitanen M, Almkvist O, Wahlund LO, Lannfelt L. Increased risk for frontotemporal dementia through interaction between tau polymorphisms and apolipoprotein E epsilon4. *Neuroreport* 2001; 12: 905-909.
107. Iseki E, Matsumura T, Marui W, Hino H, Odawara T, Sugiyama N, Suzuki K, Sawada H, Arai T, Kosaka K. Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel N296H mutation in exon 10 of the tau gene and a widespread tau accumulation in the glial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; 102: 285-292.
108. Janssen JC, Warrington EK, Morris HR, Lantos P, Brown, Revesz T, Wood N, Khan MN, Cipolotti L, Fox NC, Rossor MN. Clinical features of frontotemporal dementia due to the intronic tau 10(+16) mutation. *Neurology* 2002; 58: 1161-1168.
109. Johnson GV, Bailey CD. Tau, where are we now? *J Alzheimers Dis* 2002; 4: 375-398.
110. Kamboh MI, Serjeantson SW, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. XVIII. Apolipoprotein polymorphisms in Australian Aborigines. *Hum Biol* 1991; 63: 179-186.
111. Kertesz A, Kawarai T, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Poorkaj P, Bird TD, Munoz DG. Familial frontotemporal dementia with ubiquitin-positive, tau-negative inclusions. *Neurology* 2000; 54: 818-827.
112. Knopman DS, Mastri AR, Frey WH 2nd, Sung JH, Rustan T. Dementia lacking distinctive histologic features: a common non-Alzheimer degenerative dementia. *Neurology* 1990; 40: 251-256.
113. Kobayashi T, Ota S, Tanaka K, Ito Y, Hasegawa M, Umeda Y, Motoi Y, Takanashi M, Yasuhara M, Anno M, Mizuno Y, Mori H. A novel L266V mutation of the tau gene causes frontotemporal dementia with a unique tau pathology. *Ann Neurol* 2003; 53: 133-137.
114. Kodama K, Okada S, Iseki E, Kowalska A, Tabira T, Hosoi N, Yamanouchi N, Noda S, Komatsu N, Nakazato M, Kumakiri C, Yazaki M, Sato T. Familial frontotemporal dementia with a P301L tau mutation in Japan. *J Neurol Sci* 2000; 176: 57-64.
115. Kovach MJ, Waggoner B, Leal SM, Gelber D, Khardori R, Levenstien MA, Shanks CA, Gregg G, Al-Lozi MT, Miller T, Rakowicz W, Lopate G, Florence J, Glosser G, Simmons Z, Morris JC, Whyte MP, Pestronk A, Kimonis VE. Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3-p12 of a unique dominant disorder in four families: hereditary inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia. *Mol Genet Metab* 2001; 74: 458-475.
116. Kovari E, Leuba G, Savioz A, Saini K, Anastasiu R, Miklossy J, Bouras C. Familial frontotemporal dementia with ubiquitin inclusion bodies and without motor neuron disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000; 100: 421-426.

117. Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T. Genetic analysis in patients with familial and sporadic frontotemporal dementia: two tau mutations in only familial cases and no association with apolipoprotein epsilon4. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001; 12: 387-392.
118. Kwok JB, Teber ET, Loy C, Hallupp M, Nicholson G, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Schofield PR. Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55: 329-334.
119. Lantos PL, Cairns NJ, Khan MN, King A, Revesz T, Janssen JC, Morris H, Rossor MN. Neuropathologic variation in frontotemporal dementia due to the intronic tau 10(+16) mutation. *Neurology* 2002; 58: 1169-1175.
120. Lee G, Neve RL, Kosik KS. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 1989; 2: 1615-1624.
121. Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 1998; 111: 3167-3177.
122. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 1121-1159.
123. Lehmann DJ, Smith AD, Combrinck M, Barnetson L, Joachim C. Apolipoprotein E epsilon2 may be a risk factor for sporadic frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 404-405.
124. Lendon CL, Lynch T, Norton J, McKeel DW Jr, Busfield F, Craddock N, Chakraverty S, Gopalakrishnan G, Shears SD, Grimmett W, Wilhelmsen KC, Hansen L, Morris JC, Goate AM. Hereditary dysphasic disinhibition dementia: a frontotemporal dementia linked to 17q21-22. *Neurology* 1998; 50: 1546-1555.
125. Levchenko A, Robitaille Y, Strong MJ, Rouleau GA. TAU mutations are not a predominant cause of frontotemporal dementia in Canadian patients. *Can J Neurol Sci* 2004; 31: 363-367.
126. Liberski PP, Sobów T, Wszolek ZK. Postępujące zwyrodnienie nadjądrowe, w Liberski PP, Wszolek ZK. *Otepienia czołowo-skroniowe*. Czelej 2005, 155-172.
127. Liberski PP, Wszolek ZK, Mossakowski MJ. Zespoły otepienne czołowo-skroniowe, w Liberski PP, Mossakowski MJ. *Neurodegeneracje TI*. CUN PAN 2003, 163-181.
128. Lippa CF, Zhukareva V, Kawarai T, Uryu K, Shafiq M, Nee LE, Grafman J, Liang Y, St George-Hyslop PH, Trojanowski JQ, Lee VM. Frontotemporal dementia with novel tau pathology and a Glu342Val tau mutation. *Ann Neurol* 2000; 48: 850-858.
129. Litersky JM, Johnson GV. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 1992; 267: 1563-1568.
130. LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995; 92, 10369-10373.
131. Lowe J, Spillantini MG. Non-Alzheimer degenerative dementias. *Brain Pathol* 1998; 8: 295-297.
132. Lund and Manchester Groups Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 416-418.

133. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 1998; 14: 417-422.
134. Lynch T, Sano M, Marder KS, Bell KL, Foster NL, Defendini RF, Sima AA, Keohane C, Nygaard TG, Fahn S. Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex. *Neurology* 1994; 44: 1878-1884.
135. Maestre G, Ottman R, Stern Y, Gurland B, Chun M, Tang M-X, Shelanski M, Tycko B, Mayeux R. Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease: Ethnic Variation in Genotypic Risks. *Ann Neurol* 1995; 37: 254-259.
136. Mann DM, McDonagh AM, Snowden J, Neary D, Pickering-Brown SM. Molecular classification of the dementias. *Lancet* 2000; 355: 626.
137. McKhann GM, Albert MS, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski JQ; Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol* 2001; 58: 1803-1809.
138. Mendez MF, Selwood A, Mastri AR, Frey WH. Pick's disease versus Alzheimer's disease: a comparison of clinical characteristics. *Neurology* 1993; 43: 289-292.
139. Miller BL, Ikonte C, Ponton M, Levy M, Boone K, Darby A, Berman N, Mena I, Cummings JL. A study of the Lund-Manchester research criteria for frontotemporal dementia: clinical and single-photon emission CT correlations. *Neurology* 1997; 48: 937-942.
140. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
141. Minthon L, Hesse C, Sjogren M, Englund E, Gustafson L, Blennow K. The apolipoprotein E epsilon4 allele frequency is normal in fronto-temporal dementia, but correlates with age at onset of disease. *Neurosci Lett* 1997; 226: 65-67.
142. Mirra SS, Murrell JR, Gearing M, Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Levey AI, Jones R, Green J, Shoffner JM, Wainer BH, Schmidt ML, Trojanowski JQ, Ghetti B. Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 335-345.
143. Miyamoto K, Kowalska A, Hasegawa M, Tabira T, Takahashi K, Araki W, Akiguchi I, Ikemoto A. Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10+11-splice site in the tau gene. *Ann Neurol* 2001; 50: 117-120.
144. Morris HR, Baker M, Yasojima K, Houlden H, Khan MN, Wood NW, Hardy J, Grossman M, Trojanowski J, Revesz T, Bigio EH, Bergeron C, Janssen JC, McGeer PL, Rossor MN, Lees AJ, Lantos PL, Hutton M. Analysis of tau haplotypes in Pick's disease. *Neurology* 2002; 59: 443-445.
145. Morris HR, Janssen JC, Bandmann O, Daniel SE, Rossor MN, Lees AJ, Wood NW. The tau gene A0 polymorphism in progressive supranuclear palsy and related neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999b; 66: 665-667.
146. Morris HR, Khan MN, Janssen JC, Brown JM, Perez-Tur J, Baker M, Ozansoy M, Hardy J, Hutton M, Wood NW, Lees AJ, Revesz T, Lantos P, Rossor MN. The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2001; 58: 1813-1816.

147. Morris HR, Perez-Tur J, Janssen JC, Brown J, Lees AJ, Wood NW, Hardy J, Hutton M, Rossor MN. Mutation in the tau exon 10 splice site region in familial frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1999a; 45: 270-271.
148. Murrell JR, Koller D, Foroud T, Goedert M, Spillantini MG, Edenberg HJ, Farlow MR, Ghetti B. Familial multiple-system tauopathy with presenile dementia is localized to chromosome 17. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1131-1138.
149. Murrell JR, Spillantini MG, Zolo P, Guazzelli M, Smith MJ, Hasegawa M, Redi F, Crowther RA, Pietrini P, Ghetti B, Goedert M. Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 1207-1226.
150. Nacharaju P, Lewis J, Easson C, Yen S, Hackett J, Hutton M, Yen SH. Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett* 1999; 447: 195-199.
151. Nasreddine ZS, Loginov M, Clark LN, Lamarche J, Miller BL, Lamontagne A, Zhukareva V, Lee VM, Wilhelmsen KC, Geschwind DH. From genotype to phenotype: a clinical pathological, and biochemical investigation of frontotemporal dementia and parkinsonism (FTDP-17) caused by the P301L tau mutation. *Ann Neurol* 1999; 45: 704-715.
152. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J, Benson DF. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51: 1546-1554.
153. Neumann M, Schulz-Schaeffer W, Crowther RA, Smith MJ, Spillantini MG, Goedert M, Kretschmar HA. Pick's disease associated with the novel Tau gene mutation K369I. *Ann Neurol* 2001; 50: 503-513.
154. Nicholl DJ, Greenstone MA, Clarke CE, Rizzu P, Crooks D, Crowe A, Trojanowski JQ, Lee VM, Heutink P. An English kindred with a novel recessive tauopathy and respiratory failure. *Ann Neurol* 2003; 54: 682-686.
155. Nielsen AS, Ravid R, Kamphorst W, Jorgensen OS. Apolipoprotein E epsilon 4 in an autopsy series of various dementing disorders. *J Alzheimers Dis* 2003; 5: 119-125.
156. Oliveira SA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Small GW, Schmechel DE, Doraiswamy PM, Roses AD, Saunders AM, Gilbert JR, Haines JL, Vance JM, Pericak-Vance MA. The Q7R Saitohin gene polymorphism is not associated with Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 2003; 347: 143.
157. Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry* 1995; 34: 11117-11127.
158. Panegyres PK, Zafiris-Toufexis K. Polymorphisms in the tau gene in sporadic frontotemporal dementia and other neurodegenerative disorders. *Eur J Neurol* 2002; 9: 485-489.
159. Pastor P, Ezquerra M, Munoz E, Marti MJ, Blesa R, Tolosa E, Oliva R. Significant association between the tau gene A0/A0 genotype and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000; 47: 242-245.

160. Pastor P, Ezquerra M, Perez JC, Chakraverty S, Norton J, Racette BA, McKeel D, Perlmutter JS, Tolosa E, Goate AM. Novel haplotypes in 17q21 are associated with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 2004; 56: 249-258.
161. Pastor P, Pastor E, Carnero C, Vela R, Garcia T, Amer G, Tolosa E, Oliva R. Familial atypical progressive supranuclear palsy associated with homozygosity for the delN296 mutation in the tau gene. *Ann Neurol* 2001; 49: 263-267.
162. Peplowska B, Zekanowski C, Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Pfeffer A, Gabryelewicz T, Golebiowski M, Luczywek E, Wasiak B, Barczak A, Chodakowska M, Barcikowska M, Kuznicki J. Strong association between Saitohin gene polymorphism and tau haplotype in the Polish population. *Neurosci Lett* 2003; 348: 163-166.
163. Pickering-Brown S, Baker M, Yen SH, Liu WK, Hasegawa M, Cairns N, Lantos PL, Rossor M, Iwatsubo T, Davies Y, Allsop D, Furlong R, Owen F, Hardy J, Mann D, Hutton M. Pick's disease is associated with mutations in the tau gene. *Ann Neurol* 2000a; 48: 859-867.
164. Pickering-Brown SM, Baker M, Nonaka T, Ikeda K, Sharma S, Mackenzie J, Simpson SA, Moore JW, Snowden JS, Silva Rd R, Revesz T, Hasegawa M, Hutton M, Mann DM. Frontotemporal dementia with Pick-type histology associated with Q336R mutation in the tau gene. *Brain* 2004; 127: 1415-1426.
165. Pickering-Brown SM, Owen F, Isaacs A, Snowden J, Varma A, Neary D, Furlong R, Daniel SE, Cairns NJ, Mann DM. Apolipoprotein E epsilon4 allele has no effect on age at onset or duration of disease in cases of frontotemporal dementia with pick- or microvacuolar-type histology. *Exp Neurol* 2000b; 163: 452-6.
166. Pickering-Brown SM, Richardson AM, Snowden JS, McDonagh AM, Burns A, Braude W, Baker M, Liu WK, Yen SH, Hardy J, Hutton M, Davies Y, Allsop D, Craufurd D, Neary D, Mann DM. Inherited frontotemporal dementia in nine British families associated with intronic mutations in the tau gene. *Brain* 2002; 125: 732-751.
167. Pickering-Brown SM, Siddons M, Mann DM, Owen F, Neary D, Snowden JS. Apolipoprotein E allelic frequencies in patients with lobar atrophy. *Neurosci Lett* 1995; 188: 205-207.
168. Pittman AM, Myers AJ, Duckworth J, Bryden L, Hanson M, Abou-Sleiman P, Wood NW, Hardy J, Lees A, de Silva R. The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1267-1274.
169. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.
170. Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998; 43: 815-825.
171. Poorkaj P, Grossman M, Steinbart E, Payami H, Sadovnick A, Nochlin D, Tabira T, Trojanowski JQ, Borson S, Galasko D, Reich S, Quinn B, Schellenberg G, Bir TD.

- Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 2001b; 58: 383-387.
172. Poorkaj P, Kas A, D'Souza I, Zhou Y, Pham Q, Stone M, Olson MV, Schellenberg GD. Genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau. *Mamm Genome* 2001a; 12: 700-712.
173. Poorkaj P, Muma N, Jin Y. Pathological and biochemical characterization of a tau R5L mutation in a single case of PSP. *Society for Neuroscience* 2001c; 429: 4.
174. Rademakers R, Cruts M, Dermaut B, Sleegers K, Rosso SM, Van den Broeck M, Backhovens H, van Swieten J, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. Tau negative frontal lobe dementia at 17q21: significant finemapping of the candidate region to a 4.8 cM interval. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 1064-1074.
175. Rademakers R, van der Zee J, Kumar-Singh S, Dermaut B, Cruts M, Van Broeckhoven C. Chromosome 17-linked Frontotemporal dementia with Ubiquitin-Positive, tau-Negative Inclusions. In: Cummings J, Hardy J, Poncet M, Christen Y (eds) *Genotype-Phenotype-Relationships in Neurodegenerative Diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005, 117-137
176. Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology* 2002; 58: 1615-1621.
177. Raux G, Gantier R, Thomas-Anterion C, Boulliat J, Verpillat P, Hannequin D, Brice A, Frebourg T, Campion D. Dementia with prominent frontotemporal features associated with L113P presenilin 1 mutation. *Neurology* 2000; 55: 1577-1578.
178. Reed LA, Schmidt ML, Wszolek ZK, Balin BJ, Soontornniyomkij V, Lee VM, Trojanowski JQ, Schelper RL. The neuropathology of a chromosome 17-linked autosomal dominant parkinsonism and dementia ("pallido-ponto-nigral degeneration"). *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 588-601.
179. Reed LA, Wszolek ZK, Hutton M. Phenotypic correlations in FTDP-17. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 89-107.
180. Rizzini C, Goedert M, Hodges JR, Smith MJ, Jakes R, Hills R, Xuereb JH, Crowther RA, Spillantini MG. Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 990-1001.
181. Rizzu P, Joosse M, Ravid R, Hoogeveen A, Kamphorst W, van Swieten JC, Willemsen R, Heutink P. Mutation-dependent aggregation of tau protein and its selective depletion from the soluble fraction in brain of P301L FTDP-17 patients. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 3075-3082.
182. Rizzu P, Van Swieten JC, Joosse M, Hasegawa M, Stevens M, Tibben A, Niermeijer MF, Hillebrand M, Ravid R, Oostra BA, Goedert M, van Duijn CM, Heutink P. High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 414-421.
183. Ros R, Thobois S, Streichenberger N, Kopp N, Sanchez MP, Perez M, Hoenicka J, Avila J, Honnorat J, de Yébenes JG. A new mutation of the tau gene, G303V, in early-onset familial progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol* 2005; 62: 1444-1450.
184. Rosen HJ, Hartikainen KM, Jagust W, Kramer JH, Reed BR, Cummings JL, Boone K, Ellis W, Miller C, Miller BL. Utility of clinical criteria in differentiating

- frontotemporal lobar degeneration (FTLD) from AD. *Neurology* 2002; 58: 1608-1615.
185. Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, de Koning I, Pijnenburg Y, de Jong D, Dooijes D, Kamphorst W, Ravid R, Niermeijer MF, Verheij F, Kremer HP, Scheltens P, van Duijn CM, Heutink P, van Swieten JC. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain* 2003; 126: 2016-2022.
186. Rosso SM, Kamphorst W, de Graaf B, Willemsen R, Ravid R, Niermeijer MF, Spillantini MG, Heutink P, van Swieten JC. Familial frontotemporal dementia with ubiquitin-positive inclusions is linked to chromosome 17q21-22. *Brain* 2001; 124: 1948-1957.
187. Rosso SM, Roks G, Cruts M, van Broeckhoven C, Heutink P, van Duijn CM, van Swieten JC. Apolipoprotein E4 in the temporal variant of frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002b; 72: 820.
188. Rosso SM, van Herpen E, Deelen W, Kamphorst W, Severijnen LA, Willemsen R, Ravid R, Niermeijer MF, Dooijes D, Smith MJ, Goedert M, Heutink P, van Swieten JC. A novel tau mutation, S320F, causes a tauopathy with inclusions similar to those in Pick's disease. *Ann Neurol* 2002a; 51: 373-376.
189. Russ C, Lovestone S, Baker M, Pickering-Brown SM, Andersen PM, Furlong R, Mann D, Powell JF. The extended haplotype of the microtubule associated protein tau gene is not associated with Pick's disease. *Neurosci Lett* 2001; 299: 156-158.
190. Savioz A, Kovari E, Anastasiu R, Rossier C, Saini K, Bouras C, Leuba G. Search for a mutation in the tau gene in a Swiss family with frontotemporal dementia. *Exp Neurol* 2000; 161: 330-335.
191. Savioz A, Riederer BM, Heutink P, Rizzu P, Tolnay M, Kovari E, Probst A, Riederer IM, Bouras C, Leuba G. Tau and neurofilaments in a family with frontotemporal dementia unlinked to chromosome 17q21-22. *Neurobiol Dis* 2003; 12: 46-55.
192. Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, Mantuano E, Guevara A, De Stefano GF. Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Hum Biol* 1997; 69: 375-382.
193. Schneider JA, Gearing M, Robbins RS, de l'Aune W, Mirra SS. Apolipoprotein E genotype in diverse neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 1995; 38: 131-135.
194. Schroder R, Watts GD, Mehta SG, Evert BO, Broich P, Fliessbach K, Pauls K, Hans VH, Kimonis V, Thal DR. Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2005; 57: 457-61.
195. Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ. Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 1995; 270: 18917-18922.
196. Short RA, Graff-Radford NR, Adamson J, Baker M, Hutton M. Differences in tau and apolipoprotein E polymorphism frequencies in sporadic frontotemporal lobar degeneration syndromes. *Arch Neurol* 2002; 59: 611-615.

197. Slachevsky A, Villalpando JM, Sarazin M, Hahn-Barma V, Pillon B, Dubois B. Frontal assessment battery and differential diagnosis of frontotemporal dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2004; 61: 1104-1107.
198. Sobrido MJ, Miller BL, Havlioglu N, Zhukareva V, Jiang Z, Nasreddine ZS, Lee VM, Chow TW, Wilhelmsen KC, Cummings JL, Wu JY, Geschwind DH. Novel tau polymorphisms, tau haplotypes, and splicing in familial and sporadic frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2003; 60: 698-702.
199. Sperfeld AD, Collatz MB, Baier H, Palmbach M, Storch A, Schwarz J, Tatsch K, Reske S, Joosse M, Heutink P, Ludolph AC. FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann. Neurol* 1999; 46: 708-715.
200. Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol* 1998a; 8: 387-402.
201. Spillantini MG, Crowther RA, Goedert M. Comparison of the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease and familial presenile dementia with tangles. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996; 92: 42-48.
202. Spillantini MG, Crowther RA, Kamphorst W, Heutink P, van Swieten JC. Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau. *Am J Pathol* 1998c; 153: 1359-1363.
203. Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Murrell JR, Farlow MR, Ghetti B. Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 4113-4118.
204. Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci* 1998b; 95: 7737-7741.
205. Spillantini MG, Yoshida H, Rizzini C, Lantos PL, Khan N, Rossor MN, Goedert M, Brown J. A novel tau mutation (N296N) in familial dementia with swollen achromatic neurons and corticobasal inclusion bodies. *Ann Neurol* 2000; 48: 939-943.
206. Stanford PM, Brooks WS, Teber ET, Hallupp M, McLean C, Halliday GM, Martins RN, Kwok JB, Schofield PR. Frequency of tau mutations in familial and sporadic frontotemporal dementia and other tauopathies. *J Neurol* 2004; 251: 1098-1104.
207. Stanford PM, Halliday GM, Brooks WS, Kwok JB, Storey CE, Creasey H, Morris JG, Fulham MJ, Schofield PR. Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations. *Brain* 2000; 123: 880-893.
208. Stanford PM, Shepherd CE, Halliday GM, Brooks WS, Schofield PW, Brodaty H, Martins RN, Kwok JB, Schofield PR. Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain* 2003; 126: 814-826.
209. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002; 18: 74-82.
210. Stevens M, van Duijn CM, de Knijff P, van Broeckhoven C, Heutink P, Oostra BA, Niermeijer MF, van Swieten JC. Apolipoprotein E gene and sporadic frontal lobe dementia. *Neurology* 1997; 48: 1526-1529.

211. Stevens M, van Duijn CM, Kamphorst W, de Knijff P, Heutink P, van Gool WA, Scheltens P, Ravid R, Oostra BA, Niermeijer MF, van Swieten JC. Familial aggregation in frontotemporal dementia. *Neurology* 1998; 50: 1541-1545.
212. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 11183-11186.
213. Styczyńska M, Religa D, Pfeffer A, Łuczywek E, Wasiak B, Gabryelewicz T, Czyżewski K, Gołębiowski M, Barcikowska M. Two patients with early-onset Alzheimer's disease and unique APOE e2/2 genotype. A case report. *Alzheimer's Reports* 2001; 4: 151-153.
214. Styczyńska M, Religa D, Pfeffer A, Luczywek E, Wasiak B, Styczynski G, Peplowska B, Gabryelewicz T, Golebiowski M, Kobrys M, Barcikowska M. Simultaneous analysis of five genetic risk factors in Polish patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2003; 344: 99-102.
215. Swartz JR, Miller BL, Lesser IM, Booth R, Darby A, Wohl M, Benson DF. Behavioral phenomenology in Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and late-life depression: a retrospective analysis. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1997; 10: 67-74.
216. Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9637-9641.
217. Tang-Wai D, Lewis P, Boeve B, Hutton M, Golde T, Baker M, Hardy J, Michels V, Ivnik R, Jack C, Petersen R. Familial frontotemporal dementia associated with a novel presenilin-1 mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2002; 14: 13-21.
218. Tesseur I, Van Dorpe J, Spittaels K, Van den Haute C, Moechars D, Van Leuven F. Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am J Pathol* 2000; 156: 951-964.
219. Tolnay M, Probst A. Frontotemporal lobar degeneration. An update on clinical, pathological and genetic findings. *Gerontology* 2001; 47: 1-8.
220. Trojanowski JQ, Dickson D. Update on the neuropathological diagnosis of frontotemporal dementias. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1123-1126.
221. Tsuboi Y, Baker M, Hutton ML, Uitti RJ, Rascol O, Delisle MB, Soulages X, Murrell JR, Ghetti B, Yasuda M, Komure O, Kuno S, Arima K, Sunohara N, Kobayashi T, Mizuno Y, Wszolek ZK. Clinical and genetic studies of families with the tau N279K mutation (FTDP-17). *Neurology* 2002; 59: 1791-1793.
222. Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 339-347.
223. van Duijn CM, de Knijff P, Wehnert A, De Voecht J, Bronzova JB, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C. The apolipoprotein E epsilon 2 allele is associated with an increased risk of early-onset Alzheimer's disease and a reduced survival. *Ann Neurol* 1995; 37: 605-610.

224. Van Herpen E, Rosso SM, Serverijnen LA, Yoshida H, Breedveld G, Van De Graaf R, Kamphorst W, Ravid R, Willemsen R, Dooijes D, Majoor-Krakauer D, Kros JM, Crowther RA, Goedert M, Heutink P, Van Swieten JC. Variable phenotypic expression and extensive tau pathology in two families with the novel tau mutation L315R. *Ann Neurol* 2003; 54: 573-581.
225. van Swieten JC, Stevens M, Rosso SM, Rizzu P, Joosse M, de Koning I, Kamphorst W, Ravid R, Spillantini MG, Niermeijer MF, Heutink P. Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations. *Ann Neurol* 1999; 46: 617-626.
226. Varani L, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Murrell JR, Ghetti B, Klug A, Goedert M, Varani G. Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 8229-8234.
227. Varma AR, Snowden JS, Lloyd JJ, Talbot PR, Mann DM, Neary D. Evaluation of the NINCDS-ADRDA criteria in the differentiation of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 184-188.
228. Verpillat P, Camuzat A, Hannequin D, Thomas-Anterion C, Puel M, Belliard S, Dubois B, Didic M, Lacomblez L, Moreaud O, Golfier V, Champion D, Brice A, Clerget-Darpoux F. Apolipoprotein E gene in frontotemporal dementia: an association study and meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2002c; 10: 399-405.
229. Verpillat P, Camuzat A, Hannequin D, Thomas-Anterion C, Puel M, Belliard S, Dubois B, Didic M, Michel BF, Lacomblez L, Moreaud O, Sellal F, Golfier V, Champion D, Clerget-Darpoux F, Brice A. Association between the extended tau haplotype and frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2002a; 59: 935-939.
230. Verpillat P, Ricard S, Hannequin D, Dubois B, Bou J, Camuzat A, Pradier L, Frebourg T, Brice A, Clerget-Darpoux F, Deleuze JF, Champion D; French Study Group on Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. Is the saitojin gene involved in neurodegenerative diseases? *Ann Neurol* 2002b; 52: 829-832.
231. Von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J Biol Chem* 2001; 276: 48165-48174.
232. Von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 5129-5134.
233. Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP, Kimonis VE. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 2004; 36: 377-381.
234. Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem* 1994; 45: 249-302.
235. Wijker M, Wszolek ZK, Wolters EC, Rooimans MA, Pals G, Pfeiffer RF, Lynch T, Rodnitsky RL, Wilhelmsen KC, Arwert F. Localization of the gene for rapidly

- progressive autosomal dominant parkinsonism and dementia with pallido-ponto-nigral degeneration to chromosome 17q21. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 151-154.
236. Wilhelmsen KC, Lynch T, Pavlou E, Higgins M, Nygaard TG. Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 1159-1165.
237. Wszolek ZK. Otepienie czolowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17 (FTDP-17), w Szczudlik A, Liberski PP, Barcikowska M. Otepienie, *WUJ* 2004, 303-313.
238. Wszolek ZK, Krygowska-Wajs A, Barcikowska M. Otepienie czolowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17 (FTDP-17): kryteria kliniczne. *Neurol Neurochir Pol* 2003a; 37: 173-184.
239. Wszolek ZK, Pfeiffer RF, Bhatt MH, Schelper RL, Cordes M, Snow BJ, Rodnitzky RL, Wolters EC, Arwert F, Calne DB. Rapidly progressive autosomal dominant parkinsonism and dementia with pallido-ponto-nigral degeneration. *Ann Neurol* 1992; 32: 312-320.
240. Wszolek ZK, Tsuboi Y, Ghetti B, Cheshire W. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Orphanet Encyclopedia* 2003b, <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-FTDP.html>.
241. Wszolek ZK, Tsuboi Y, Uitti RJ, Reed L, Hutton ML, Dickson DW. Progressive supranuclear palsy as a disease phenotype caused by the S305S tau gene mutation. *Brain* 2001; 124: 1666-1670.
242. Yancopoulos D, Crowther RA, Chakrabarti L, Gydesen S, Brown JM, Spillantini MG. Tau protein in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3). *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 878-882.
243. Yasuda M, Kawamata T, Komure O, Kuno S, D'Souza I, Poorkaj P, Kawai J, Tanimukai S, Yamamoto Y, Hasegawa H, Sasahara M, Hazama F, Schellenberg GD, Tanaka C. A mutation in the microtubule-associated protein tau in pallido-nigro-lusian degeneration. *Neurology* 1999; 53: 864-868.
244. Yasuda M, Takamatsu J, D'Souza I, Crowther RA, Kawamata T, Hasegawa M, Hasegawa H, Spillantini MG, Tanimukai S, Poorkaj P, Varani L, Varani G, Iwatsubo T, Goedert M, Schellenberg DG, Tanaka C. A novel mutation at position +12 in the intron following exon 10 of the tau gene in familial frontotemporal dementia (FTD-Kumamoto). *Ann Neurol* 2000; 47: 422-429.
245. Yen S, Easson C, Nacharaju P, Hutton M, Yen SH. FTDP-17 tau mutations decrease the susceptibility of tau to calpain I digestion. *FEBS Lett* 1999; 461: 91-95.
246. Yoshida H, Crowther RA, Goedert M. Functional effects of tau gene mutations deltaN296 and N296H. *J Neurochem* 2002; 80: 548-551.
247. Zarranz JJ, Ferrer I, Lezcano E, Forcadás MI, Eizaguirre B, Atares B, Puig B, Gomez-Esteban JC, Fernandez-Maiztegui C, Rouco I, Perez-Concha T, Fernandez M, Rodriguez O, Rodriguez-Martinez AB, de Pancorbo MM, Pastor P, Perez-Tur J. A novel mutation (K317M) in the MAPT gene causes FTDP and motor neuron disease. *Neurology* 2005; 64: 1578-1585.
248. Zekraoui L, Lagarde JP, Raisonnier A, Gerard N, Aouizerate A, Lucotte G. High frequency of the apolipoprotein E4 allele in African pygmies and most of the African populations in sub-Saharan Africa. *Hum Biol* 1997; 69: 575-581.

249. Zhukareva V, Sundarraj S, Mann D, Sjogren M, Blenow K, Clark CM, McKeel DW, Goate A, Lippa CF, Vonsattel JP, Growdon JH, Trojanowski JQ, Lee VM. Selective reduction of soluble tau proteins in sporadic and familial frontotemporal dementias: an international follow-up study. *Acta Neuropathol (Berl)* 2003; 105: 469-476.
250. Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Van Deerlin VM, Bruce J, Shuck T, Grossman M, Clark CM, Arnold SE, Masliah E, Galasko D, Trojanowski JQ, Lee VM. Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2001; 49: 165-175.
251. Żekanowski C, Golan M, Krzyśko KA, Religa D, Lipczyńska-Łojkowska W, Filipek S, Kowalska A, Rossa G, Peplowska B, Styczyńska M, Maruszak A, Wender M, Kulczycki J, Barcikowska M, Kuźnicki J. Two novel presenilin-1 gene mutations connected with frontotemporal dementia-like phenotype: genetic and bioinformatic assessment. *Wysłane do redakcji*, 2005.
252. Żekanowski C, Peplowska B, Styczynska M, Gustaw K, Kuznicki J, Barcikowska M. Mutation screening of the MAPT and STH genes in Polish patients with clinically diagnosed frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003a; 16: 126-131.
253. Żekanowski C, Peplowska B, Styczynska M, Religa D, Pfeffer A, Czyzewski K, Gabryelewicz T, Szybinska A, Kijanowska-Haladyna B, Kotapka-Minc S, Luczywek E, Barczak A, Wasiak B, Chodakowska-Zebrowska M, Przekop I, Kuznicki J, Barcikowska M. The E318G substitution in PSEN1 gene is not connected with Alzheimer's disease in a large Polish cohort. *Neurosci Lett* 2004; 357: 167-170.
254. Żekanowski C, Styczyńska M, Peplowska B, Gabryelewicz T, Religa D, Ilkowski J, Kijanowska-Haladyna B, Kotapka-Minc S, Mikkelsen S, Pfeffer A, Barczak A, Luczywek E, Wasiak B, Chodakowska-Zebrowska M, Gustaw K, Łączkowski J, Sobów T, Kuźnicki J, Barcikowska M. Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer disease in Poland. *Exp Neurol* 2003b; 184: 991-996.

8. STRESZCZENIE

Otępienie czołowo-skroniowe (FTD; ang. *frontotemporal demantia*) stanowi trzecią po chorobie Alzheimera i otępieniu z ciałami Lewy'ego przyczynę otępień pierwotnie zwyrodnieniowych. Szacuje się, że dotyka ono 20% chorych w tej grupie. Jest to schorzenie klinicznie i genetycznie wysoce heterogenne. Jedynym znanym genem, którego zmiany sprzężone są z rozwinięciem fenotypu chorobowego, jest gen *MAPT* (ang. *microtubule-associated protein tau*). Koduje on białko tau, należące do rodziny białek cytoplazmatycznych związanych z mikrotubulami. Dotychczas opisano 39 mutacji przyczynowo związanych z chorobą, w większości o charakterze autosomalnym dominującym. Znajdują się one głównie w obszarze odpowiedzialnym za oddziaływanie tau z tubulinami. Region ten tworzą 3 lub 4 tandemowo ułożone powtórzenia (R) o wysoce konserwatywnej sekwencji, kodowane przez eksony 9-12. Podstawienia nukleotydowe w obrębie intronu 10 niszczą charakterystyczną przestrzenną strukturę i prowadzą do nadekspresji izoformy tau zawierającej 4 powtórzenia (4R). Do zachwiania proporcji między stężeniem izoform 3R i 4R tau prowadzą też mutacje w sekwencjach regulatorowych dla procesu składania, zlokalizowane w eksonie 10. Pozostałe mutacje, wpływając na właściwości fizyko-chemiczne białka, prowadzą do dezorganizacji szkieletu mikrotubularnego. Mutacje mogą jednocześnie wzmacniać tendencję tau do autonukleacji. W ten sposób dochodzi do nagromadzenia się w komórce nadmiernych ilości hiperfosforylowanego białka, którego agregacja prowadzi do powstania zwyrodnienia neurofibrilarnego, obserwowanego w badaniu histopatologicznym.

Wszystkie kliniczne fenotypy wynikłe z istnienia mutacji *MAPT* objęto wspólną nazwą: otępienie czołowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17 (FTDP-17; ang. *Frontotemporal Dementia with Parkinsonism Linked to Chromosome 17*). Zróżnicowanie kliniczne pojawia się nie tylko między rodzinami

FTDP-17 obciążonymi tą samą mutacją, ale nawet wśród członków tej samej rodziny.

Ze względu jednak na osiowe objawy chorobowe wyróżniono dwa zasadnicze fenotypy:

- z dominującym obrazem otępiennym połączonym z zaburzeniami osobowości i zachowania, który zasocjowany jest z nosicielstwem mutacji nie powodujących zaburzeń składania eksonu 10,
- z przeważającymi objawami parkinsonowskimi, obserwowany u nosicieli mutacji prowadzących do nadekspresji izoformy 4R tau.

Szerokie spektrum objawów świadczyć może o istnieniu modyfikującego wpływu innych czynników genetycznych. Do najczęściej rozważanych należą: polimorfizm genu sprawczego, *sitohiny* (*STH*) i *apolipoproteiny E* (*APOE*). Wpływ tych czynników jest brany pod uwagę również w przypadkach otępienia czołowo-skroniowego bez udziału tak wyraźnie określonego komponentu genetycznego, jak w FTDP-17.

Celem przedstawionej pracy były:

1. Identyfikacja zmian w części kodującej oraz bliskich sekwencjach intronowych genu *MAPT* w grupie chorych z otępieniem czołowo-skroniowym z populacji polskiej.
2. Korelacja zidentyfikowanych zmian z prezentowanym fenotypem klinicznym.
3. Ocena znaczenia polimorfizmu genów: *apolipoproteiny E* i *saitohiny*, jako potencjalnych, genetycznych czynników ryzyka.
4. Szacunkowa ocena przydatności analizy genu *MAPT* i innych genetycznych czynników modulujących w diagnostyce klinicznej oraz poradnictwie genetycznym.

Badania przeprowadzono u 45 pacjentów z otępieniem czołowo-skroniowym. Badani pacjenci pozostają pod opieką Poradni Alzheimerowskiej MSWiA/IMDiK PAN, IPiN oraz AM w Warszawie. Rozpoznanie choroby stawiane jest w oparciu o badanie neuropsychologiczne, neurologiczne, psychiatryczne oraz tomografię komputerową mózgu i odpowiada prawdopodobnemu otępieniu czołowo-skroniowemu według kryteriów Lund-Manchester. Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych osób. Osoby te nie zgłaszały zaburzeń pamięci, nie wykazywały odchyłeń w badaniu neurologicznym a wyniki testu Mini Mental State Examination wynosiły co najmniej 27/30 punktów. Genomowy DNA do badań uzyskiwano z leukocytów krwi obwodowej przy użyciu metody solnej. Do identyfikacji zmian w obrębie sekwencji kodujących genu *MAPT* wykorzystano technikę bezpośredniego, cyklicznego sekwencjonowania fluorescencyjnego. Genotypowanie polimorfizmów genów *apolipoproteiny E* i *saitohiny* zostało wykonane przy zastosowaniu techniki zmienności długości fragmentów restrykcyjnych. Identyfikacja haplotypu *MAPT* oparta była na analizie obecności delekcji metodą reakcji łańcuchowej polimerazy. Do oceny zgodności rozkładu poszczególnych geneotypów w grupie badanej i kontrolnej posłużono się testem Chi-kwadrat.

Opisano 29 zmian polimorficznych w części kodującej oraz bliskich sekwencjach intronowych genu *MAPT*. Dwadzieścia jeden z nich dziedziczy się łącznie, stanowiąc haplotyp *MAPT* (H1/H2). Nie zaobserwowano rekombinacji wewnątrz haplotypów. Odnotowano, że cztery stosunkowo rzadkie polimorfizmy występowały w prowadzonym badaniu zawsze na genotypie H1/H1. Ustalono, że polimorfizm genu *STH* pozostaje w całkowitej nierównowadze sprzężeń z haplotypem i stanowi jego integralną część. Wskazano na silną tendencję w kierunku rozwijania się zespołu pozapiramidowego u osób homozygotycznych względem haplotypu H1. Nie odnotowano u żadnego chorego mutacji *MAPT* przyczynowo związanej z chorobą. Z tego względu podjęto analizę innych

potencjalnych czynników genetycznych, mogących mieć wpływ na zachorowanie. Analiza rozkładu haplotypów *MAPT* oraz genotypów *APOE* nie wykazała istotnych statystycznie różnic między grupą kontrolną i całością grupy badanej. Nie odnotowano też wpływu tych czynników genetycznych na wiek zachorowania. Zaobserwowano jednak statystycznie istotny wzrost częstości pojawiania się allelu *APOE* $\epsilon 4$ w grupie przypadków rodzinnych FTD. Natomiast wzrost frekwencji genotypu H1/H1 charakterystyczny był dla przypadków sporadycznych. Haplotyp H2 występował częściej w rodzinnych zachorowaniach, jednak zależność pozbawiona była istotności statystycznej. Nie odnotowano związku między zachorowaniem a jednoczesnym wystąpieniem *APOE* $\epsilon 4$ i genotypu H1/H1 *MAPT*. Bardziej prawdopodobny wydaje się wpływ allelu *APOE* $\epsilon 2$ występującego łącznie z tym genotypem *MAPT*. Analizując dane literaturowe zauważono znaczne rozbieżności w częstości identyfikacji poszczególnych alleli, nie tylko między grupami etnicznymi, ale także w bliskich sobie rejonach geograficznych, co znacznie utrudnia prowadzenie badań populacyjnych.

Przedstawione w pracy wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Mutacje *MAPT* nie są częstą przyczyną otępienia czołowo-skroniowego wśród polskich chorych.
2. Duża część polimorfizmów genu *MAPT* istnieje w całkowitej nierównowadze sprzężeń, tworząc nie podlegający rekombinacji haplotyp.
3. Częścią haplotypu *MAPT* jest polimorfizm genu sitohiny.
4. Formy polimorficzne mogą znajdować odbicie w przebiegu klinicznym schorzenia. Postać homozygotyczna haplotypu H1 stanowi czynnik ryzyka wystąpienia zespołu pozapiramidowego u chorych.

5. Haplotyp *MAPT* oraz polimorfizm *APOE* nie stanowią w sposób jednoznaczny genetycznych czynników ryzyka rozwoju choroby. Odmienny rozkład tych alleli w przypadkach rodzinnych i sporadycznych sugeruje jednak ich złożony udział w patogenezie FTD. Niewykluczony jest synergistyczny wpływ alleli *APOE* i genotypu *MAPT* na zachorowanie.
6. Zróżnicowana częstość występowania alleli badanych genów nie tylko między grupami etnicznymi, ale także w bliskich sobie rejonach geograficznych, świadczyć może o odmiennym wpływie poszczególnych markerów w zależności od innych współwystępujących czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych.
7. Przeszukiwanie genu *MAPT* w kierunku mutacji nie jest uzasadnione w praktyce klinicznej. Polimorfizmy *MAPT*, *APOE* i *STH* nie są markerami użytecznymi w diagnostyce klinicznej oraz nie powinny być wykorzystywane w poradnictwie genetycznym.

9. SPIS TABEL I RYCIN ZAMIESZCZONYCH W TEKŚCIE

Tabela 1. Mutacje genu <i>MAPT</i> .	str. 21
Tabela 2. Kliniczny i genetyczny obraz pacjentów.	str. 54
Tabela 3. Zmiany polimorficzne <i>MAPT</i> scharakteryzowane w grupie pacjentów.	str. 59
Tabela 4. Rozkład częstości haplotypów i alleli <i>MAPT</i> oraz <i>STH</i> w populacji zdrowej i wśród chorych z FTD.	str. 60
Tabela 5. Rozkład częstości haplotypów i alleli <i>MAPT</i> oraz <i>STH</i> w przypadkach zachorowań rodzinnych i sporadycznych.	str. 61
Tabela 6. Rozkład częstości haplotypów i alleli <i>MAPT</i> oraz <i>STH</i> w przypadkach późnych i wczesnych zachorowań.	str. 61
Tabela 7. Rozkład częstości alleli i genotypów <i>MAPT</i> w różnych populacjach – Metaanaliza.	str. 63
Tabela 8. Rozkład częstości alleli i genotypów <i>apolipoproteiny E</i> .	str. 64
Tabela 9. Częstość allelu <i>APOE ε4</i> w przypadkach rodzinnych i sporadycznych oraz w zależności od wieku zachorowania.	str. 65
Tabela 10. Jednoczesna analiza polimorfizmu <i>APOE</i> i haplotypu <i>MAPT</i> w grupie kontrolnej i wśród chorych z FTD.	str. 66
Rycina 1. Alternatywne składanie genu <i>MAPT</i> .	str. 16
Rycina 2. Lokalizacja mutacji genu <i>MAPT</i> .	str. 23
Rycina 3. Przykładowy obraz otrzymany z automatycznego analizatora genetycznego.	str. 47
Rycina 4. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji fragmentu genu <i>apolipoproteiny E</i> trawionego enzymami restrykcyjnymi Hae II i Afl III.	str. 49
Rycina 5. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji fragmentu genu <i>saitohiny</i> trawionego enzymem restrykcyjnymi Hinf I.	str. 50
Rycina 6. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji fragmentu genu <i>MAPT</i> , wizualizujący obecność 238 bp delecji w H2.	str. 51
Rycina 7. Schematyczne rozmieszczenie zidentyfikowanych zmian polimorficznych <i>MAPT</i> .	str. 58